



Efecto de los contaminantes atmosféricos en los cultivos agrícolas

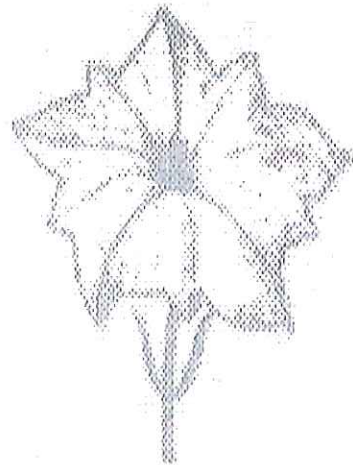


VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Tesis Doctoral

Jaime Walter
Alvarado Ramírez

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL



EFECTO DE LOS CONTAMINANTES
ATMOSFÉRICOS EN LOS CULTIVOS
AGRÍCOLAS

Memoria presentada por
Jaime Walter Alvarado Ramírez
Para optar el Título de
Doctor Ing. Agrónomo
Valencia 2002



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA VEGETAL

La Dra. Eva Barreno Rodríguez, Catedrática de Botánica y la Dra. Ángeles Calatayud Chover Investigadora del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universitat de València.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "Efecto de los contaminantes atmosféricos en los cultivos agrícolas" que presenta Jaime Walter Alvarado Ramírez para aspirar al grado de Doctor Ing. Agrónomo ha sido realizada bajo nuestras direcciones.

Y para que conste a los efectos oportunos expedimos el presente certificado en Burjassot, a veinte de Marzo de 2002.

Fdo. Eva Barreno Rodríguez

Fdo. Ángeles Calatayud Chover

Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis.

1. Datos del autor:

| | |
|--|-------------------------------|
| Apellidos y nombres: | ALVARADO ROMIREZ JOINE WALTER |
| Código de alumno : | Teléfono: 942690054 |
| Correo electrónico : javarado_2001@yahoo.com | DNI: 00901846 |

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

| | |
|--------------|-----------------------------------|
| Facultad de: | AGRONOMIA |
| Programa de: | DOCTORADO CONTAMINACION AMBIENTAL |

3. Tipo de trabajo de investigación

| | | | |
|------------------------------------|-----|--------------------------|-----|
| Tesis DOCTORAL | (X) | Trabajo de investigación | () |
| Trabajo de suficiencia profesional | () | | |

4. Datos del Trabajo de investigación

| | |
|---------------------|---|
| Título: | EFEECTO DE LOS CONTAMINANTES ATMOSFERICOS EN LOS CULTIVOS AGRICOLDS |
| Año de publicación: | 2002 |

5. Tipo de Acceso al documento

| | | | |
|-----------------------|-----|---------|-----|
| Acceso público * | (X) | Embargo | () |
| Acceso restringido ** | () | | |

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indique el sustento correspondiente:

| |
|--|
| |
| |

6. Originalidad del archivo digital.

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el título profesional o grado académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el Jurado.

7. Otorgamiento de una licencia **CREATIVE COMMONS**

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor, por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el inciso 12.2, del artículo 12° del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales - RENATI **“Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA”**.




.....
Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM – T.

Fecha de recepción del documento:

24 / 02 / 2020



.....
Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM – T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

** **Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores: Dra. Eva Barreno Rodríguez y Dra. Ángeles Calatayud Chover por sus apoyos y sabias orientaciones y por haberme permitido estar bajo sus direcciones en el desarrollo del presente trabajo de investigación. Muchas gracias.

A Miquel Juan Delhom, Jefe de la Estación Experimental Agraria de Carcaixent y a todos los trabajadores de esta entidad por su apoyo y colaboración en la disposición de los medios necesarios para el desarrollo de la Tesis, en especial a Maite Urango y a Eulogio Alexandre por su ayuda desinteresada.

A la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Comunidad Valenciana, por el apoyo presentado en la financiación de la Tesis Doctoral.

A Simón Fos, Sergio Pérez, Francisco Gasulla, Carmen Carbonell y Jose Luis Carrasco, compañeros del Departamento de Biología Vegetal por sus ayudas prestadas y consejos en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A todos los colegas adscritos al Departamento Académico Agro-silvo Pastoril de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín, Tarapoto-Perú, por su apoyo recibido en la prolongación de mi estancia en este País.

A mis padres que en paz descansan, por sus sabios consejos, a mis hermanos (as), familiares y amigos en su conjunto por su apoyo moral.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional a través del Programa Becas MUTIS por haberme concedido una beca durante cuatro años y a la propia Universitat de Valencia por concederme también una beca financiera en los últimos cuatro meses de mi estancia.

A mis padres y hermanos

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 La fotosíntesis..... | 2 |
| 1.2 La fluorescencia de la clorofila a..... | 3 |
| 1.3 Fotoinhibición..... | 11 |
| 1.4 Efecto del ozono sobre las plantas vasculares..... | 13 |
| 1.5 Efecto del ozono sobre las plantas agrícolas..... | 15 |
| 1.6 Sistemas antioxidantes..... | 16 |
| 1.6.1. Sistemas antioxidantes no enzimáticos..... | 17 |
| 1.6.1.1 Ascorbato..... | 17 |
| 1.6.1.2 Glutation..... | 21 |
| 1.6.1.3 α -Tocoferol..... | 23 |
| 1.6.2 Enzimas antioxidantes..... | 23 |
| 1.6.2.1 Superóxido dismutasa..... | 24 |
| 1.6.2.2 Peroxidasa..... | 25 |
| 1.6.2.3 Glutation reductasa..... | 26 |
| 1.6.2.4 Catalasa..... | 27 |
| 1.7 Descripción e instalación del campo experimental..... | 27 |
| 1.7.1 Sistema de control..... | 28 |
| 1.7.2 Sistema de muestreo y análisis (SMA)..... | 31 |
| 1.7.2.1 Subsistema de muestreo..... | 31 |
| 1.7.2.2 Subsistema de análisis..... | 32 |
| 1.7.2.3 Subsistema de gestión..... | 33 |
| 2. Objetivos..... | 36 |
| 3. Influencia del ozono ambiental sobre el cultivo de la patata (<i>Solanum tuberosum L.</i>) cv. Obelix..... | 38 |
| 3.1 Resumen..... | 38 |
| 3.2 Introducción..... | 38 |
| 3.3 Materiales y métodos..... | 40 |
| 3.3.1 Material vegetal..... | 40 |
| 3.3.2 Tratamientos de las cámaras abiertas..... | 41 |
| 3.3.3 Medición de la fluorescencia de la clorofila..... | 42 |
| 3.3.4 Análisis de las enzimas antioxidantes..... | 42 |
| 3.3.5 Peroxidación de lípidos..... | 43 |

| | |
|--|----|
| 3.3.6 Determinación del ascorbato..... | 44 |
| 3.3.7 Análisis estadístico..... | 44 |
| 3.4 Resultados..... | 44 |
| 3.4.1 Calidad del aire..... | 45 |
| 3.4.2 Análisis de la fluorescencia de la Chl a..... | 45 |
| 3.4.3 Cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes..... | 47 |
| 3.4.4 Peroxidación de lípidos..... | 49 |
| 3.4.5 Concentración de ascorbato y dehidroascorbato..... | 49 |
| 3.5 Discusión..... | 50 |

4. Valoración de los efectos del ozono ambiental sobre el crecimiento y desarrollo del *Lycopersicon esculentum* L. cv. Tiny Tim después de aplicar benomilo.....53

| | |
|---|----|
| 4.1 Resumen..... | 53 |
| 4.2 Introducción..... | 54 |
| 4.3 Materiales y métodos..... | 56 |
| 4.3.1 Material planta..... | 56 |
| 4.3.2 Contaminación del aire y las cámaras abiertas..... | 56 |
| 4.3.3 Tratamiento benomilo..... | 57 |
| 4.3.4 Medidas de la fluorescencia de la Chl a..... | 57 |
| 4.3.5 Métodos analíticos de las enzimas antioxidantes..... | 57 |
| 4.3.6 Peroxidación de lípidos..... | 57 |
| 4.4 Resultados..... | 58 |
| 4.4.1 Calidad del aire..... | 58 |
| 4.4.2 Análisis de la fluorescencia de la Chl a..... | 59 |
| 4.4.3 Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes..... | 61 |
| 4.4.4 Peroxidación de lípidos..... | 62 |
| 4.5 Discusión..... | 63 |

5. Efecto del ozono en el cultivo de la lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Candele R7.....66

| | |
|---|----|
| 5.1 Resumen..... | 66 |
| 5.2 Introducción..... | 66 |
| 5.3 Materiales y métodos..... | 68 |
| 5.3.1 Plantas..... | 68 |
| 5.3.2 Tratamientos en las cámaras abiertas..... | 68 |

| | |
|--|----|
| 5.3.3 Medida del intercambio gaseoso..... | 69 |
| 5.3.4 Medición de la fluorescencia de la Chl <i>a</i> | 70 |
| 5.3.5 Determinación del ascorbato..... | 70 |
| 5.3.6 Método analítico de la enzima antioxidante..... | 71 |
| 5.3.7 Peroxidación de lípidos..... | 71 |
| 5.3.8 Análisis estadístico..... | 71 |
| 5.4 Resultados..... | 71 |
| 5.4.1 Calidad del aire..... | 71 |
| 5.4.2 Medición del intercambio gaseoso..... | 73 |
| 5.4.3 Parámetros de la fluorescencia de la Chl <i>a</i> | 74 |
| 5.4.4 Concentración de ascorbato..... | 78 |
| 5.4.5 Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes..... | 79 |
| 5.4.6 Peroxidación de lípidos..... | 80 |
| 5.5 Discusión..... | 80 |

6. Efectos del ozono sobre dos variedades de espinacas cultivadas en cámaras abiertas.....84

| | |
|--|----|
| 6.1 Resumen..... | 84 |
| 6.2 Introducción..... | 84 |
| 6.3 Materiales y métodos..... | 85 |
| 6.3.1 Plantas..... | 85 |
| 6.3.2 Tratamientos en las cámaras abiertas..... | 86 |
| 6.3.3 Medida del intercambio gaseoso..... | 86 |
| 6.3.4 Medición de la fluorescencia de la Chl <i>a</i> | 87 |
| 6.3.5 Determinación del ascorbato..... | 87 |
| 6.3.6 Método analítico de la enzima antioxidante..... | 87 |
| 6.3.7 Peroxidación de lípidos..... | 87 |
| 6.3.8 Análisis estadístico..... | 87 |
| 6.4 Resultados..... | 88 |
| 6.4.1 Calidad del aire..... | 88 |
| 6.4.2 Medición del intercambio gaseoso..... | 88 |
| 6.4.3 Parámetros de la fluorescencia de la Chl <i>a</i> | 89 |
| 6.4.4 Determinación de la concentración de ascorbato endógeno..... | 91 |
| 6.4.5 Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes..... | 92 |
| 6.4.6 Peroxidación de lípidos..... | 93 |
| 6.5 Discusión..... | 94 |

7. Efectos del ozono y abonado de nitrógeno sobre el cultivo de sandía (*Citrullus lanatus* T.) cv. Reina de Corazones.....99

| | |
|--|-----|
| 7.1 Resumen..... | 99 |
| 7.2 Introducción..... | 100 |
| 7.3 Materiales y métodos..... | 101 |
| 7.3.1 Material vegetal..... | 101 |
| 7.3.2 Fertilización nitrogenada..... | 102 |
| 7.3.3 Tratamientos en las cámaras abiertas..... | 102 |
| 7.3.4 Medición de la fluorescencia modulada de la Chl a..... | 103 |
| 7.3.5 Determinación de la peroxidación de lípidos..... | 103 |
| 7.3.6 Determinación del análisis foliar de nitrógeno.... | 103 |
| 7.3.7 Análisis estadístico..... | 104 |
| 7.4 Resultados..... | 104 |
| 7.4.1 Calidad del aire..... | 104 |
| 7.4.2 Parámetros de la fluorescencia de la Chl a..... | 105 |
| 7.4.3 Fotoinhibición..... | 110 |
| 7.4.4 Peroxidación de lípidos..... | 112 |
| 7.4.5 Análisis foliar del nitrógeno total..... | 113 |
| 7.4.6 Producción total de frutos..... | 113 |
| 7.5 Discusión..... | 114 |

8. Estudio del efecto del ozono sobre cuatro variedades de plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivadas en cámaras abiertas.....117

| | |
|---|-----|
| 8.1 Resumen..... | 117 |
| 8.2 Introducción..... | 117 |
| 8.3 Materiales y métodos..... | 119 |
| 8.3.1 Plantas..... | 119 |
| 8.3.2 Tratamientos en las cámaras abiertas..... | 119 |
| 8.3.3 Medición de la fluorescencia de la Chl a..... | 120 |
| 8.3.4 Peroxidación de lípidos..... | 120 |
| 8.3.5. Medición de la longitud de las raíces..... | 120 |
| 8.3.6 Análisis estadístico..... | 120 |
| 8.4 Resultados..... | 121 |
| 8.4.1 Calidad del aire..... | 121 |
| 8.4.2 Parámetros de la fluorescencia de la Chl a..... | 122 |
| 8.4.3 Peroxidación de lípidos y longitud de las raíces. | 124 |
| 8.5 Discusión..... | 125 |

| | |
|---|------------|
| 9. Efectos del ozono sobre el cultivo de la col (<i>Brassica oleracea</i> L.) en cámaras abiertas..... | 128 |
| 9.1 Resumen..... | 128 |
| 9.2. Introducción..... | 128 |
| 9.3 Materiales y métodos..... | 129 |
| 9.3.1 Plantas..... | 129 |
| 9.3.2 Tratamientos en las cámaras abiertas..... | 130 |
| 9.3.3 Medición de la fluorescencia de la Chl <i>a</i> | 130 |
| 9.3.4 Peroxidación de lípidos..... | 130 |
| 9.3.5. Conductividad de solutos..... | 131 |
| 9.3.6 Análisis estadístico..... | 131 |
| 9.4 Resultados..... | 131 |
| 9.4.1 Calidad del aire..... | 131 |
| 9.4.2 Parámetros de la fluorescencia de la Chl <i>a</i> | 132 |
| 9.4.3 Peroxidación de lípidos y conductividad de solutos..... | 135 |
| 9.5 Discusión..... | 136 |
| 10. Conclusiones..... | 139 |
| 11. Bibliografía..... | 142 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| PSII | Fotosistema II |
| PSI | Fotosistema I |
| LHCII | Complejo captador de luz del Fotosistema II |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| NO | Monóxido de nitrógeno |
| NO ₂ | Dióxido de nitrógeno |
| SO ₂ | Dióxido de azufre |
| O ₃ | Ozono |
| PVP | Polivinil pirrolidona |
| Rubisco | Ribulosa bifosfato carboxilasa/oxigenasa |
| Q _A | Quinona A |
| Q _B | Quinona B |
| ATP | Adenosina tri fosfato |
| NADP | Fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina |
| Chl | Clorofila |
| VDE | Violaxantina deepoxidasa |
| Ant | Anteroxantina |
| Zea | Zeaxantina |
| Vio | Violaxantina |
| AsA | Ascorbato |
| DHA | Dehidroascorbato |
| MDHA | Monodehidroascorbato |
| MDHAR | Monodehidroascorbato reductasa |
| DHAR | Dehidroascorbato reductasa |
| TAA | Ascorbato total |
| GSH | Glutation reducido |
| GSSG | Glutation oxidado |
| AP | Ascorbato peroxidasa |
| GR | Glutation reductasa |
| POD | Peroxidasa |
| CAT | Catalasa |
| SOD | Superóxido dismutasa |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| OH· | Radical hidroxilo |
| O ⁻ | Oxígeno singlete |
| DW | Peso seco |
| FW | Peso fresco |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetraacético |
| MDA | Malondialdehydo |

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| AOS | Especies de oxígeno activo |
| ROS | Especies de oxígeno reactivo |
| UV | Ultravioleta |
| R.S | Radiación solar |
| A_{max} | Fotosíntesis neta |
| G_w | Conductancia estomática |
| E | Tasa de transpiración |
| C_i | Concentración de CO_2 intercelular |
| SH | Grupo sulfidrilo |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es el único proceso de importancia biológica que puede absorber y almacenar la energía solar a través de las plantas, algas y bacteria fotosintéticas y transformarla en energía química. En el proceso de la fotosíntesis, las plantas usan la energía solar para oxidar el agua, y de este modo liberan oxígeno, y reducen el dióxido de carbono en los componentes orgánicos, principalmente en azúcares, a través de reacciones complejas. Los productos finales de la fotosíntesis son ATP y NADPH de alta energía y poder reductor los cuales son utilizados en las reacciones de fijación del carbono. Por tanto, el término fotosíntesis significa literalmente síntesis del uso de la luz.

La luz es principalmente absorbida en los complejos de la antena, los cuales están constituidos por clorofilas, pigmentos accesorios y proteínas que se encuentran localizadas en las membranas tilacoidales del cloroplasto. Las moléculas de clorofilas excitadas pueden disponer de la energía como calor, fluorescencia, transferencia de energía, o fotoquímica. La energía de los pigmentos que han sido excitados, puede ser transferida a un pigmento adyacente, y de este a otro pigmento más, por resonancia inductiva hasta que la energía llega a especializados complejos proteicos de la clorofila conocidos como centros de reacción. Los centros de reacción contienen múltiples subunidades de complejos proteicos y cientos o, en algunos organismos millares de moléculas de clorofilas. El complejo de la antena y los centros de reacción son componentes integrales de la membrana del tilacoide.

Las plantas y algunos procariontes fotosintéticos tienen dos centros de reacción, denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII), que funcionan en serie. El PSII se encuentra ubicado en las membranas granas apiladas y el PSI se localiza exclusivamente en las membranas del estroma no apiladas. Los centros de reacción del PSI absorben a una λ máxima de 700 nm, y el PSII desde 680 nm. La energía de la luz absorbida es usada para poder transportar los electrones por una serie de componentes que actúan como donadores y aceptores de electrones. La plastoquinona y la plastocianina son transportadores de movilidad que conectan ambos fotosistemas. Entre el PSI y PSII se lleva a cabo el transporte no

cíclico de electrones, oxidando el agua a oxígeno molecular y reduciendo NADP^+ a NADPH .

Una fracción de la energía es inicialmente almacenada como energía potencial química, en gran parte en la forma de ΔpH , a través de la membrana tilacoidal. Esta energía es rápidamente convertida en energía química durante la formación del ATP por la acción de un complejo enzimático conocido como ATP sintasa. La fosforilación del ADP por el ATP sintasa se realiza a través de un mecanismo quimiosmótico. Este gradiente de protones es el responsable de la síntesis del ATP con una estequiometría de cuatro H^+ por ATP. El NADPH y el ATP formado en la fotosíntesis suministran la energía y el poder reductor necesarios para la reducción del carbón.

1.2 LA FLUORESCENCIA DE LA CLOROFILA (Chl a)

Los recientes progresos en las técnicas de la medición de la fluorescencia de la Chl a mediante la aplicación de pulsos saturantes y de luz modulada ha permitido la realización de importantes logros en la investigación sobre el funcionamiento del aparato fotosintético, ya que, con los datos obtenidos por esta técnica se suministra información acerca de la relación fotosintética y permite localizar las perturbaciones de los procesos fotosintéticos. La fluorescencia de la Chl a es usada rutinariamente en estudios de laboratorio y campo (ver fotos al final del capítulo) como un método no intrusivo, y una herramienta relativamente simple para medir la eficiencia y cinética de los procesos fotosintéticos que implica al PSII. El daño al PSII es a menudo la primera manifestación de estrés.

La fluorescencia es la emisión de luz roja que acompaña a la rápida disminución en la energía de los electrones de las Chls, cuando pasan del estado singlete excitado al estado basal. El estudio de las emisiones de la fluorescencia es fundamental porque reflejan las propiedades de las moléculas de clorofilas y su ambiente y puede ser utilizada como indicadora del transporte de electrones y de los procesos fisiológicos asociados. El principio fundamental del análisis de la fluorescencia de la clorofila es relativamente sencillo, la mayor parte de la luz es absorbida por los pigmentos fotosintéticos, clorofilas y carotenoides, y es utilizada en los procesos fotosintéticos. En

condiciones fisiológicas óptimas, alrededor del 80 al 90 % de la absorción de la energía de la luz es disipada desde la Chl *a* excitada vía la conversión cuántica fotosintética, mientras la emisión en forma de calor por la deexcitación es del 5 al 15% y la emisión de la fluorescencia en el rojo y rojo lejano del 0.5 al 2 % (Fig. 1. 1A). Bajo condiciones de estrés, la conversión cuántica fotosintética disminuye y la emisión de calor y la fluorescencia se incrementan considerablemente (Fig.1. 1B) (Lichtenthaler, 1986).



Figura. 1.1: Deexcitación de los estados excitados de la Chl *a* mediante la conversión cuántica fotosintética (fotosíntesis), la emisión en forma de calor y fluorescencia en el rojo y rojo lejano A) Bajo condiciones fisiológicas óptimas y B) Bajo condiciones de estrés. Las flechas gruesas indican las proporciones relativas de los tres procesos de deexcitación. (Ref. Lichtenthaler, 1986).

La fluorescencia de la Chl *a* es emitida fundamentalmente por las Chls de la antena del PSII a temperatura ambiente (Krause y Weiss, 1988, 1991; Schreiber y Bilger 1993; Govindjee et al., 1993; Schreiber et al., 1995; Björkman y Demmig-Adams, 1995; Lichtenthaler y Miede, 1997), y el principal factor que determina la emisión de la fluorescencia de la Chl *a* es el estado redox del primer aceptor estable de electrones del PSII, Q_A (quinona A) (Schreiber et al., 1978).

La interpretación de la curva de la inducción de la fluorescencia (Fig. 1.2) en términos de los procesos de la fotosíntesis, explica los cambios que ocurren en el PSII. La fluorescencia mínima (F_0) de una hoja adaptada a la oscuridad, se obtiene después de la iluminación de la hoja con una luz tenue para que no tenga un efecto fotoquímico,

y se observa un aumento inicial de la fluorescencia, esta acción se origina en las clorofilas de las antenas del PSII. Esta fluorescencia se produce antes que los excitones sean transferidos a los centros de reacción. En el nivel 0 (Fig. 1.2), todos los centros de reacción de las clorofilas están abiertos (oxidados) para aceptar los electrones y el pool de las Q_A están en un estado oxidado. Los niveles de (F_o) disminuyen a bajas temperaturas (Adams y Perkins, 1993) y se incrementa a límites de temperaturas altas (Havaux et al., 1988). El incremento de F_o , indica daño fotoinhibitorio en respuesta a los diferentes estreses (Gamon y Pearcy, 1989).

Seguidamente se aplica un pulso de luz saturante a la hoja, como consecuencia, la fluorescencia aumenta en fracción de segundos, los centros de reacción de las clorofilas son excitados, esto representa la total reducción de las Q_A , en esta etapa los electrones son transferidos de la Q_A reducida a la Q_B y la emisión de la fluorescencia en estas circunstancias se denomina fluorescencia máxima (F_m) de una muestra adaptada a la oscuridad (Krause y Weiss, 1991). La probabilidad de disipación de la energía de excitación desde la Chl a es más alto en esta etapa.

La fluorescencia variable (F_v), es la diferencia entre la fluorescencia máxima y la fluorescencia mínima. El cociente $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$, es uno de los componentes de la atenuación fotoquímica de una muestra adaptada a la oscuridad, que refleja el rendimiento cuántico máximo del PSII y es usado como un indicador sensible del funcionamiento fotosintético, con valores óptimos alrededor de 0.80, aunque dicho valor depende de muchos factores como especie, variedad y edad de la planta entre otras causas (Björkman y Demmig, 1987; Krause y Weiss, 1991; Mohammed et al., 1995; Schreiber et al., 1995).

Posteriormente se aplican pulsos saturantes de luz actínica (blanca) que permiten obtener la fluorescencia máxima en la luz (F_m'), con los centros de reacción totalmente cerrados (reducidos); en estas circunstancias la iluminación de la muestra con luz roja lejana, permite reoxidar a la Q_A y obtener el rendimiento de la fluorescencia mínima en la luz (F_o') (Schreiber y Bilger, 1993), y el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila durante la iluminación actínica para cualquier tiempo, denominado F_s . La tasa de la fluorescencia

experimenta cambios a lo largo del periodo de la iluminación hasta alcanzar el estado estacionario (Krause y Weiss, 1991; Schreiber et al, 1995). F_s , varía a lo largo del tiempo debido, a la atenuación de la fluorescencia de la Chl a desde un punto máximo (F_m) hasta el estado estacionario.

El análisis de la atenuación de la fluorescencia a lo largo del tiempo tienen un valor de diagnóstico considerable porque ayuda a interpretar los mecanismos que subyacen en el PSII. Diversos mecanismos se atribuyen a la atenuación de la fluorescencia, pero principalmente se debe a la atenuación fotoquímica y atenuación no-fotoquímica (Krause y Weiss, 1991). **La atenuación fotoquímica (q_p)** (Gilmore, 1997) se produce como resultado de la conversión de la energía luminosa en energía química para su utilización en la fotosíntesis. El parámetro q_p indica la fracción de centros de reacción abiertos del PSII, que capturan los excitones y que luego son convertidos en energía química y es calculado como $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ (Schreiber et al., 1986). El parámetro q_p normalmente tiende a disminuir cuando se produce un estrés, los valores de q_p en la técnica de la fluorescencia modulada van desde 1 (máxima oxidación del pool de Q_A) hasta 0 (mínima oxidación del pool de Q_A). Una expresión alternativa es $1 - q_p$, que indica la fracción de centros de reacción que están cerrados, llamado "presión de excitación" del PSII (Maxwell et al., 1994). La eficiencia cuántica actual del PSII, ϕ_{PSII} , esta estrechamente relacionada con el rendimiento cuántico del transporte no-cíclico de electrones, y es estimada como $(F_m' - F_s)/F_m'$. Un parámetro relacionado con el ϕ_{PSII} y q_p , es él, ϕ_{exc} , ó eficiencia intrínseca en la captura de excitones del PSII, (F_v'/F_m') (Genty et al., 1989).

Otra forma de atenuación de la fluorescencia no relacionada con la utilización de la energía luminosa en la fotosíntesis, se denomina **atenuación no-fotoquímica, q_N o NPQ**. El parámetro NPQ $(F_m - F_m')/F_m'$, está relacionado con la disipación en forma de calor y su valor oscila en una escala de 0-infinito. En una planta, los valores pueden ser esperados en un rango de 0.5-3.5 dependiendo de la intensidad de la luz. Para conocer el significado fisiológico de la atenuación no-fotoquímica es necesario comprender los procesos que contribuyen a su atenuación. Cualquier cambio en NPQ refleja un cambio en la eficiencia de la disipación del calor, lo cual implica varios procesos que tienen diferentes tiempos de relajación desde unos

pocos minutos a varias horas. La relajación de la cinética de estos procesos diferentes, puede por lo tanto, ser usadas para distinguirlos a ellos. Típicamente, la atenuación no-fotoquímica inicialmente se incrementa con el inicio del daño del estrés y eventualmente declina cuando el estrés es severo. Los procesos que contribuyen a la formación de NPQ son:

A. La atenuación dependiente de la energía (qE), es el principal mecanismo responsable de la protección del aparato fotosintético a corto plazo (Krause y Weiss, 1991; Horton et al., 1994; Demmig-Adams et al., 1996; Demmig-Adams, 1988), ya que responde rápidamente a cambios en la intensidad luminosa (Demmig-Adams, 1998). El parámetro qE depende de la acidificación del lumen, ocasionado por el transporte de protones a través de la membrana (Walters y Horton, 1991; Park et al., 1996) y de la actividad del ciclo de las xantofilas (Krause y Weiss, 1991; Pfündel y Bilger, 1994; Demmig-Adams et al., 1998). El lugar donde se produce la atenuación de qE no es claro, si bien se postula que ocurre en el centro de reacción o bien en el complejo captador de luz (Ruban et al., 1993; Walters y Horton, 1993; Briantais, 1994), se acepta que qE refleja la emisión de la energía absorbida en forma de calor en la antena. Este proceso disipa la energía de excitación antes de que alcance los centros de reacción del PSII y, por tanto, protege de un posible daño a los fotosistemas.

B. Atenuación del estado de transición (qT), se encuentra regulada por la fosforilación de los complejos captadores de luz, que provoca la disociación del PSII y la transferencia de su energía al PSI, se acepta que su función este relacionada con la distribución de la energía entre los dos fotosistemas (Fork y Satoh 1986; Walters y Horton 1991); a bajas intensidades de luz solar su contribución a qN es muy pequeña.

C. Atenuación relacionada con la fotoinhibición qI , es una forma lentamente reversible de la atenuación de la fluorescencia asociada con el daño fotoinhibitorio. El parámetro qI aumenta su contribución al total de qN cuando se excede la capacidad protectora que le confiere qE (Van Wicjk y Hasselt 1993; Thiele et al., 1996), al proceso de atenuación se encuentran implicadas la producción de la zeaxantina y la degradación de la proteína D1 del centro de reacción (Krause y Weiss, 1991; Björkman y Demmig-Adams, 1995), este proceso

disminuye el rendimiento cuántico del PSII (Öquist et al., 1992; Anderson et al., 1993). Posiblemente existan otros mecanismos en la disipación del excitón pero su participación es poco conocida (Krause y Weiss, 1991).

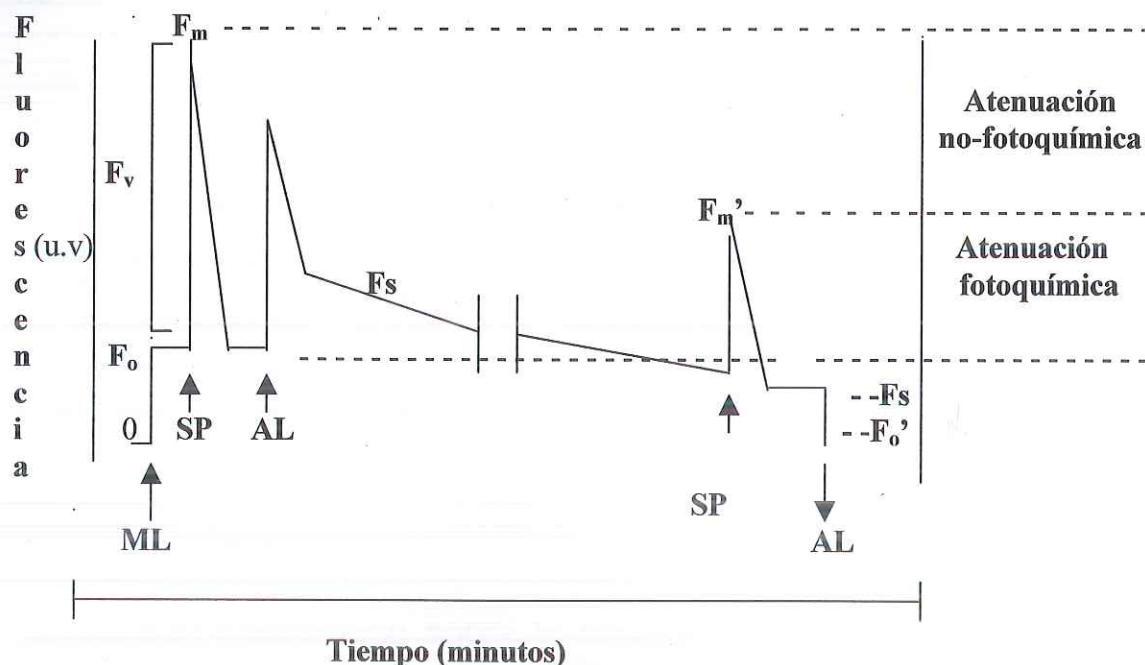


Figura: 1.2. Secuencia de una señal típica de la fluorescencia modulada de la (Chl a). Una muestra vegetal adaptada a la oscuridad es iluminada (\uparrow ML) con una radiación lo suficiente baja para que no tenga efecto fotoquímico y de esta manera se determina el nivel de la fluorescencia mínima (F_0). La aplicación de un pulso de luz saturante (\uparrow SP), permite la medición del nivel de la fluorescencia máxima (F_m). Seguidamente se ilumina con luz actínica (\uparrow AL), después de un periodo de tiempo se aplica un pulso de luz saturante (\uparrow SP), el cual permite obtener la fluorescencia máxima de la muestra en la luz (F_m'). El nivel de la fluorescencia en un tiempo determinado es F_s . Después de un pulso saturante, la luz actínica (\downarrow AL) se apaga y se enciende la luz roja lejana, permitiendo calcular el nivel basal de la fluorescencia (F_0') en la luz. A partir de estos valores se obtienen los parámetros de la atenuación de la fluorescencia.

Existen otros parámetros obtenidos a partir de las señales de la fluorescencia que proporcionan información sobre el estado del PSII que relaciona la atenuación fotoquímica y la no-fotoquímica. El cociente $(1-q_p)/NPQ$, es utilizado para estimar el exceso de fotones y, por tanto, la susceptibilidad del PSII a la mayor irradiación (Park et al., 1995). La fracción de la luz absorbida que es disipada en la antena del PSII (%D) y la utilizada en la fotoquímica del PSII (%P) es estimada como $1-(F_v'/F_m')$ x 100 y $(F_v'/F_m')q_p$ x 100 respectivamente

(Demmig-Adams et al., 1996). La fracción de luz absorbida que no es usada en la fotoquímica ni disipada en la antena del PSII (%X) es estimada como $(F_v'/F_m')(1-q_p) \times 100$ (Demmig-Adams et al., 1996). Otro parámetro de especial relevancia obtenido en la técnica de la fluorescencia modulada de la Chl *a* es el cociente de la disminución de la fluorescencia (F_d) (desde F_m a F_s) al estado estable de la fluorescencia F_s ($R_{fd} = F_d/F_s$), es un indicador de la conversión cuántica fotosintética potencial o índice de vitalidad (Lichtenthaler y Buschmann, 1987. Valores de R_{fd} de 2.5 o más altos indican buena actividad fotosintética (Rinderle y Lichtenthaler, 1988), mientras que valores debajo de 1.0 implican que la asimilación neta del dióxido de carbono está alterada (Haitz y Lichtenthaler, 1988). El valor de R_{fd} es usado para reflejar entre otros estudios, las diferencias entre plantas de sol y sombra, variaciones estacionales, efectos de las altas temperaturas, efectos del estrés hídrico, deficiencia de nutrientes y daño por contaminación ambiental (Bolhar-Nordenkampf y Lechner 1988a, b; Mohammed et al., 1995).

Las características de la cinética de la fluorescencia de la Chl suministran información sobre la eficiencia de la fotosíntesis y sus parámetros son ampliamente utilizadas en los estudios sobre los efectos del estrés ambiental. El conocimiento de las variaciones en las características de la fluorescencia en plantas que crecen bajo diferentes condiciones fisiológicas es de considerable importancia. Esta técnica se ha aplicado en todo tipo de plantas vasculares, líquenes, briófitos, etc. (Mohammed et al., 1995; Genty et al., 1989; Bilger et al., 1995; White y Crichtley 1999).

A través de las técnicas de la medición de la fluorescencia de la Chl *a* se han realizado muchos trabajos de investigación; entre estos podemos citar: los estudios de diversos estreses abióticos (Neurer y Buchner, 1999) y bióticos (Balachandran et al., 1997), estudios del efecto del calor (Ilík et al., 1995; Larcher et al., 1997), del frío (Bolhar-Nordenkampf y Lechner, 1988b; Sonoike, 1998, 1999), el estrés hídrico (Lichtenthaler y Rinderle, 1988a; Eatsman y Camm, 1995; Lang et al., 1996; Figueroa et al., 1997; Calatayud et al., 1997; Düring, 1998; Deltoro, 1999), el estrés lumínico causante de la fotoinhibición (Demmig et al., 1987; Lichtenthaler y Rinderle, 1988b), el efecto de los contaminantes atmosféricos, de herbicidas o de deficiencias nutricionales (ver Lichtenthaler y Rinderle, 1988b; Calatayud y Barreno 2000, 2001), en la descripción de respuestas

fisiológicas en condiciones naturales entre plantas adaptadas a la luz y a la sombra (Lichtenthaler y Rinderle, 1988b; Schreiber et al., 1996; Valladares y Pearcy, 1997), respuestas del PSII a cambios diarios y estacionales (Björkman y Demmig-Adams, 1995; Bilger et al., 1995), para valorar los daños fisiológicos de frutas y vegetales durante el almacenamiento en la post-cosecha (DeEll y Toivonen, 1999), etc., entre otros muchos procesos.

Tabla 1.1. Parámetros más comunes obtenidos mediante la técnica de la fluorescencia modulada de la Chl *a*.

A. Parámetros de la fluorescencia de una muestra adaptada a la oscuridad

.....

F_o : Fluorescencia mínima o basal en la oscuridad

F_m : Fluorescencia máxima en la oscuridad

F_v : Fluorescencia variable $F_v = F_m - F_o$

F_v/F_m : Rendimiento cuántico máximo del PSII $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$

B. Parámetros de la fluorescencia de una muestra en la luz

.....

F_o' : Fluorescencia basal en la luz después de iluminar con luz roja lejana

F_m' : Fluorescencia máxima en la luz

F_s : Rendimiento de la fluorescencia de la clorofila durante la iluminación actínica

F_d : Cociente de la disminución de la fluorescencia desde F_m al estado estable de la fluorescencia, F_s ($Rfd = (F_m - F_s)/F_s$) y es un indicador de la conversión cuántica fotosintética potencial o índice de vitalidad

ϕ_{PSII} : Rendimiento cuántico actual o eficiencia fotoquímica actual del PSII asociado al transporte no-cíclico de electrones = $(F_m' - F_s)/F_m'$

ϕ_{exc} : Eficiencia intrínseca en la captura de excitones del PSII = F_v'/F_m'

q_p : Coeficiente de la atenuación fotoquímica (estado de oxidación de la Q_a) = $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$

$1 - q_p$: Estado de reducción de la Q_A , o presión de excitación

NPQ: Coeficiente de la atenuación no-fotoquímica = $(F_m - F_m')/F_m'$

$(1 - q_p)/NPQ$: Exceso de fotones absorbidos

(%P): Fracción de luz absorbida usada en la fotoquímica = $(F_v'/F_m') q_p \times 100$

(%D): Fracción de luz disipada en la antena = $1 - (F_v'/F_m') \times 100$

(%X): Fracción de exceso de luz que no es disipada en la antena ni utilizada en la fotosíntesis = $(F_v'/F_m')(1 - q_p) \times 100$

1.3 FOTOINHIBICIÓN

La fotoinhibición es la inhibición total o parcial de la fotosíntesis causadas por altas intensidades de luz (Kok, 1956). Las características de la fotoinhibición dependen de la irradiancia a la cual la planta está expuesta y de su estado fisiológico. Cuando el exceso de luz es moderado, la eficiencia cuántica disminuye, pero la relación máxima fotosintética no cambia. Esta disminución en la eficiencia cuántica es a menudo transitoria y puede volver a los valores más altos cuando la irradiancia disminuye. Este tipo de respuesta fotoinhibitoria es llamado fotoinhibición dinámica (Osmond, 1994), en la cual los centros de reacción son transformados en centros inactivos fotoquímicamente, pero con capacidad para absorber y disipar la energía y sin ninguna degradación de la proteína D1, la fotoinhibición está acompañada por cambios biofísicos tal como la atenuación de la fluorescencia y el incremento de la emisión de calor. Estos cambios son reversibles y son considerados procesos regulatorios de la disipación de la energía que suministra protección a los centros de reacción del PSII. La disipación térmica de la energía de excitación no radiativa (NPQ) es probablemente uno de los mecanismos de protección contra el estrés de las altas intensidades

de luz (Fork et al., 1986; Krause y Weiss, 1991; Demmig-Adams y Adams, 1993).

Por otra parte, bajo condiciones de estrés una exposición a niveles altos de luz conduce a la fotoinhibición crónica (Osmond, 1994). Los centros inactivos pueden interaccionar con el oxígeno y generar oxígeno singlete que es dañino (Vas et al., 1992) y provocar daños irreversibles en el centro de reacción (Macpherson et al., 1993; Telfer et al., 1994; Horton et al., 1996), como consecuencia de esta inhibición, la proteína D1 de los centros de reacción del PSII es degradada (Kyle et al., 1984; Prasil et al., 1992; Rintamäki et al., 1995). El daño a los centros de reacción es una consecuencia inevitable de su funcionamiento y tiene lugar normalmente, a pesar de todas las estrategias fotoprotectoras empleadas por los vegetales (Anderson et al., 1997). El daño fotoinhibitorio puede ser intensificado por la adición de factores de estrés tal como las temperaturas bajas (Öquist et al., 1987; Somersalo, 1990) o temperaturas altas (Ludlow, 1987), sequía (Björkman y Powles, 1984), deficiencia de nutrientes (Prezelin et al., 1986), o contaminación atmosférica (Pell et al., 1997).

La fotoinhibición ocurre en el ámbito de los tilacoides, particularmente a nivel del PSII (Kyle et al., 1984; Cleland et al., 1986; Critchley, 1988; Eckert et al., 1991). La fotoinhibición es atribuida principalmente a la reducción de la eficiencia fotoquímica del PSII (Powles, 1984; Critchley, 1988; Aro et al., 1993; Long et al., 1994), y se manifiesta como una disminución en el desprendimiento del oxígeno o consumo de CO₂ (Krause, 1988), una disminución en el rendimiento cuántico y en la relación máxima fotosintética (Kok, 1956; Leverenz et al., 1990).

La restauración de la actividad óptima requiere de la síntesis de la proteína D1 para lo cual las plantas tienen la capacidad de reemplazar los centros de reacción dañados durante la iluminación y, de este modo evitan su acumulación, este proceso es un factor importante en la susceptibilidad a la fotoinhibición (Tyystjärvi et al., 1992; Park et al., 1995). Los centros dañados son reemplazados por centros de nueva síntesis, permitiendo la reactivación de los centros de reacción del PSII, mediante la renovación de un simple polipéptido (Demmig-Adams et al., 1992). La recuperación de la fotosíntesis es estimulada por la disminución de la intensidad de la luz (Greer et al.,

1986, Skogen et al., 1986). Si las plantas fotoinhibidas son transferidas a bajos niveles de irradiancia o oscuridad, la fotosíntesis se recupera (Greer et al., 1986; Skogen et al., 1986). El descenso de la fotosíntesis inducida por la fotoinhibición conduce a una menor tasa de crecimiento vegetativo en las plantas (Laing et al., 1995), como consecuencia resultará en una reducción de la producción neta (Ögren y Sjöstrom, 1990).

1.4 EFECTO DEL OZONO SOBRE LAS PLANTAS VASCULARES

El ozono es un contaminante atmosférico secundario que se produce por las reacciones fotoquímicas entre los óxidos de nitrógeno, hidrocarburos volátiles y el oxígeno (Seinfeld, 1989). La producción de ozono se debe, de modo simplificado, a una reacción que implica un equilibrio entre el NO_2 y el NO , en el cual es necesario la presencia de una elevada radiación solar. Por otra parte, la concentración de ozono disminuye debido a la presencia de concentraciones importantes de monóxido de nitrógeno y un ambiente de baja radiación solar. La ecuación predice de modo simplificado los cambios en los niveles de ozono entre las condiciones de un día soleado y de la noche (Sillman, 1998):



El ozono penetra en el interior de la hoja a través de las estomas y se difunde dentro de la matriz acuosa del apoplasto, y reaccionan con los componentes de la pared celular donde rápidamente se forman radicales hidroxil y anión superóxido, peróxido de hidrógeno y otras especies de radicales libres (ROS), los cuales tienen altos potenciales de oxidación (Heath y Taylor, 1997). La reacción directa del O_3 con los lípidos de la membrana produce el fenómeno de la ozonólisis afectando a la permeabilidad de las membranas. Esta acción ozonolítica se manifiesta por la presencia de metil-etil (hidroxi)-hidroperóxido en los tejidos de las plantas (Hewitt et al., 1990).

El ozono también reacciona indirectamente con los componentes lipídicos de la membrana a través de la formación de radicales libres y la posterior peroxidación de lípidos (Halliwell, 1982). La peroxidación de lípidos es iniciada con la formación de radical hidroxil, que se combina con otras reacciones para formar radical peroxil e hidroperóxidos (LOOH) (Gutteridge y Halliwell 1990). Tanto la ozonólisis como la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados produce malondialdehído (MDA), compuesto que puede ser determinado a través del método del ácido thiobarbitúrico. Ranieri et al., (1996), demostró que la peroxidación de lípidos tras la exposición de O₃ (incremento en las concentraciones de malondialdehído), refleja las modificaciones en la membrana plasmática y es posible que las especies de oxígeno generado durante la peroxidación de lípidos podrían estar asociados al desarrollo de lesiones y muerte de las células.

Otras investigaciones, indican que el O₃ (Dominy y Heath, 1985) altera el flujo de protones en las membranas y que la actividad ATPasa de la membrana plasmática puede ser severamente inhibida, así como una reducción de la eficiencia del transporte de electrones dificulta la síntesis de NADPH (Robinson y Wellburn, 1983; Heath, 1987a, 1988, 1994; Ranieri et al., 1997).

La emisión foliar del etileno es un efecto temprano asociado con la exposición de ozono (Tingey et al., 1976). La cantidad de daños visibles causados por el ozono se correlacionan con la producción de etileno, y diversos investigadores han propuesto que el etileno reacciona no enzimáticamente con el O₃ para producir O₂⁻ que son los responsables del daño a las plantas (Elstner et al., 1985; Mehlhorn y Wellburn, 1987). El ozono también induce la senescencia foliar prematura en especie anuales y perennes (Stow et al., 1992; Temple et al., 1993) y una desviación del contenido de nitrógeno foliar desde las hojas viejas hasta las jóvenes asociado a una pérdida del enzima RuBisCO (Dann y Pell, 1989; Pell et al., 1992, 1994; Krupa et al., 1995; Pell et al., 1997), así como modificaciones en el cociente tallo/raíz, que tiende a aumentar tras las fumigaciones con ozono, debido a una translocación de los elementos minerales, sobre todo carbono y nitrógeno desde la raíz a las partes aéreas de la planta (Miller, 1987; Pell et al., 1994; Bennett y Runeckles, 1977a). Como consecuencia de las altas concentraciones de ozono, se produce la inhibición de la fotosíntesis, inhibición del transporte de electrones

entre los fotosistemas, daño en el lugar de fijación del CO₂, y daño en el sistema de los pigmentos de las clorofilas (Coulson y Heath, 1974; Ting y Sutton, 1975; Schreiber et al., 1978; Darral, 1989; Heath, 1994; Krupa et al., 1995), causando pérdidas significativas en una amplia variedad de plantas (Heck et al., 1983).

1.5 EFECTO DEL OZONO SOBRE LAS PLANTAS AGRÍCOLAS

Existe un gran número de publicaciones científicas que confirman los daños por ozono en los cultivos agrícolas, así Feder y Campbell (1968), indicaron que los claveles expuestos continuamente, por un periodo de dos meses, a niveles de ozono comprendido entre 50 y 100 ppb, representaron una disminución significativa del número de flores, así como una disminución de la longitud del pedúnculo. Amundson et al., (1987), manifestaron que los efectos producidos por el O₃ sobre el trigo de invierno aceleran la senescencia de las hojas banderas, disminuye la fotosíntesis neta, el número de espigas, así como el peso seco por espiga como consecuencia de la reducción del tamaño de la semilla, aunque no del número de semillas. La reducción del peso de semillas se correlacionó con la reducción de la fotosíntesis.

En el cultivo de las judías (Blum y Heck, 1980), indicaron que los efectos de las exposiciones agudas reduce la tasa de crecimiento, la producción de vainas, la producción de nódulos y el contenido total de nitrógeno, variando en función de las concentraciones de ozono, tiempo de exposición y edad de las plantas. En el cultivo de habas (Agrawal et al., 1985), se encontró que los efectos del ozono se traducen en un incremento de la tasa de transpiración y una disminución en el contenido de las clorofilas, carotenoides, almidón, ácido ascórbico y proteínas en las hojas. La absorción de nutrientes se ve reducida y aparecen síntomas de daños visibles en las hojas. Finalmente, todo ello se traduce en una reducción del crecimiento de las raíces y tallos, biomasa y de la cosecha.

Ashmore et al., (1978), realizó un trabajo con plantas de tabaco variedad "Bel-W3", extremadamente sensible al ozono, mostrando claros síntomas de daño sobre las hojas a partir de 40-50 ppb, los daños eran mucho más grandes en las áreas donde recibía mayor

irradiación solar. En el cultivo de la zanahoria (Bennet y Oshima, 1976), se encontró que el peso seco de las hojas no resultaba afectado aunque sí lo hacía el peso seco de la raíz, con una pérdida de 1.5 g de tejido de raíz por cada gramo de peso seco de hoja clorótica. Bennet et al., (1979), sometieron plantas de pimiento, de forma intermitente a concentraciones de 120 y 200 ppb de O_3 , obteniéndose unas plantas más altas que tenían más hojas, aunque algunas cloróticas, que las plantas sometidas a condiciones de aire filtrado. La producción final de los frutos recogidos en las plantas sometidas al ambiente con ozono representó una disminución del 54% en materia seca, frente a los obtenidos en ambientes de aire filtrado.

Jhonsson y Dahlkvist, (1980), indican que durante la exposición al ozono en el cultivo de espinaca, los síntomas se presentan como una necrosis blanca sobre las hojas; en soja (Pratt y Krupa, 1981) se correlaciona con una reducción en la concentración de la clorofila, mientras que en patata (Pell et al., 1980) se traduce en una disminución significativa del número y peso de tubérculos por planta. La reducción de los rendimientos de los cultivos puede ser un resultado del declive en la relación fotosintética neta, el cual se correlaciona en patata con una pérdida de la rubisco (Pell et al., 1994). Oshima et al., (1975), reportan que los efectos de ozono sobre las plantas de tomate causó daños a las hojas, defoliación y reducción de la biomasa de la planta. La reducción del rendimiento fue atribuida al menor del número de frutos y no a su peso.

1.6 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

La toxicidad de ozono debe principalmente a su potencial de oxidación y a la posterior formación de radicales y especies de oxígeno reactivo (Heath, 1980), como la producción de radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxil (OH^\cdot), oxígeno singlete (1O_2) y otros radicales libres que son extremadamente reactivos (Heath, 1979; Peleg, 1976, Bowler et al., 1992; Scandalios, 1993; Alscher y Hess, 1993; Foyer y Milleneaux, 1994; Dangl et al., 1996). Estas especies de oxígeno reactivo, también se producen de forma natural en el metabolismo de las plantas y animales (Halliwell y Gutteridge, 1985), y son eliminados por las enzimas y metabolitos antioxidantes.

Para contrarrestar la toxicidad de estas especies de oxígeno, las plantas disponen de un sistema de protección altamente eficaz, que incluyen a las enzimas tales como el superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (AP), glutathion reductasa (GR), monodehidroascorbato reductasa (MDHA), dehidroascorbato reductasa (DHAR) (Fig. 1.5), y los metabolitos antioxidantes, constituidos por el ascorbato (vitamina C) y glutathion (Fig. 1.3 y Fig.1.4), y α -tocoferol (vitamina E), entre otros. Tanto las enzimas como los metabolitos antioxidantes se encuentran presentes en los cloroplastos así como en el resto de los compartimentos celulares.

1.6.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

1.6.1.1 ASCORBATO

El ácido L-Ascórbico es un antioxidante que se encuentra presente en los organismos fotosintéticos incluidas las algas y briófitos. Las concentraciones de ascorbato (AsA) en las plantas son muy variables, encontrándose elevadas concentraciones (mM) en tejidos que crecen rápidamente, hojas y otros órganos de reserva (Mapson, 1970). El cloroplasto contiene entre el 20 y el 40% de AsA, presente en el mesófilo, el remanente se localiza en el citosol, vacuolas y membranas (Anderson et al., 1983a; Beck et al., 1983; Rautenkranz et al., 1994). Las elevadas concentraciones encontradas en el cloroplasto, hasta 50 mM en espinaca, probablemente, se deben a la relevante función de esta sustancia en la fotosíntesis (Foyer y Lelandais, 1993). En condiciones normales el pool de ascorbato reducido alcanza alrededor del 90 % (Foyer, 1993). Las células de las plantas consumen activamente AsA en diversos procesos:

(i) tienen un papel importante como metabolito tanto en los ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos del cloroplasto (Foyer y Lelandais, 1993). El ascorbato reacciona rápidamente con el superóxido, oxígeno singlete, radical hidroxilo, peróxido de hidrógeno y de esta manera participa en la eliminación de las especies de oxígeno activo (AOS) (Asada, 1994), su función en la detoxificación del H_2O_2 asegura el funcionamiento ininterrumpido de la asimilación

del carbono fotosintético (Nakano y Asada, 1980, 1981; Anderson et al., 1983a, b; Halliwell, 1987, Asada, 1994), adicionalmente el AsA, es también esencial para regenerar el ciclo del α -tocoferol, un antioxidante liposoluble que protege la membrana contra el daño oxidativo (Finckh y Kunert, 1985; Foyer, 1992a);

(ii) en la hidroxilación de residuos de la prolina en las cadenas de los polipéptidos (Arrigoni 1994);

(iii) En la disipación de la energía solar en forma de calor. Cuando la clorofila absorbe más luz de la que pueda ser utilizada en la fotosíntesis se establece un gradiente de pH mayor en el lumen tilacoidal, la que provoca su acidificación. La acidificación del tilacoide provoca la de-epoxidación de violaxantina (Vio) a zeaxantina (Zea), por la acción de la violaxantina deepoxidasa (VDE). La VDE es un enzima soluble en el agua que se localiza en el lumen tilacoidal (Hager, 1969). Su actividad se encuentra controlada por la acidificación del lumen y la disponibilidad de ascorbato (Neubauer y Yamamoto, 1994; Bratt et al., 1995; Foyer y Lelandais, 1996). Existen evidencias sustanciales que las xantofilas de-epoxidadas (Zea) están asociadas con el incremento en la disipación de la energía no radiativa (NPQ) y en la disminución en la eficiencia fotoquímica del PSII bajo condiciones de estrés (Horton et al., 1991; Demmig-Adams y Adams, 1992). Este mecanismo alivia la presión de excitación (Gray et al., 1996) en los centros de reacción por la disipación de la energía en forma de calor. Adicionalmente, AsA tiene un papel importante en el control del transporte de electrón fotosintético y respiratorio (Forti y Eherenheim, 1993), en el control de la división celular de las plantas (Navas et al., 1994), en el crecimiento de las plantas (Liso et al., 1985), en la elongación de la raíz y vacuolización de la célula (Takahama, 1993; Takahama y Oniki, 1994; Arrigoni, 1994; Navas y Gómez-Díaz, 1995; Córdova-Pedregosa et al., 1996; Nemoto et al., 1996).

La oxidación del ácido ascórbico, ocurre en dos etapas secuenciales, formando primeramente monodehidroascorbato y luego dehidroascorbato (Loewusfa, 1988). En las plantas, el principal substrato para la detoxificación reductiva del peróxido de hidrógeno es el ascorbato, el cual puede por lo tanto ser continuamente regenerado desde sus formas oxidadas (Fig.1.3). La regeneración de

AsA se realiza a través de las enzimas: monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) que utiliza NADPH como reductor para reciclar directamente ascorbato, y el dehidroascorbato reductasa (DHAR) que usa glutatión reducido (GSH) para la regeneración del proceso. El monodehidroascorbato también puede ser reducido directamente a ascorbato usando electrones derivados desde el cambio de transporte de electrones (Foyer, 1993), los cuales son mostrados en:



La fumigación con ozono incrementa la concentración de ascorbato y estimula el ciclo del ascorbato-glutatión (Castillo y Greppin, 1988), y ha sido sugerido que el ascorbato en la pared celular suministra una primera línea de defensa contra el ozono y el dióxido de sulfuro (Castillo y Greppin, 1988; Takahama et al., 1992; Luwe et al., 1993). En hojas de Sedum (Castillo y Greppin, 1986, 1988), mencionan que los niveles totales de ascorbato y glutatión disminuyeron durante la exposición de ozono, pero rápidamente se incrementaron tras la exposición. El ascorbato total disminuyó en espinacas y en cultivares sensibles de soja y castaña en 1 o 2 horas después de la iniciación de la fumigación de ozono (Lee et al., 1984; Tanaka et al., 1985). Pero en soja tolerante y genotipos de castaña, la exposición de ozono incrementó los niveles de ascorbato en 1 hora.

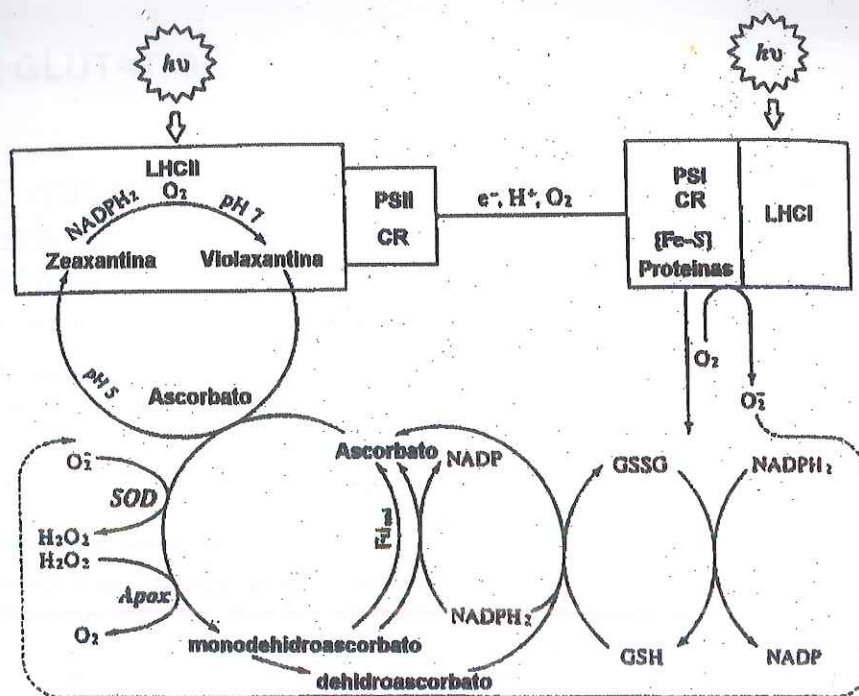


Fig. 1.3. El ciclo del ascorbato en el cloroplasto ilustrando el papel del ascorbato en la eliminación del oxígeno fotosintético y peróxido de hidrógeno y en la interconversión de violaxantina y zeaxantina en LHCII. (La anteroxantina como intermediaria no se demuestra); GSH, glutation reducido, GSSG, glutation oxidado; AP, ascorbato peroxidasa (Foyer, 1997).

En plántulas de diversas especies de pinus, las concentraciones de ascorbato se duplicaron después de 11 semanas de tratamiento con baja concentración de ozono (0.05 ppm) o moderada concentración de ozono (0.15 ppm) (Barnes, 1972), los efectos más pronunciados se encontraron en las acículas primarias. Hossain et al., (1985), indican que el peróxido de hidrógeno es tóxico para las células, y es eliminada en reacciones consecutivas por el ascorbato y glutation. Melhorn et al., (1986), reportó pequeños incrementos en los contenidos de glutation y ascorbato de las acículas de arboles de *Picea abies* expuestas durante dos años a concentraciones muy bajas de ozono (0.037ppmv). El aumento en los niveles de ascorbato extracelular pueden actuar como un sistema intensificado de detoxificación para el ozono (Chameides, 1989). El ascorbato juega un importante papel en el sistema de defensa de las plantas (Foyer y Halliwell, 1976; Nakano y Asada, 1981; Foyer et al., 1990; Foyer, 1992a), como sugieren los resultados que muestran que la tolerancia al ozono se correlaciona con altos niveles endógenos de AsA (Mächler et al., 1996; Conklin et al., 1996).

1.6.1.2 GLUTATION

El glutatión (GSH), es un metabolito esencial de la planta y se encuentra en las células procarióticas y eucarióticas, donde a menudo presenta el mayor pool de azufre reducido no proteico (GSH) y es el principal pool de tiol en las células de las plantas (Kunert y Foyer, 1993). Tanto el glutatión como el ascorbato se encuentran en equilibrio con su forma oxidada. Numerosas funciones fisiológicas han sido atribuidas a GSH en las plantas (Rennenberg, 1995; Foyer et al., 1997), como precursor de las fitoquelatinas (Grill et al., 1987, 1989), como sustrato de la GSH-Trasferasa (Marrs, 1996), está involucrado en el estado redox del ciclo de la célula (Gyuris et al., 1993; Russo et al., 1995; Shaul et al., 1996). Se ha propuesto que GSH, juega un importante papel en la estabilización de las membranas celulares, mediante la eliminación del peróxido de acilo formado durante la peroxidación de lípidos generado durante el estrés oxidativo (Price et al., 1990).

En los cloroplastos, el glutatión es mantenido predominantemente en el estado reducido (95%) bajo condiciones de luz, su concentración varía entre 1 a 5 mM. El GSH es un agente antioxidante soluble en el agua de las células de las plantas, y juega un importante papel en el sistema de defensa, además no solamente participa en la regeneración del ascorbato vía dehidroascorbato reductasa, también puede reaccionar con el oxígeno singlete y radical hidroxilo, y proteger el grupo tiol de las proteínas. (Foyer et al., 1994). Una función principal de glutatión en la protección contra el estrés oxidativo, es la reducción del ascorbato en el ciclo del ascorbato-glutatión (Foyer y Halliwell 1976; Groden y Beck, 1979; Nakano y Asada, 1980). En esta vía, el glutatión actúa como un intermediario en la reducción del peróxido de hidrógeno usando electrones desde el agua (Foyer et al., 1997). El eficiente reciclaje de glutatión es asegurado por la actividad de la glutatión reductasa. La estimulación de la biosíntesis de GSH es frecuentemente observada en condiciones de estrés, la forma oxidada se produce cuando reacciona con las especies de oxígeno activo, a glutatión disulfuro (GSSH). En la regeneración de GSH participa la enzima glutatión reductasa (GR), que utiliza NADPH para reducir GSSH a GSH (Fig. 1.4).

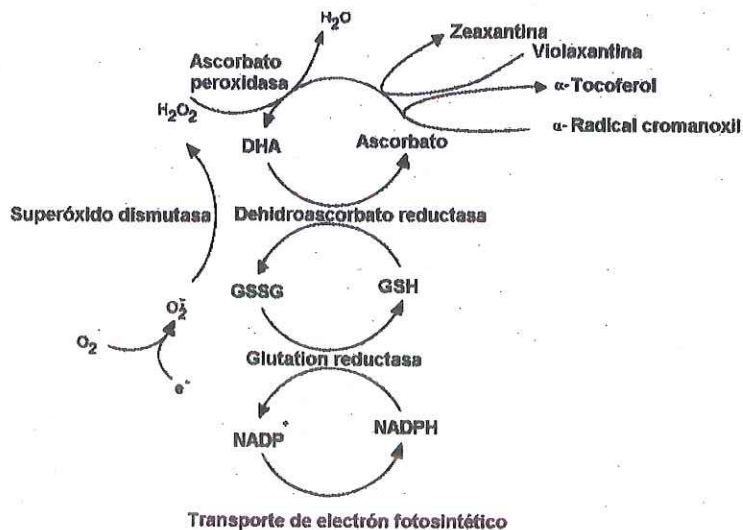


Fig. 1.4. Ciclo del ascorbato-glutation y las reacciones asociadas. Adaptado por Creissen et al., (1994).

La acumulación de GSSG, nos indica la sensibilidad al estrés oxidativo (Smith, 1985; Schmidt y Kunert, 1986; Mehlhorn et al., 1986). El contenido de glutatión en coníferas se incrementa como consecuencia de la exposición de los contaminantes del aire (Grill y Esterbauer, 1973; Grill et al., 1982; Mehlhorn et al., 1986). La reducción en la relación fotosintética observada en *Populus nigra* expuestos a ozono (Sen Gupta et al., 1991; Pell et al., 1992; Matyssek et al., 1993), es precedida de un incremento en el contenido de glutatión foliar (Sen Gupta et al., 1991), la acumulación de GSH puede compensar la disminución en la capacidad de otros antioxidantes (Smith et al., 1984; Smith, 1985; Chamnongpol et al., 1996; Willekens et al., 1997). Ranieri et al., (1996), indican que observaron poca variación en la cantidad de glutatión como consecuencia de la fumigación de ozono en hojas de calabaza. Es posible que otras moléculas antioxidantes pueden ser incrementadas para compensar la disminución de glutatión (Greenberg y Demple, 1986; May et al., 1996). La disponibilidad de AsA y glutatión actúan como sumidero para el ozono y se considera que ambos son los principales metabolitos responsables de la eliminación de los radicales libres por tener altas constantes de oxidación, movilidad dentro de la célula y alta concentración en el citoplasma y cloroplasto

1.6.1.3 α -TOCOFEROL

Es un antioxidante liposoluble que protege las membranas celulares contra el estrés oxidativo (Finckh y Kunert 1985; Kunert et al., 1985). La reacción del anión superóxido con el peróxido de hidrógeno, produce radical hidroxil (OH^\cdot), el cual promueve la peroxidación de lípidos. Este antioxidante se encuentra asociado a las membranas y su función es eliminar los radicales libres, que allí se producen (Finckh y Kunert, 1985; Kunert y Ederer, 1985). El α -tocoferol es mantenido en la forma reducida en una reacción no enzimática con el ascorbato (Leung et al., 1981). Mehlhorn et al., (1986), reportó que los niveles de α -tocoferol, se incrementaron en plántulas de Picea y Abeto después de dos años de fumigación con O_3 o SO_2 .

1.6.2 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

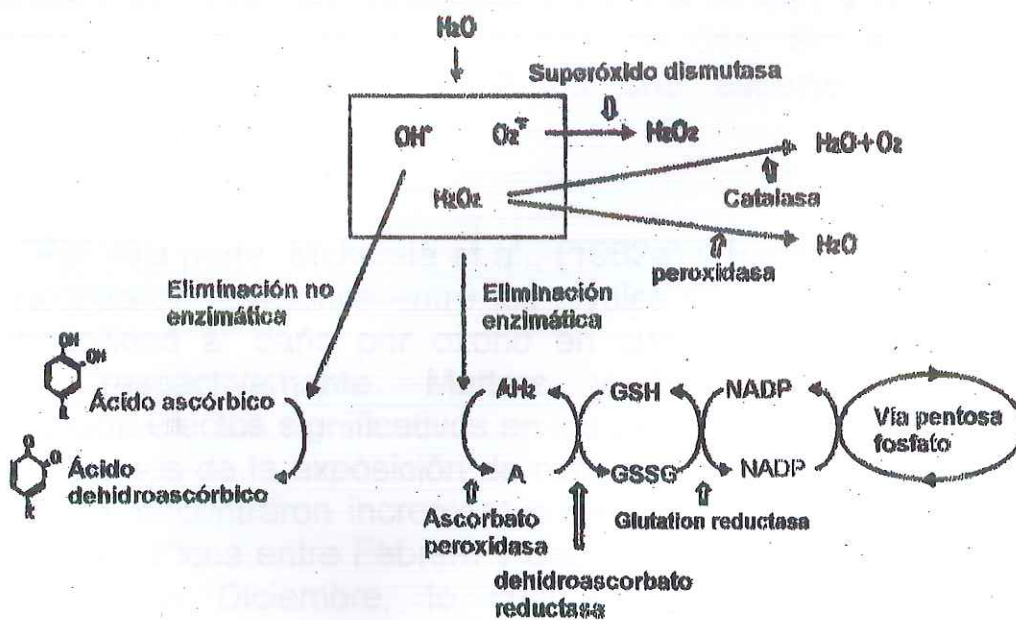


Figura 1.5. Representación esquemática de los mecanismos que participan en la eliminación de los oxidantes y en la regeneración del ascorbato (Adaptado por Wada et al., Plant Science 132 (1998) 109-119).

1.6.2.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La superóxido dismutasa (SOD), se encarga de catalizar la dismutación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formando oxígeno y peróxido de hidrógeno (Scandalios, 1993; Allen, 1995). Posteriormente el peróxido de hidrógeno puede ser destruido por la acción del ascorbato peroxidasa y catalasa. El SOD se encuentra presente en todos los organismos aeróbicos (Halliwell y Gutteridge, 1989) y en todos los componentes subcelulares (Bannister et al., 1987; Fridovich, 1986). Las células de las plantas contienen tres tipos de SOD, diferenciados por su metal cofactor: Mn-SOD están localizadas en mitocondrias, Fe-SOD en el cloroplasto, y Cu/Zn-SOD han sido encontrado tanto en el citosol como en los cloroplastos (revisado por Bowler et al., 1994). Existen datos contradictorios en los efectos de ozono sobre la actividad de la SOD, así, Declaire et al., (1984), detectaron un incremento en los niveles de SOD en hojas de espinaca, y Castillo et al., (1987), reportan que encontraron incrementos tanto extracelular y en el total de la actividad SOD, en plántulas de *Norway spruce* expuestas al ozono. La actividad del SOD es estimulada por el ozono y elimina el $O_2^{\cdot-}$, y por lo tanto disminuye el riesgo de la formación de OH^{\cdot} . Sin embargo, la eliminación de $O_2^{\cdot-}$ solo transforma una especie de oxígeno destructivo a otro, H_2O_2 .

Por otra parte, Mckersie et al., (1982a) y Becker et al., (1989), no encontraron relaciones entre los niveles de SOD endógeno y la susceptibilidad al daño por ozono en cultivares de frijol y trébol blanco, respectivamente. Matters y Scandalios, (1986) no encontraron efectos significativos en los niveles de SOD en hojas de maíz, después de la exposición de ozono durante 4 días. Castillo et al., (1988), encontraron incrementos de las actividades de SOD en plántulas de *Picea* entre Febrero y Septiembre y una disminución de Septiembre a Diciembre, lo cual fue correlacionado con la concentración de ozono del aire. Tandy et al., (1989), detectaron un incremento de SOD después de la fumigación en plántulas de pino loblolly con bajos niveles de O_3 , durante tres meses. Lyons et al., (1999), encontraron un declive en la actividad Cu/Zn-SOD en *Plantago major*, en respuesta a la fumigación controlada de $70 \text{ nmol mol}^{-1} O_3$ en 7 h d^{-1} .

1.6.2.2 PEROXIDASA (POD)

La principal función de la peroxidasa (POD), es oxidar el peróxido de hidrógeno y convertirlo en agua. La actividad de la peroxidasa es estimulada por las concentraciones del ozono ambiental (Castillo et al., 1984; Castillo y Greppin, 1988; Batini et al., 1995; Ranieri et al., 1996; Lyons et al., 1999). Estudios realizados en calabaza, cultivadas en cámaras abiertas con altos niveles de ozono indican una tendencia a aumentar la actividad de la catalasa y de la peroxidasa, que contrarresta la lesión oxidativa del ozono (Ranieri et al., 1994). Castillo y Greppin (1988) publicaron que el tratamiento de ozono en hojas Sedum, causó un incremento en la actividad de la peroxidasa. Curtis y Howell (1971), reportaron incrementos en la actividad de la peroxidasa sobre la exposición de ozono en soja, y concluyeron que existe una directa relación entre el incremento de actividad peroxidasa y el desarrollo de daños visibles.

Dentro de las peroxidasas, la enzima ascorbato peroxidasa (AP), que se encuentra localizada en el cloroplasto y citosol, es una enzima clave del ciclo del ascorbato y se encarga de catalizar la oxidación del ascorbato a monodehidroascorbato, utilizando el peróxido de hidrógeno. La reacción catalizada por la enzima ascorbato peroxidasa (AP) es mostrada:



La ascorbato peroxidasa tiene un papel fundamental en la prevención de la acumulación de niveles tóxicos (μM) de H_2O_2 en las células de las plantas. La eliminación del H_2O_2 por el ascorbato peroxidasa es el primer paso del ciclo ascorbato-glutation, el cual sirve para regenerar ascorbato y mantener el pool de ascorbato en la forma reducida (Foyer y Halliwell, 1976; Anderson et al., 1983a, b; Asada y Takahashi, 1987; Gillham y Dodge, 1987; Law et al., 1988). El ciclo del ascorbato-glutation involucra sucesivas oxidaciones y reducciones del ascorbato, glutacion, y NADPH por las enzimas ascorbato peroxidasa (AP), dehidroascorbato reductasa (DHAR) y glutacion reductasa (GR). La rápida regeneración del ascorbato por los ciclos descritos es una necesidad absoluta, porque la ascorbato

peroxidasa rápidamente pierde actividad en ausencia del ascorbato, luego es muy susceptible a la inhibición por el H_2O_2 .

Existe un gran número de publicaciones científicas que describen la relación de la ascorbato peroxidasa y el O_3 . Después de la exposición de ozono en plantas de frijol y espinacas, estas experimentaron un incremento en la actividad de glutathion reductasa y ascorbato peroxidasa (Guri, 1983; Tanaka et al., 1988). Ranieri et al., (1996), manifiesta que la actividad del ascorbato peroxidasa en la matriz extracelular de los tejidos de calabaza se incrementó, tanto en hojas jóvenes como maduras. Petolino et al., (1983), reportaron la falta de una relación causa-efecto entre la aparición de necrosis y el incremento de la actividad ascorbato peroxidasa, con relación a los trabajos efectuados por Curtis y Howell, (1971). Batini et al., (1995), demostraron que el tratamiento con ozono estimuló la actividad ascorbato peroxidasa, pero no lo suficiente para prevenir la formación de la necrosis de la hoja en el cultivar sensible de tabaco Bel-W3.

1.6.2.3 GLUTATION REDUCTASA (GR)

La enzima glutathion reductasa (GR), utiliza como reductor el NADPH presente en el cloroplasto para reducir al glutathion oxidado (GSSG) a glutathion reducido (GSH) y regenerar de este modo el ascorbato:



Esta enzima juega un importante papel en el sistema de defensa antioxidante, y no solamente participa en la regeneración de ascorbato vía dehidroascorbato reductasa, también puede reaccionar con el oxígeno singlete y radical hidroxil, y proteger el grupo thiol de las proteínas (Foyer et al., 1994). La actividad de la glutathion reductasa, se encuentra localizada en el cloroplasto, citosol y mitocondria, pero el 80% de la actividad de GR está presente en el cloroplasto (Edwards et al., 1990).

La actividad de la GR está relacionada con la exposición al ozono. Ha sido demostrado que su actividad se incrementa en plantas de espinaca expuestas a 70 nl l^{-1} de ozono durante 4 días (Tanaka et al., 1988), y en plantas de guisantes expuestas a 100-150 nl l^{-1} durante 3 semanas (Melhorn et al., 1987), pero no en plantas de espinacas expuestas a 500 nl l^{-1} de ozono durante 8 horas (Tanaka et al., 1985), ni en *Sedum album* expuesto a 200-600 nl l^{-1} durante 2 horas (Castillo y Greppin, 1988). Las condiciones del estrés oxidativo, tales como herbicidas, contaminantes del aire, y frío pueden conducir a un incremento en la actividad de la GR (Schmidt y Kunert, 1986; Hausladen y Alscher, 1994a).

1.6.2.4 CATALASA (CAT)

La catalasa (CAT) se encarga de descomponer el peróxido de hidrógeno formado en la célula (Lazarow y Fujiki, 1985; Tolbert, 1981), en agua y oxígeno. La catalasa no utiliza co-substratos y suministra a la célula un mecanismo muy eficiente para eliminar H_2O_2 . Esta enzima se encuentra ubicado en el peroxisomas y glioxisomas, pero no en el cloroplasto.



1.7 DESCRIPCIÓN E INSTALACIÓN DEL CAMPO EXPERIMENTAL

El campo experimental se encuentra ubicada en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación, Generalitat Valenciana) y consta de un conjunto de 9 cámaras abiertas (Open Top Chambers, OTC's), distribuidas en un recinto de 18 x 27 m, que son utilizadas para el estudio de los efectos del ozono sobre distintas especies vegetales de interés agrícola crecidas en macetas. Además de estas cámaras abiertas, existen tres parcelas de control sin cámaras que se encuentran intercaladas con las OTC's.

Los elementos constituyentes del campo experimental están agrupados en dos sistemas bien diferenciados (Fig. 1.6):

- Sistema de control de la atmósfera que rodea el material biológico bajo estudio (1.7.1).
- Sistema de muestreo y análisis (SMA) de la atmósfera creada y de otras variables de interés (1.7.2).

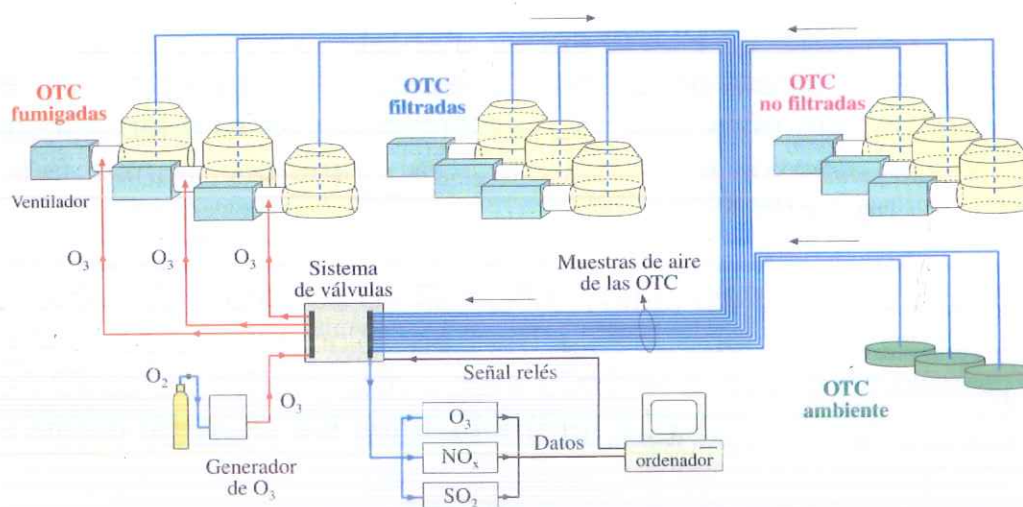


Figura 1.6. Esquema del campo experimental

1.7.1 Sistema de control

Las OTC's fueron diseñadas siguiendo las directrices de la NCLAN (National Crop Loss Assessment Network), las cuales constan de recintos cilíndricos de 3 m de diámetro por 2.4 m de altura (sin contar el sombrero), construidos a partir de hierro galvanizado, y recubiertas con policloruro de vinil (PVC), transparente y flexible tanto en la parte superior como en la inferior. La parte inferior de la cámara presenta doble capa, la capa interior está constituida de 300 orificios de 2.5 cm de diámetro, por donde pasa el aire inyectado al interior de la cámara. Las cámaras cuentan con una puerta de acceso, el cual permite la entrada para la realización de las labores de mantenimiento, control y muestreo de las plantas.

El sistema de inyección de aire es independiente para cada cámara, siendo los ventiladores los elementos esenciales. Estos

ventiladores poseen una potencia de 0.5 C.V y 2500 r.p.m. y renuevan el aire interior de las cámaras 3.5 veces por minuto (caudal: $\approx 83 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$). Los ventiladores se encuentran inmediatamente antes de la entrada a las cámaras y están protegidas por carcasas metálicas, dentro de la cual es colocado antes de los ventiladores unos pre-filtros para evitar la posible entrada de partículas y elementos extraños.

La composición del aire de las OTC's se establece por medio de filtros de carbón y fumigando con ozono mediante el sistema de dilución del aire en las cámaras. Considerando que en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent, el ozono es el único contaminante atmosférico que se encuentra en cantidades apreciables (Balaguer, 1999), ésta ha sido la única especie gaseosa considerada a efectos de filtración. Todas las cámaras cuentan con un filtro para la retención de partículas y, además, algunas cuentan con filtros de carbón activo para eliminar el ozono ambiental, estas se sitúan después del ventilador (Fig. 1.7).

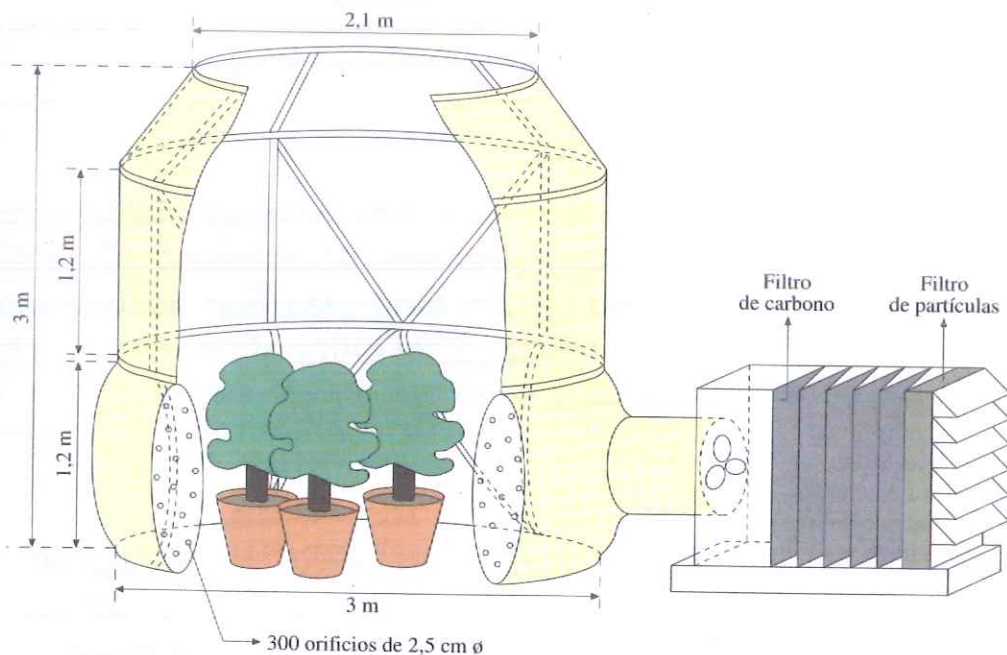


Figura 1.7. Esquema de una cámara abierta y sistemas de ventilación con filtro

La calidad del aire que se inyecta dentro de las cámaras es: cámaras con filtro de carbón con ausencia de O_3 (CF) y cámaras sin filtro de carbón, donde la concentración de O_3 es la ambiental (NF) y parcelas sin cámaras denominándose aire ambiente (AA).

Además se dispone de tres cámaras en las cuales se agregó una entrada especial para la inyección del ozono ($\text{NF}+\text{O}_3$) situada a continuación del ventilador y antes de la entrada al difusor tiroidal de distribución del aire (Fig.1.8).

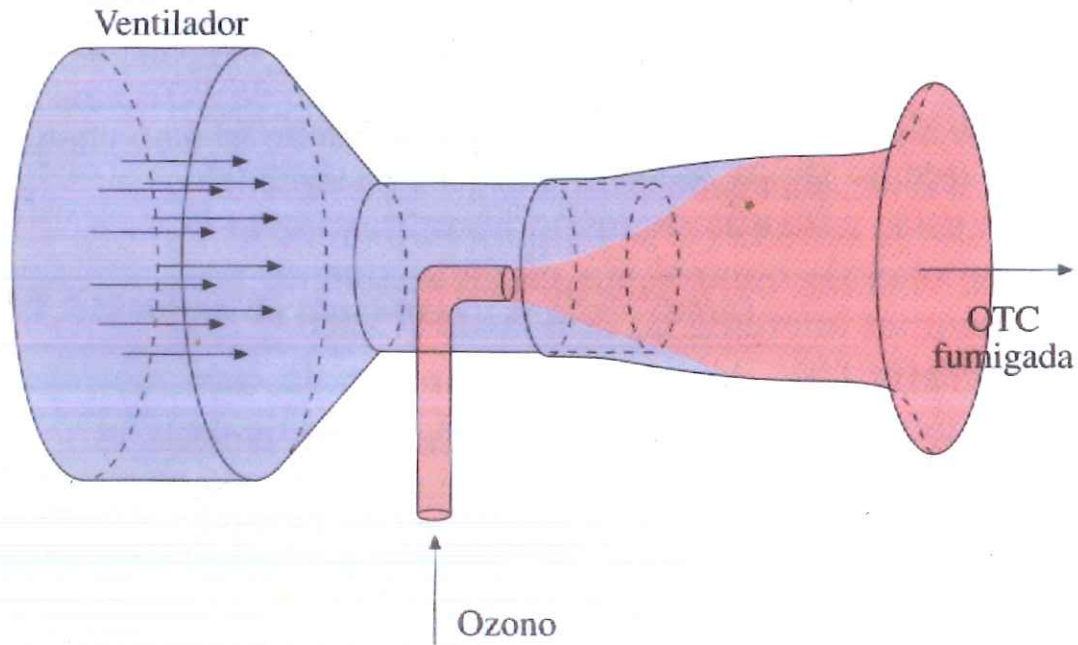


Figura 1.8. Esquema de la conexión del conducto de fumigación con el sistema de ventilación.

Con el objeto de garantizar una correcta dilución del gas (O_3) inyectado en la corriente de aire impulsada por el ventilador, así como para impedir que este gran caudal de aire ($\approx 83 \text{ m}^3 \text{ min}^{-1}$) produzca perturbaciones sobre los pequeños flujos de fumigación ($\approx 500 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$), se ha tenido en cuenta la geometría de aquella entrada.

La fumigación de ozono es probablemente una de las más complicadas de realizar, ya que el O_3 hay que generarlo a partir de O_2 . En consecuencia, a los problemas derivados del propio sistema de inyección se suman, los relacionados con la generación. El generador utilizado en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (S.I.R modelo 03001), que se basa en descargas eléctricas producidas por diferencias de potencial muy elevadas que provocan la ionización y disociación de las moléculas de oxígeno (Marshall et al., 1995). El generador de ozono fue alimentado con oxígeno puro de botella (99%).

La producción de ozono con este sistema se puede regular controlando el flujo de entrada de O_2 al generador o ajustando la corriente de las descargas. Los flujos de O_3 enviados a las OTC's fumigadas son regulados mediante controladores de flujo másico (S.I.R modelo S-2000/D). El sistema permite crear las concentraciones de ozono deseadas manteniendo los niveles en las OTC's bastante estables. La concentración de ozono creada dentro de las OTC's se puede considerar uniforme en todo su espacio útil. A partir de este punto, se aprecia un pequeño gradiente de un metro por encima del dosel de las plantas (Pujadas et al., 1997).

1.7.2 Sistema de muestreo y análisis (SMA)

El sistema de muestreo y análisis del aire de las cámaras funciona en continuo y de manera totalmente automática. El sistema realiza un muestreo secuencial del aire de las cámaras siguiendo un ciclo establecido previamente, de modo que la muestra de aire seleccionada es llevada a unos analizadores automáticos, que miden las concentraciones presentes de ciertos gases contaminantes (NO_x , SO_2 , y O_3). Un sistema informático gestiona todo el ciclo de muestreo y procesa y almacena toda la información, mediante un programa diseñado al efecto.

Paralelamente, se registran en continuo en un sistema autónomo de adquisición de datos una serie de variables termodinámicas: temperatura y humedad del aire, radiación fotosintética activa (PAR), cuyas medidas se realiza tanto dentro como fuera de las OTC's. También se miden parámetros como la dirección y velocidad del viento, precipitación, y presión atmosférica en el área del campo experimental. Una descripción detallada del SMA se puede realizar agrupando sus elementos en los tres subsistemas de que consta: el subsistema de muestreo, el subsistema de análisis y el subsistema de gestión.

1.7.2.1 Subsistema de muestreo

Considerando las dimensiones del campo experimental y dado que el riesgo de modificación de las muestras de aire aumenta con la

distancia entre los puntos de captación y de análisis (Gimeno et al., 1989), se concluye que el mejor lugar para ubicar la sala de control y de medidas es el centro geométrico del campo, situando las OTC's al entorno de esta ubicación.

El muestreo del aire del interior de cada OTC's se realiza en un punto situado en el centro de cada cámara y justo por encima del dosel de las plantas ($\approx 1\text{m}$). Las muestras de aire se canalizan a través de tubos de teflón, de la misma longitud (25 m) para todas las OTC's, que convergen en un colector distribuidor de teflon situado en la sala de control. El bombeo de aire se realiza por aspiración con una bomba general, que mantiene un flujo permanente en cada tubo. La activación secuencial de una serie de electroválvulas permite que, periódicamente, cada uno de estos caudales de aire sea aspirado directamente por las bombas de los analizadores de gases, realizándose entonces las medidas. Con ello se asegura la renovación continua del aire presente en los tubos, lo que disminuye el riesgo de impurificación de las canalizaciones por estancamiento y permite acortar el tiempo de respuesta del sistema de medida. Las muestras de aire que no se analizan se ventean al exterior. En la actual configuración del campo, todos los tubos están guiados por conducciones subterráneas, lo que evita su deterioro mecánico y el sobrecalentamiento de las líneas, que podría llegar a alterar la composición de las muestras durante el recorrido. Además del aire de las distintas cámaras, el sistema recoge una muestra de aire de referencia independiente mediante la inclusión de un filtro de carbón activo unido directamente al colector distribuidor como si tratase de una cámara más. La utilización de este aire cero es el que permite controlar tanto el rendimiento de los filtros de las cámaras como el funcionamiento de los analizadores de gases.

1.7.2.2 Subsistema de análisis

Las muestras de aire tomadas en este campo experimental son analizadas de manera continua, midiéndose su contenido en O_3 , NO_x , y SO_2 . Pese a que las concentraciones de NO_x y SO_2 presentes en la zona son bajas, estos contaminantes se miden de manera preventiva. Los analizadores automáticos utilizados son:

- DASIBI modelo 1008-RS, mide la concentración de ozono del aire por medio de la técnica de la absorción ultravioleta.
- DASIBI modelo 2108, mide la concentración de NO_x del aire mediante la técnica de la quimioluminiscencia.
- DASIBI modelo 4108, mide la concentración de SO₂ del aire por medio de la fluorescencia UV.

Todos los analizadores son sometidos a controles semanales y calibraciones trimestrales, ya que las condiciones de meteorología (alta humedad y elevadas temperaturas) obligan a acondicionar adecuadamente la sala de control, y evitar posibles problemas en el funcionamiento de los analizadores y posibles derivas en los resultados.

Por otro lado, también se miden algunos parámetros termodinámicos del campo experimental y la influencia de las OTC's sobre ellos. Para ello, algunas OTC's y algunas parcelas del aire ambiente están dotadas de sensores de temperatura y humedad del aire (Skye instruments model SKH 2013/1) y PAR (Skye instruments model 210). Además hay instalada una torre meteorológica autónoma de 9 m de altura, que dispone de los siguientes sensores: humedad relativa y temperatura (Skye instruments model SKH 2013/1 presión barométrica (SIR model PB-100), irradiancia solar (PH. Schenk model 8101), velocidad y dirección del viento (Young model 12005 y Young model 12002) y pluviómetro (E.M. model ARG-100) (ver fotos al final del capítulo).

1.7.2.3 Subsistema de gestión

El campo experimental está controlado desde un ordenador HP Vectra 486/25 VL a través de un programa informático específico. El ordenador está equipado con una tarjeta electrónica de conversión analógico/digital (tarjeta A/D) y una tarjeta de entradas/salidas digitales. Esta última está conectada a los relés que controlan las electroválvulas de tres vías, las cuales dirigen las trayectorias del flujo de muestra del aire precedente de la cámara que tiene asociado. Si la electroválvula se activa por medio del relé, el aire es enviado hacia los analizadores de gases, mientras que si permanece desactivada el caudal se ventila al exterior. La tarjeta de conversión A/D tiene

conectadas las salidas de señal de los analizadores de gases y es la encargada de recoger y transmitir esta información al ordenador.

El programa informático, controla una serie de conceptos fundamentales para la gestión del subsistema de muestreo y análisis:

- Periodo y secuencia del muestreo de las cámaras (número de cámara y tipo de tratamiento del aire asociado).
- Tiempo de espera (T_{off}) y de adquisición de datos válidos (T_{on}) tras seleccionar una cámara para el análisis.
- Precisión y cadencia del barrido de las señales de cada analizador.
- Procedimientos para el primer procesado de la información (datos correspondientes a diferentes sensores de temperatura, humedad, velocidad y dirección del viento, precipitación, presión barométrica y radiación solar son almacenados en un sistema de adquisición de datos autónomos y posteriormente procesados, tipo de promediado, almacenamiento redundante, presentación numérica de las medidas instantáneas, presentación gráfica de los promedios horarios previos del día, etc.).

De acuerdo con el diseño de campo y la longitud de las líneas de teflon, se ha fijado un tiempo de muestreo para cada cámara de 5 minutos, el cual es dividido en $T_{off} = 2$ minutos y $T_{on} = 3$ minutos. Con estos tiempos se garantiza una renovación completa del aire que llega a los analizadores tras un cambio de cámara, evitando así problemas de solape en la lectura y asignación de datos. Los cambios de cámara se efectúan coincidiendo con el momento en que se alcanzan valores múltiplos de 5 minutos en el reloj del ordenador. En ese momento, se realiza un promedio de los datos de la calidad del aire obtenidos durante T_{on} , y se almacenan junto con la identificación de la cámara seleccionada. A continuación, se activa la electroválvula asignada a la cámara siguiente en el ciclo, que debe corresponder a un tratamiento de aire distinto. Al final de cada hora en punto, se realizan promedios de concentración de los

contaminantes medidos en cada tipo de tratamiento, se almacenan y se pueden presentar gráficamente en pantalla.



Foto 1. Vista del campo experimental de Carcaixent con las cámaras abiertas.



Foto 2. Detalle de una cámara con el ventilador.

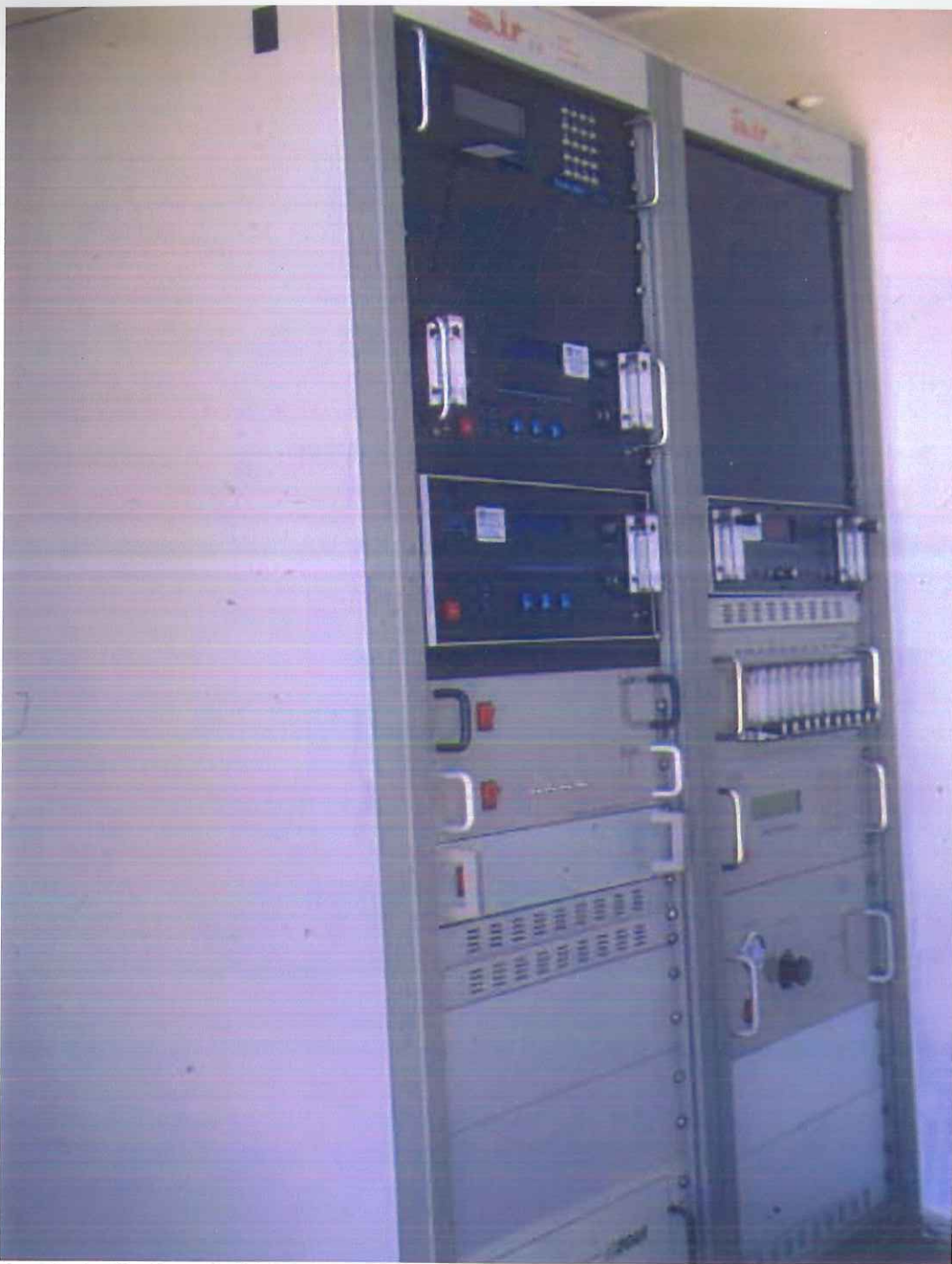


Foto 3. Analizadores de SO_2 , NO_x y O_3 . Sistema de válvulas para el control de O_3 .



Foto 4. Vista de la caseta donde se sitúan los analizadores y torre meteorológica.



Foto 5. Vista del interior de la cámara con el fluorímetro.

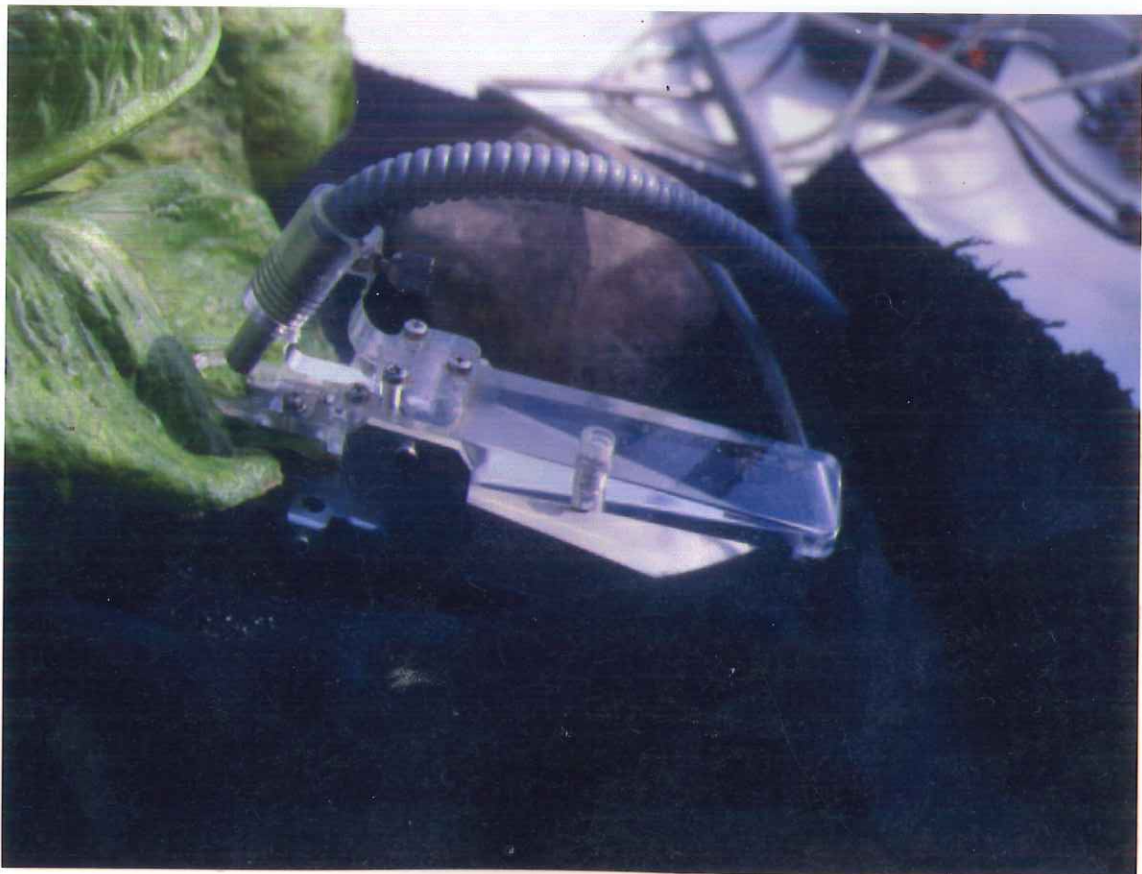


Foto 6. Vista de la pinza del fluorímetro con la fibra óptica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del ozono sobre diferentes cultivos agrícolas, a través de las técnicas de la fluorescencia de la clorofila a, actividad de las enzimas antioxidantes, concentración de ascorbato, peroxidación de lípidos de membrana, conductividad de solutos y producción de frutos, con el fin de poder esclarecer los efectos del O₃ sobre algunos aspectos de la fisiología de las plantas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar la influencia del ozono ambiental en el cultivo de la patata variedad Obelix.
- b) Determinar los efectos del benomilo, como sustancia antioxidante en presencia del ozono ambiental en el cultivo del tomate variedad Tiny Tim en cámaras abiertas.
- c) Estudiar el efecto de tres calidades de aire (aire limpio, aire ambiente y fumigación de ozono) en plantas de lechuga cultivar Candeale R7.
- d) Estudiar las respuestas fisiológicas de dos variedades de espinacas (Avanti y Clermont) al daño por ozono en cámaras abiertas.
- e) Estudiar si el aporte en exceso de abono nitrogenado, aumenta la susceptibilidad al ozono en el cultivar de sandía var. Reina de Corazones.
- f) Comparar el efecto del ozono en las primeras etapas fenológicas en plántulas de lechuga variedades: Valladolid, Del Prat, Odra y Maravilla Verde.
- g) Estudiar los efectos del ozono en plántulas de coles variedades: Sentinel, Othelo y Caramba.

3. INFLUENCIA DEL OZONO AMBIENTAL SOBRE EL CULTIVO DE LA PATATA (*Solanum tuberosum* L.) cv. OBELIX

3.1 RESUMEN

La toxicidad del ozono es causada por su alta capacidad oxidante y habilidad para generar especies de oxígeno reactivo. En este capítulo se describen los efectos del ozono ambiental sobre la fluorescencia de la clorofila *a*, enzimas antioxidantes, niveles de ascorbato y peroxidación de lípidos en las plantas de patata (*Solanum tuberosum* L.) variedad Obelix, cultivadas en cámaras abiertas. En las plantas crecidas en condiciones de aire no filtrado (NF), el desarrollo de la atenuación no-fotoquímica va ligado a una disminución en la relación fotoquímica del PSII. La capacidad del PSII para reducir al primer aceptor de electrones, Q_A fue menor que la obtenida en el aire filtrado (CF). Los cambios en el rendimiento de la fluorescencia producidas por el O_3 , están asociados a cambios en las membranas. Hay un incremento en la concentración de thiobarbitúricos como indicadores de la peroxidación de lípidos de las membranas en hojas de (NF). El sistema de detoxificación en hojas (NF) y (CF) fue analizado por el pool de ascorbato y las actividades de las enzimas antioxidantes, el ozono afecta a las concentraciones del ascorbato y disminuye las actividades de las enzimas. La capacidad de los sistemas antioxidantes, no es suficientemente alto para proteger a la planta contra el ozono ambiental y probablemente puede afectar el rendimiento fotosintético en el cultivar de patata, bajo las condiciones de cámaras abiertas.

3.2 INTRODUCCIÓN

El ozono es uno de los contaminantes del aire más fitotóxicos y está formado por la interacción de los óxidos de nitrógeno, hidrocarburos y radiación UV. En el Hemisferio Norte, las concentraciones de ozono presentan un rango entre 20 y 60 $nl\ l^{-1}$, con picos de hasta 250 $nl\ l^{-1}$ (Stockwell et al., 1997). Los modelos

predicen que el ozono troposférico se incrementará del orden de 0.3 al 1% por año en los próximos 50 años (Chameides et al., 1994). Los niveles altos de ozono no están restringidos a las áreas urbanas o industriales, hay evidencias que muchas zonas rurales del área del Mediterráneo están sufriendo un problema severo por los oxidantes fotoquímicos. Los niveles ambientales de ozono exceden las directrices de la UN-ECE para la protección de la vegetación durante la primavera y verano (Velissarion et al., 1992, Lorenzini et al., 1994; Gimeno et al., 1999). Los efectos de ozono o de sus radicales libres alteran las funciones de las membranas celulares, conduciendo a una disminución de la fotosíntesis, daño foliar, senescencia prematura, reducción en el crecimiento del tallo y de las raíces y en el rendimiento de los cultivos. Estos efectos han sido observados a diferentes concentraciones de ozono (Farage et al., 1991; Heath, 1994; Calatayud et al., 1999; Calatayud y Barreno, 2000).

La fluorescencia de la clorofila *a* es un indicador sensible de la utilización de la energía fotosintética (Papageorgiou, 1975). Los cambios en la cinética de la inducción de la fluorescencia durante la transición del estado de oscuridad-luz reflejan parcialmente el complejo mecanismo fotosintético que tiene lugar en el PSII. En condiciones fisiológicas, la mayor parte de la luz interceptada por una planta es absorbida por los pigmentos fotosintéticos mientras los procesos de de-excitación como la emisión de calor y fluorescencia de la clorofila son mucho menores. Bajo condiciones de estrés, la conversión cuántica declina y la emisión de calor y fluorescencia de la clorofila se incrementan considerablemente (Lichtenthaler, 1996; McMichael et al., 1989).

La toxicidad del ozono es causada por la formación de especies de oxígeno tóxico y reactivo (AOS), las plantas eliminan los AOS a través del sistema de defensa antioxidante. El sistema de defensa antioxidante consiste en moléculas de bajo peso molecular tal como el ascorbato, glutatión, α -tocoferol y carotenoides (ver Alscher y Hess, 1993), así como diversas enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa, peroxidasa, glutatión reductasa y ascorbato peroxidasa (ver Bowler et al., 1994; Creissen et al. 1994). Bajo condiciones fisiológicas óptimas, el sistema antioxidante suministra una adecuada protección contra los AOS (Asada y Takahashi, 1987), sin embargo, si la concentración de ozono es

alta, la actividad antioxidante se incrementa, pero en algunos casos puede ser insuficiente para proteger a la planta (Foyer et al., 1994). Estos AOS pueden también causar la desorganización de la integridad de las membrana por la oxidación de grupos sulfidrido y/o lípidos (Beckerson y Hofstra, 1980; Guidi et al 1999).

Los datos que se tiene acerca de las concentraciones de ozono (Ribas et al., 1998, Sanz y Millán, 1998) demuestran que la costa este de España (principalmente en Cataluña, Valencia, Murcia y Almería) presenta alta concentración de este contaminante. Esto supone un grave riesgo, porque esta área, es un importante centro de producción de frutas y vegetales. La patata (*Solanum tuberosum* L.) es una de las especies más extensamente cultivada en el área de Valencia y es de gran importancia económica. La sensibilidad o tolerancia de esta especie al ozono depende del cultivar (De Vos et al., 1983).

Los objetivos planteados fueron: determinar la influencia del ozono ambiental sobre el cultivo de la patata var. Obelix, debido a su gran valor comercial de este cultivar en el área de Valencia y valorar la respuesta fotosintética a diferentes intensidades de luz actínica sobre el fotosistema II. Para conseguir estos objetivos, se emplearon las técnicas de la fluorescencia de la clorofila *a*, actividad de las enzimas antioxidantes, concentración de ascorbato, y peroxidación de lípidos.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1. Material vegetal

Los trozos de tubérculos (10 x 6 cm de tamaño) de patata (*Solanum tuberosum* L.) variedad Obelix, fueron germinados en vermiculita y mantenidos en un invernadero en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (Valencia), estas labores de siembra se realizaron el 5 de Enero de 1999. Las condiciones medio ambientales en el invernadero durante el crecimiento de la planta fueron como sigue: 15 a 20 °C (día), 8 a 12 °C (noche), 60 a 95 % de humedad relativa, la radiación activa fotosintética de las

máximas intensidades es de 700-1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plántulas de 14 a 20 hojas fueron transplantadas en macetas grandes (28.5 litros de capacidad), conteniendo una mezcla de suelo comercial (Terraplant, BASF, Uchte, Germany) y transferidos a las OTC's el día 1 de Febrero de 1999 donde fueron expuestos a condiciones de aire filtrado (CF) y aire ambiente (NF) durante 75 días (desde el inicio de Febrero hasta el 15 de Abril), conteniendo cada cámara 4 macetas. Se estableció un total de 4 cámaras con filtro (CF) y 4 cámaras sin filtro (NF) y todos los tratamientos tuvieron un riego diario mediante el sistema de goteo. Durante el periodo de crecimiento se detectaron algunas hojas con mildiu, para lo cual se realizaron dos controles fitosanitarios con oxiclورو de cobre a dosis de 3 g/l.

3.3.2 Los tratamientos de las cámaras abiertas

La construcción e instalación de las OTC's se fundamentó sobre el diseño original empleado en el programa NCLAN (ver Heagle et al., 1973). Durante la estación del cultivo, las 4 OTC's (CF) fueron ventiladas continuamente (24 horas/día), con el paso del aire a través de carbón activado y filtros de polvo (Tipo SF/Q clase EU-3 y EU-4, SF/CG y RBAA2) y las 4 cámaras restantes fueron ventilados con aire ambiente no filtrado (NF). La concentración de los contaminantes gaseosos tanto de O_3 , óxidos de nitrógeno (NO y NO_2) y dióxido de sulfuro (SO_2), velocidad del viento, dirección del viento, temperatura del aire, irradiancia y como humedad relativa fueron continuamente registradas. Los niveles de O_3 , NO_x y SO_2 fueron analizados usando analizadores, específicos para cada contaminante (DASIBI modelos 1008, 2108 y 4108 respectivamente). El analizador de ozono fue calibrado una vez al mes con un modelo DASIBI 5008 (Dasibi Environmental Corp., Glendale, CA, USA). Las concentraciones de ozono son expresadas como AOT40 (exposición acumulada sobre el umbral de 40 nl l^{-1}), definido como la suma de las diferencias entre las concentraciones medias de ozono de cada hora diaria que exceden el umbral de 40 nl l^{-1} y con una radiación media de \geq de 50 W m^{-2} (Kärenlampi y Skärby, 1996).

3.3.3 Medición de la fluorescencia de la clorofila a

Las medidas de la fluorescencia de la clorofila se realizaron dentro de las OTC's a temperatura ambiente utilizando un fluorímetro portátil (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany) al final del periodo de cultivo. Las hojas fueron incubadas durante 30 minutos en oscuridad. La fluorescencia (oscuridad) mínima (F_o), fue obtenida por la excitación de las hojas con una luz débil ($14 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La fluorescencia máxima (F_m) fue determinada por un pulso de saturación de luz blanca de duración de 600 ms. La fluorescencia variable (F_v) fue calculada como $F_m - F_o$. Después de 2 minutos de readaptación en la oscuridad, la luz actínica blanca fue encendida y se aplicó diferentes intensidades de luz actínica por cada cinética de la fluorescencia (430, 940, 1460, y 2230 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y pulsos de saturación fueron aplicados cada 5 minutos durante 15 minutos para determinar el rendimiento de la fluorescencia máxima durante la iluminación actínica (F_m'), el nivel de la fluorescencia modulada durante una breve interrupción de la iluminación actínica en presencia de la luz roja lejana (F_o'), y el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila durante la iluminación actínica (F_s). El cálculo de la atenuación debido a la disipación no-fotoquímica de la energía de la luz absorbida (NPQ) fue determinado en cada pulso de saturación, acorde a la ecuación $\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$ (Bilger y Björkman, 1991). El coeficiente de la atenuación fotoquímica, q_p , representa la fracción de los centros de reacción abierto del PSII y fue calculada como $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ (Schreiber et al., 1986). La eficiencia cuántica fotoquímica del PSII, ϕ_{PSII} , asociada con el rendimiento cuántico del transporte no cíclico de electrones, fue estimada desde $(F_m' - F_s)/F_m'$ (Genty et al., 1989). El cociente $(1 - q_p)/(\text{NPQ})$ fue utilizado para estimar el exceso de fotonos y de la susceptibilidad al estrés luminoso en el PSII (Parker et al., 1995). Las medidas de la fluorescencia se efectuaron a partir del 12 de Marzo de 1999.

3.3.4 Análisis de las enzimas antioxidantes

Se emplearon (2 g) de hojas maduras de patata a las cuales se les elimino el peciolo y las nervaduras centrales y laterales. Fueron homogeneizados con 10 ml de tampón fosfato potásico (100mM) (pH 7.5), que contienen 2 mM EDTA y 2% (w/v) PVP-10

soluble y 5mM de ascorbato para la medición de la actividad ascorbato peroxidasa (APX). El homogeneizado se centrifuga a 15000 g durante 20 minutos. El sobrenadante fue filtrado (Millipore, Mitex 0.5 μm) y utilizado para el posterior análisis enzimático. Todos los pasos, hasta el análisis enzimático fueron llevados a cabo entre 3 y 5 °C. Los ensayos enzimáticos fueron realizados después que las plantas tuvieron 75 días en las OTC's.

La **ascorbato peroxidasa (AP)** fue determinado por la disminución de la absorción a 290 nm ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en 4 min, en un medio de reacción que contiene 100 mM tampón fosfato potásico (pH 7.5), 0.5 mM ascorbato, 0.4 mM H_2O_2 (Nakano y Asada, 1981) y el volumen apropiado del extracto. Las correcciones fueron hechas por la oxidación del ascorbato en la ausencia del H_2O_2 .

La actividad **glutation reductasa (GR)** fue determinada siguiendo la oxidación del NADPH a 340 nm tal como describe Rao (1992) y Rao et al., (1996). Las correcciones fueron realizadas por la oxidación del NADPH en ausencia de GSSG.

La actividad **superóxido dismutasa (SOD)** fue medida como describe Beyer y Fridovich (1987). En este ensayo, una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima requerida para inhibir la fotoreducción del nitroblue tetrazolium (NBT) al 50%.

3.3.5 Peroxidación de lípidos

El grado de peroxidación fue medido espectrofotométricamente mediante la determinación de la concentración en los extractos de las hojas del compuesto malondialdehído (MDA) según el protocolo propuesto por Heath y Parker (1968) y siguiendo las modificaciones posteriores de Dhindsa et al., (1981). El MDA es formado tras las reacciones de los radicales libres o el O_3 con los lípidos de membrana.

3.3.6 Determinación de ascorbato

El peciolo y las nervaduras fueron eliminados de las hojas maduras, posteriormente se pesó (1g) y pulverizado en nitrógeno líquido y homogeneizado con 5 ml de ácido metafosfórico (MPA) al 2%. El homogeneizado fue centrifugado a 4360 g, 4°C, y 10 min, el sobrenadante fue filtrado (Millipore, Mitex 0.5 µm). El ascorbato (AsA) y dehidroascorbato (DHA) fueron medidos espectrofotométricamente (8452 A Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) tal como describe Takahama y Oniki (1992). La concentración de ascorbato en el extracto vegetal fue determinada siguiendo la disminución de la absorción a 265 nm inducida por la oxidación de AsA a DHA por la adición del enzima ascorbato peroxidasa (EC 1.10.3.3, de *Cucurbita sp.*). La concentración del total de ascorbato (TAA) fue determinada por la reducción del DHA a AsA por la adición de 0.5 mM de dithiothreitol (DTT). La concentración de DHA fue calculada por la diferencia entre el TAA y AsA.

3.3.7 Análisis estadístico

Los datos experimentales se llevaron a cabo mediante el análisis de variancia (ANOVA), la significación estadística ($p < 0.05$) fue realizada por el método de la menor diferencia significativa (LSD). El análisis estadístico fue realizado usando el programa estadístico SPSS® (SPSS, Chicago, IL, USA).

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Calidad del aire

Los daños inducidos por el O₃ ambiental en las plantas de patata se presentaron con moteaduras internerviales irregulares de color pardo-rojizo, especialmente en las hojas adultas (ver sección de fotos al final del capítulo).

Las concentraciones durante el periodo de crecimiento para el SO_2 y NO_x fueron bajas, menos que 2 nl l^{-1} para el SO_2 y 5 nl l^{-1} para el NO_x en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent. Durante el periodo cultivo, las concentraciones del ozono ambiental en la cámara (NF) fueron consideradas altas, y la acumulada diaria de cada hora de exposición de ozono sobre 40 nl l^{-1} (AOT40) entre la salida y puesta del sol (9 horas diarias) fue de $4028 \text{ nl l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, excediendo los niveles críticos para la protección del rendimiento de los cultivos UN-ECE, que es de 3000 nl l^{-1} (Tabla 3.1). Las medias mensuales de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%), y la radiación solar (W/m^2) en cámara (NF), fueron variables durante el periodo del cultivo, presentando una relación con el incremento de la concentración acumulativa del AOT40.

Tabla 3.1. Concentración acumulativa mensual de ozono ambiental (AOT40 $\text{nl l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) y las medias mensuales de variables climáticas de la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%) y radiación solar (W/m^2), en la cámara (NF), en la Estación Experimental de Carcaixent, durante experimento con (*Solanum tuberosum* L.). Los datos fueron registrados desde el 1 de Febrero hasta el 15 de Abril de 1999.

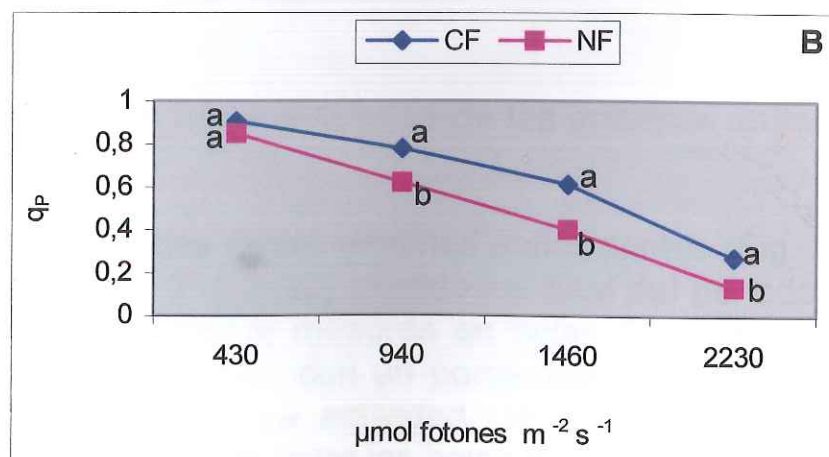
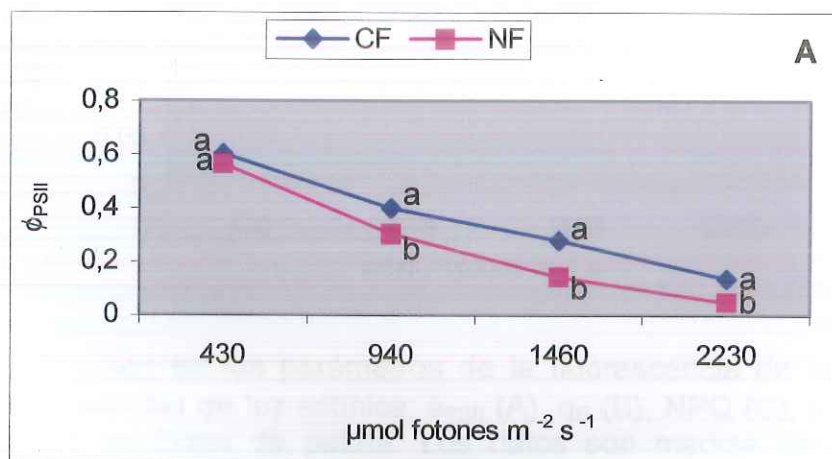
| Parámetro | Febrero | Marzo | Abril |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|
| AOT40 ($\text{nl l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) | 361 | 1900 | 1767 |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 9.10 ± 3.68 | 13.10 ± 1.30 | 16.64 ± 2.32 |
| H.R (%) | 58.92 ± 10.58 | 72.30 ± 15.39 | 60.13 ± 12.46 |
| R.S (W/m^2) | 165.00 ± 27.64 | 214.20 ± 86.24 | 271.00 ± 65.31 |

3.4.2 Análisis de la fluorescencia modulada de la clorofila a

La fluorescencia de la clorofila a fue analizada al final del periodo de cultivo. La eficiencia fotoquímica máxima después de la adaptación de las hojas a la oscuridad, estimada por el cociente F_v/F_m , no se afecta significativamente con el ozono ambiental. Las hojas crecidas en cámaras CF tienen cocientes F_v/F_m de 0.810 ± 0.023 , y las hojas crecidas en NF de 0.80 ± 0.037 . Este indica que las plantas crecidas en NF no presentan signos de fotoinhibición prolongada.

Los cambios en los parámetros de la fluorescencia en el último pulso de saturación de la cinética de la inducción de la fluorescencia con respecto a las diferentes intensidades de luz

actínica son mostrados en la Fig. 3.1. La eficiencia fotoquímica actual (ϕ_{PSII}) (Fig. 3.1A) y la fracción de los centros abiertos del PSII (q_P) (Fig. 3.1B) disminuyen cuando la intensidad de la luz se incrementa. Estos parámetros mostraron una significativa reducción en hojas de (NF) cuando se comparó con los tratamientos del control (CF). El parámetro NPQ (Fig. 3.1C) es considerado para ser un buen estimador de la cantidad de energía disipada no radiativamente por las plantas. NPQ se incrementó marcadamente a mayores intensidades de luz actínica. Los valores de NPQ fueron similares para todas las intensidades en ambos tratamientos, excepto en $1460 \mu\text{mol}$ de fotón $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad de luz actínica donde los valores entre las plantas de (NF) y (CF) mostraron diferencias significativas. El cociente entre la presión de excitación ($1-q_P$) y NPQ es una estimación del exceso de luz durante la inducción de la fotosíntesis. Los cambios en este cociente (Fig. 3.1D) indican que existe un exceso de fotones dentro de la hoja en el tratamiento (NF) para todas las intensidades de luz actínica.



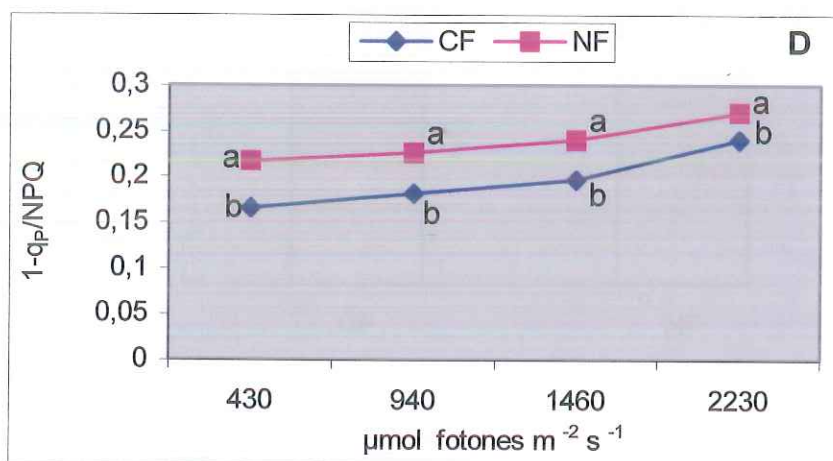
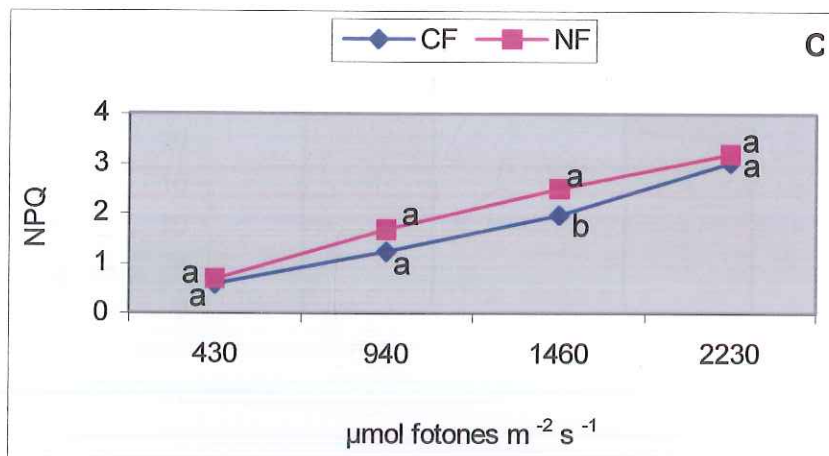


Figura 3.1. Cambios en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* diferentes intensidades de luz actínica: ϕ_{PSII} (A), q_P (B), NPQ (C), y el cociente $(1-q_P)/\text{NPQ}$ (D), en hojas de patata. Los datos son medias para $n=8$. Los símbolos en las gráficas seguidos por letras diferentes son estadísticamente diferentes en $p<0.05$ (LSD-test).

3.4.3 Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes

Las actividades de las enzimas antioxidantes (Fig. 3.2) de AP (Fig 3.2A) y SOD (Fig 3.2C) medidos al final del periodo de cultivo fueron significativamente menores en hojas de patata crecidas en NF que en hojas de CF, con un porcentaje disminuido del 25% y 36% respectivamente. La actividad GR (Fig 3.2B) no presentan diferencias significativas entre las hojas de las cámaras NF y CF.

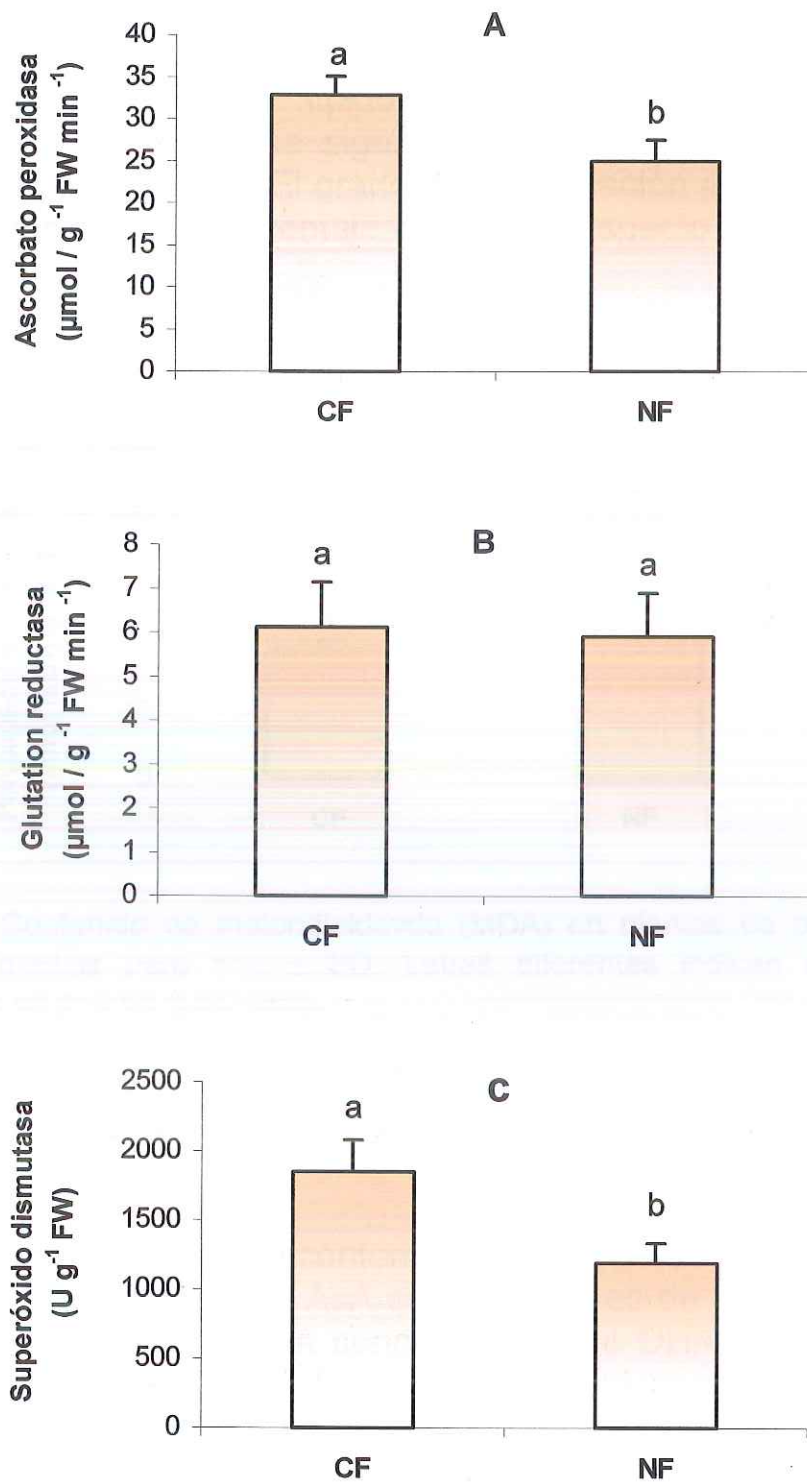


Figura 3.2. Actividades de las enzimas antioxidantes en hojas de patata para diferentes tratamientos (CF) y (NF). Los datos son medias para $n=4 \pm \text{SD}$. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p < 0.05$ (LSD-test).

3.4.4 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos (Fig. 3.3), medido como la concentración de MDA, fue significativamente más alta en hojas (NF) que en plantas (CF). El grado de peroxidación en plantas (NF) se incremento con un porcentaje del 102% respecto a las hojas de (CF).

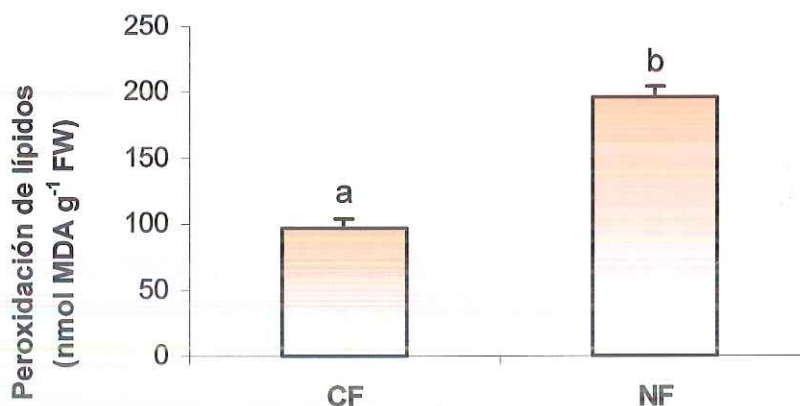


Figura 3.3. Contenido de malondialdeído (MDA) en plantas de patata. Los datos son medias para $n=5 \pm$ SD. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p<0.05$ (LSD-test).

3.4.5 Concentraciones de AsA y DHA

El ozono disminuye el contenido de AsA en las hojas crecidas en NF. La concentración de AsA en hojas CF es de 8 veces el que presentan las hojas (NF). La concentración de DHA fue mayor en hojas de (NF) que en (CF). El cociente AsA/TAA es mayor en hojas (CF) que en plantas (NF). Sin embargo, el contenido de ascorbato total (TAA) no difiere significativamente en plantas (CF) y (NF).

Tabla 3.2. Contenido de ascorbato (AsA), dehidroascorbato (DHA), y ascorbato total (TAA=AsA+DHA) ($\mu\text{g g}^{-1}$ FW) y el cociente AsA/TAA en plantas de patata crecidas en cámaras abiertas con filtros de carbón (CF) y plantas de patata crecidas en cámaras abiertas con aire no filtrado (NF). Los valores son medias de $n=4$, para la comparación de medias se utilizó el análisis de variancia (ANOVA) seguido por el test de la diferencia significativa mínima (LSD). La prueba se aplica al 95% ($p<0.05$) de significación. Valores indicados por la misma letra no difieren significativamente.

| Tratamiento | AsA | DHA | TAA | AsA/TAA | AsA/DHA |
|-------------|--------|---------|---------|----------|----------|
| CF | 59.2 a | 131.1 a | 190.3 a | 0.3120 a | 0.451 a |
| NF | 7.0 b | 188.0 b | 195.0 a | 0.0359 b | 0.0372 b |

3.5 DISCUSIÓN

Los estreses medio ambientales afectan a las plantas en los procesos fotosintéticos, con una disminución de la conversión cuántica fotosintética y un incremento de la fluorescencia y de la energía disipada en forma de calor (Lichtenthaler, 1996). En la presente investigación, se estudió el efecto de las concentraciones ambientales de ozono y su repercusión en los procesos fotosintéticos en hojas de patata por las técnicas de la fluorescencia de la clorofila y sobre las actividades de las enzimas antioxidantes, concentración de ascorbato y peroxidación de lípidos para conseguir una mejor comprensión de los efectos de ozono en las plantas de patata variedad Obelix, ampliamente cultivada en la Comunidad Valenciana.

Las hojas de los tratamientos NF no demuestran signos de fotoinhibición, tal y como se demuestra por el cociente F_v/F_m que no presenta cambios después de 30 minutos de adaptación a la oscuridad. Después de la inducción fotosintética de la cinética en la luz, las hojas (NF) presentan una disminución en la eficiencia cuántica actual del transporte no-cíclico de electrones (ϕ_{PSII}) en los valores finales de los pulsos de saturación (después de 15 minutos de inducción) para todas las intensidades de luz actínica. En adición, los bajos niveles de q_p encontrados en plantas (NF) indican que experimentan una mayor presión de excitación sobre el PSII indicando que algunos centros de reacción fueron cerrados en la luz. Cuando las plantas crecen bajo condiciones adversas, la activación de los procesos de atenuación permiten a la planta

modular sus reacciones fotoquímicas primarias, como consecuencia el ϕ_{PSII} puede ser limitado, y de este modo prevenir la sobre-reducción de los transportadores de electrones (Foyer et al., 1994). Una disminución en la relación fotoquímica del PSII permite el desarrollo de la atenuación no-fotoquímica. La atenuación no-fotoquímica (NPQ) es considerada para ser una buena estimación de la cantidad de energía disipada no radiativamente por las plantas. En plantas (NF) una mayor proporción de fotones absorbidos es perdida como calor. El cociente $(1-q_p)/NPQ$ relaciona los valores entre la presión de excitación y atenuación no-fotoquímica asociada con un exceso de luz durante el proceso fotosintético. En hojas (NF) este cociente fue mayor que en (CF), indicando la presencia de un exceso de fotones debido a que los valores de la presión de excitación ($1-q_p$) no fueron suficientemente bajos en plantas (NF) y/o los valores de NPQ no fueron suficientemente altos para disminuir este cociente. El valor de NPQ puede estar afectado por la concentración de ascorbato, este metabolito es específicamente requerido para la síntesis de la zeaxantina en el ciclo de la xantofilas indispensable para la disipación del exceso de energía de excitación desde los pigmentos de la clorofila (Foyer et al., 1991; Pfünfel y Bilger, 1994; Demmig-Adams et al., 1995; Calatayud et al., 1999). En adición, el ascorbato juega un importante papel como antioxidante de las células. En nuestras condiciones experimentales la concentración de ozono afectó la concentración endógena de AsA en hojas (NF) respecto a las plantas (CF), esta disminución en el contenido de AsA puede ser una consecuencia del estrés oxidativo prolongado. Una disminución en el pool de AsA por los contaminantes ha sido documentada por Castillo y Greppin (1988); Luwe (1996); Wellburn et al., (1996); Herrero-Martínez et al., (2000) y Turcsányi et al., (2000). Además, los niveles de DHA se incrementaron a expensas de la forma de AsA reducida, sin embargo, el TAA no fue modificado. El cociente AsA/DHA en la célula depende principalmente de dos hechos, la biosíntesis del ascorbato y los procesos de oxi-reducción de AsA (Arrigoni, 1994). Este cociente disminuye severamente en hojas (NF), indicando que la acumulación de AOS en la célula presumiblemente excede la capacidad de regeneración de AsA. Este hecho podría explicar la baja actividad de AP en plantas (NF), el cual es altamente sensible a la presencia del ascorbato (Grodén y Beck, 1979).

El ozono en el interior de la hoja se degrada en superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y oxígeno singlete que reaccionan con las moléculas biológicas (Foyer et al., 1994). El H_2O_2 es eliminado por el AP, pero si la actividad enzimática es baja, este compuesto puede acumularse en la célula y puede causar la inactivación de la SOD produciendo una inhibición de las enzimas del ciclo de Calvin (Tanaka et al., 1985). Este hecho podría explicar la menor actividad de la SOD encontrada en hojas (NF) respecto a plantas (CF). En el experimento se observó que la actividad de la glutatión reductasa no cambia bajo los tratamientos de (NF), es posible que la actividad de GR en hojas de plantas de patata puede ser suficiente para permitir el normal funcionamiento de este enzima.

Por otra parte, el ozono o el AOS altera las propiedades de la membrana, modifica el rendimiento de la fluorescencia y actividades de las enzimas antioxidantes u otros procesos metabólicos de la célula (Price et al., 1990; Ranieri et al., 1996; Calatayud et al., 2000; Calatayud y Barreno, 2000). Los datos obtenidos por el análisis TBARS parecen confirmar mayores niveles de peroxidación de la membrana en hojas de (NF) comparadas a (CF). El contenido de MDA ha sido correlacionado con el grado de exposición de O_3 en plantas vasculares (Price et al., 1990; Yoshida et al., 1994; Ranieri et al., 1996).

En conclusión, el ozono ambiental induce alteraciones en las reacciones de la fotosíntesis. Las hojas (CF) presentan mayor fracción de energía absorbida la cual es utilizada en la conversión cuántica fotosintética mientras los procesos de de-excitación por la emisión de calor son similares en las hojas de las plantas de patata en (CF) y (NF). Por otra parte, el ozono y/o los productos derivados de este contaminante, hacen disminuir el pool de AsA y de las actividades de las enzimas antioxidantes, los cuales no pueden actuar en la neutralización de las especies tóxicas de oxígeno como se demuestra por el incremento en la peroxidación de lípidos en hojas de (NF), repercutiendo en una disminución del rendimiento fotosintético.



Foto 1. Patata Var. Obelix crecida en cámara CF sin síntomas visibles.



Foto 2. Patata var. Obelix crecidas en cámaras NF con algunos síntomas visibles.



Foto 3. Hojas de patata
crecida en cámara NF
con síntomas visibles.



Foto 4. Hoja de patata
con síntomas visibles.

4. VALORACIÓN DE LOS EFECTOS DEL OZONO AMBIENTAL SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DEL (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cv. TINY TIM DESPUÉS DE APLICAR BENOMILO.

4.1 RESUMEN

El fungicida benomilo ha sido descrito en la bibliografía como un antioxidante. Los objetivos del estudio eran constatar los efectos de la aplicación foliar de este compuesto en presencia del ozono ambiental en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cv. Tiny Tim en cámaras abiertas (OTC's). La valoración de los efectos se estudió a través del ensayo de las enzimas antioxidantes, peroxidación de lípidos y medidas de la fluorescencia de la clorofila. Se emplearon cuatro tratamientos: 1) cámaras filtradas sin benomilo, como control (CF-), 2) cámaras filtradas con benomilo (CF+), 3) cámaras no filtradas con benomilo (NF+), 4) cámaras no filtradas sin benomilo (NF-) y cada tratamiento estuvo constituido por 5 plantas. El benomilo fue aplicado a una dosis de 0.5 g/l, pulverizando las hojas cada 7 días después de la puesta del sol, hasta el final del periodo de cultivo.

Los resultados nos indican, que los parámetros de la fluorescencia experimentaron cambios, como consecuencia de la pulverización con benomilo y la presencia de O₃. La eficiencia fotoquímica actual (ϕ_{PSII}) y el coeficiente de la atenuación fotoquímica (q_p), disminuyeron gradualmente con respecto a las diferentes intensidades de la luz actínica; en el tratamiento (NF-) esta disminución es mayor. La atenuación no-fotoquímica (NPQ) experimentó un rápido incremento respecto a las diferentes intensidades de luz actínica, el tratamiento (NF-) registró un mayor incremento significativo respecto a los demás tratamientos. Las actividades enzimáticas de la ascorbato peroxidasa (AP) y glutathion reductasa (GR) no fueron significativamente afectadas y la actividad del superóxido dismutasa (SOD) disminuyó en el tratamiento (NF-). La peroxidación de lípidos se incrementó en el tratamiento (NF-) y fue significativamente diferente respecto a los demás tratamientos. La aplicación de benomilo disminuyó la peroxidación de lípidos de membrana y la actividad de las enzimas antioxidantes en las

plantas crecidas en la cámara NF+. Las plantas que fueron tratadas con benomilo en condiciones de ozono ambiental (NF+) presentan un bajo estrés oxidativo similar al obtenido para las plantas CF+ o CF-, como resultado de esta protección, una gran fracción de la energía absorbida, fue utilizada en los procesos de la fotosíntesis en plantas de tomate variedad Tiny Tim.

4.2 INTRODUCCIÓN

El ozono troposférico es uno de los principales contaminantes del aire en muchas partes del mundo (Lefohn, 1992), y las concentraciones ambientales pueden producir efectos fitotóxicos sobre las plantas y árboles, manifestándose en daño foliar, reducción de la biomasa, alteración del cociente raíz/tallo, y reducción de la actividad fotosintética. En las últimas décadas, especialmente desde los años 70, la concentración de ozono troposférico de la cuenca Mediterránea se ha incrementado alcanzando niveles que pueden considerarse fitotóxicos, superando el umbral de protección a la vegetación (Porcuna, 1999). Las evidencias confirman que los fotooxidantes, y especialmente el ozono se muestran como un problema que afecta a toda la cuenca del Mediterráneo coincidiendo su incremento con la industrialización de la cuenca occidental Mediterránea (Sandroni et al., 1994). Algunos daños aparecidas en la horticultura Mediterránea, se han podido relacionar con las elevadas concentraciones de este contaminante, en los cuales los niveles del O₃ ambiental durante la primavera y verano exceden los niveles críticos de las directrices para la protección de la vegetación de la UN-ECE (Gimeno et al., 1999).

La toxicidad del ozono es causada por su potencial redox (+2.07 V), el ozono después de penetrar en el interior de la hoja a través de los estomas reacciona con las biomoléculas con la formación de especies de oxígeno reactivo y tóxico (ROS), tal como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), radical superóxido (O₂⁻) y radical hidroxilo (OH·), los cuales deterioran muchos de los procesos metabólicos celulares (Wolf et al., 1986; Mehlhorn et al., 1990; Batini et al., 1995).

La fotosíntesis ha sido demostrada para ser particularmente sensible al O₃, produciéndose una variedad de efectos: desde el cierre de los estomas, inhibición de uno o más pasos en la fijación de CO₂ ó disminución en la relación del transporte de electrones (Hill y Littlefield, 1969; Moldau et al., 1993; Guidi et al., 1999). El plasmalema es probablemente el primer lugar de acción del O₃, y como resultado modifica la estructura, función y altera la permeabilidad de las membranas, produciéndose cambios en las relaciones iónicas y en los solutos de los componentes celulares, que pueden alterar el metabolismo fotosintético (Heath, 1988). El cambio en la permeabilidad de la membrana es causado por la destrucción de la integridad de la membrana plasmática a causa de la oxidación de grupos sulfidrílicos proteicos y/o lípidos.

La necesidad de prevenir los efectos negativos que causa el O₃ sobre las plantas, se ha planteado la búsqueda de componentes químicos efectivos con la finalidad de neutralizar la fitotoxicidad inducidos por O₃. Un gran número de antioxidantes han sido evaluados para evitar los daños causados por el O₃ o contaminantes oxidantes del ambiente sobre los vegetales (Kendrich et al., 1962; Manning et al. , 1974; Carnahan et al., 1978, Ormrod y Beckerson, 1986; Pleijel et al., 1999).

El fungicida sistémico benomilo (methil-1-(butylcarbamoil)-2-bezimidazole carbamate) ha sido demostrado que protege a las plantas de los efectos del O₃ (Manning y Krupa, 1992). El componente activo es un bezimidazole, el cual es conocido para retrasar el inicio de la senescencia en las plantas. En otros trabajos de investigación, el benomilo ha sido reportado de su efectividad en la supresión de los daños de O₃ en *Nicotiana tabacum*, *Phaseolus vulgaris*, *Petunia híbrida*, *Azalea sp* y *Poa annua* (Reinert y Spurr, 1972; Taylor, 1970; Mannig et al. , 1974; Moyer et al., 1974).

En el presente trabajo de investigación se ha estudiado el efecto del benomilo sobre la variedad de tomate Tiny Tim, la cual ha sido descrita como sensible al ozono (Manning y Krupa, 1992; Legassicke y Ormrod, 1981) usando cámaras abiertas (OTC's) en dos ambientes, con filtros de carbón (CF) y sin filtros de carbón (NF).

El objetivo planteado fue: determinar algunos efectos fisiológicos de la aplicación del fungicida benomilo del cual se habían descrito propiedades antioxidantes, en presencia del ozono ambiental en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*), en cámaras abiertas, con el fin de poder constatar su eficacia para paliar los efectos del ozono en dicho cultivo. Para conseguir este objetivo se utilizaron como técnicas la fluorescencia de la clorofila a, actividades de las enzimas antioxidantes, y peroxidación de lípidos.

4.3 MATERIALES Y METODOS

4.3.1 Material planta

Para la realización del experimento se emplearon semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) de la variedad Tiny Tim que fueron suministradas por la Universidad de Carolina del Norte (USA). El 4 de Mayo de 1999, las semillas fueron sembradas en un invernadero de polietileno, ubicado en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (Valencia), usando como sustrato vermiculita. Con fecha 5 de Junio de 1999, se realizó el transplante en unos envases de plástico conteniendo una mezcla de suelo comercial (Terraplant, BASF, Ucht, Germany) y transferidos dentro de las cámaras abiertas (OTC's), empleando un diseño completamente aleatorio con cuatro tratamientos y tres réplicas. Dentro de las OTC's se dispusieron de cinco plantas por tratamiento. El periodo de crecimiento tuvo una duración de 100 días y durante este periodo las plantas de tomate fueron regadas diariamente. Las concentraciones del ozono ambiental, son expresadas como AOT40 (nl l^{-1}).

4.3.2 Contaminación del aire y las cámaras abiertas

En la sección 3.3.2, capítulo 3, se detallan las características de los tratamientos, tiempo de fumigación y registro de los contaminantes.

4.3.3. Tratamiento benomilo

El benomilo (benomilo, DuPont) fue empleado como spray foliar. La dosis aplicada fue de 0.5 g/l, pulverizándose las hojas, cada siete días después de la puesta del sol, hasta el final del periodo de cultivo. Cada OTC's contenía cinco macetas con plantas de tomate. Las OTC's fueron divididas en dos grupos: a) 4 OTC's (CF), de los cuales 2 OTC's CF+ (con aplicación de benomilo) y 2 OTC's CF- (sin aplicación de benomilo) y b) 4 OTC's (NF); 2 OTC's NF+ (con aplicación de benomilo) y 2 OTC's NF- (sin benomilo). El benomilo fue administrado después de dos semanas de permanencia en las OTC's (periodo de aclimatación). Se realizó cuatro grupos de tratamientos: 1) control, CF-; 2) CF+ con benomilo; 3) NF- sin benomilo; 4) NF+ con benomilo.

4.3.4. Medidas de la fluorescencia de la clorofila *a*

Fue realizada siguiendo los protocolos descritos en la sección 3.3.3, capítulo 3. Además, se calculó el cociente de la disminución de la fluorescencia (f_d ; desde F_m al estado estable de la fluorescencia F_s ($Rfd = F_d/F_s$), como un indicador de la conversión cuántica fotosintética potencial (Lichtenthaler y Buschmann, 1987), Este cociente fue calculado solamente en la luz actínica ($430 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

4.3.5 Métodos analíticos de las enzimas antioxidantes

Las enzimas ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa fueron determinados siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.4, capítulo 3. El ensayo enzimático fue realizado al final del cultivo.

4.3.6 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.5, capítulo 3.

4.4.RESULTADOS

4.4.1 Calidad del aire

Las lesiones inducidas por el ozono ambiental se presentaron con moteaduras rojizas y necróticas afectando las zonas internerviales en el haz de la hoja, siendo más afectadas las hojas más viejas (ver fotos al final del capítulo).

Al finalizar el periodo de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) cv. Tiny Tim, los valores de las concentraciones de los contaminantes, correspondientes al SO₂ y NO_x fueron considerados bajas, registrándose valores menores de 2 nl l⁻¹ para el SO₂ y 5 nl l⁻¹ para el NO_x para una media de 24 horas en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (Valencia). Durante el periodo de crecimiento, las concentraciones del ozono ambiental, AOT40, al final del periodo de cultivo fue de 10766 nl l⁻¹ h en las cámaras NF, excediendo los niveles críticos para la protección del rendimiento de los cultivos UN-ECE (3000 nl l⁻¹ h⁻¹) registrándose la mayor concentración en el mes de Julio con 5502 nl l⁻¹ (Tabla 4.1). Los valores medios mensuales de la temperatura (°C), humedad relativa (%), y la radiación solar (W/m²) fueron variables durante el desarrollo del periodo de cultivo.

Tabla 4.1. Concentración acumulativa del ozono ambiental, expresado en AOT40 (nl l⁻¹ h⁻¹) y los valores medios mensuales de las variables climáticas en cámara (NF), los datos se registraron a partir del 5 de Junio al 13 de Septiembre de 1999 en la Estación Experimental Agraria Carcaixent durante el experimento con (*Lycopersicon esculentum Mill*).

| Parámetros | Junio | Julio | Agosto | Septiembre |
|---|-------------|--------------|--------------|--------------|
| AOT40 (nl l ⁻¹ h ⁻¹) | 2793 | 5502 | 1276 | 1195 |
| T (°C) | 22.90±1.87 | 25.66±1.13 | 27.40±3.11 | 22.80±2.01 |
| H.R (%) | 70.00± 9.15 | 73.00± 4.88 | 76.00± 4.76 | 70.00±9.42 |
| R.S (W/m ²) | 312.00±55.6 | 300.00±38.38 | 309.00±46.66 | 276.00±47.35 |

4.4.3 Análisis de la fluorescencia de la clorofila a

La fluorescencia de la clorofila a fue analizada al final del periodo de crecimiento. La eficiencia fotoquímica máxima después de un periodo de adaptación a la oscuridad (Tabla 4.2), estimado por el cociente F_v/F_m , fue afectada por la exposición del aire ambiente con alta concentración de O_3 en NF- con diferencias significativas, respecto a los demás tratamientos. Los porcentajes de disminución respecto a NF+ son del 11% y del 13% respecto a CF- o CF+. La disminución de este cociente es debido a una disminución significativa en el parámetro de la fluorescencia F_m , relacionado con la reducción máxima del pool del aceptor de electrones primarios del PSII, Q_A . Por el contrario, el nivel mínimo del rendimiento de la fluorescencia para la hoja adaptada a la oscuridad (F_o), permaneció sin cambios en todos los tratamientos.

Tabla 4.2. Parámetros de la fluorescencia de la clorofila a: F_o , F_m y F_v/F_m en tomate cv. Tiny Tim con benomilo (+) y sin benomilo (-) en cámaras filtradas (CF) y sin filtrar (NF). Los datos son valores medios para $n=10$. Las letras diferentes indican diferencias significativas al 0.05%.

| Tratamientos | CF+ | CF- | NF+ | NF- |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| F_o | 0.281 a | 0.275 a | 0.277 a | 0.265 a |
| F_m | 1.125 a | 1.140 a | 1.041 a | 0.807 b |
| F_v/F_m | 0.751 a | 0.751 a | 0.737 a | 0.656 b |

Los cambios en los parámetros de la fluorescencia en el último pulso de saturación de la cinética de la inducción de la fluorescencia respecto a las diferentes intensidades de luz actínica se presentan en la Fig. 4.1. La eficiencia fotoquímica actual (ϕ_{PSII}) (Fig. 4.1A), la fracción de los centros del PSII (q_p) (Fig. 4.1B) experimentaron una disminución gradual respecto a las diferentes intensidades de la luz actínica. Estos parámetros mostraron una reducción significativa en hojas NF- en comparación con el resto de los tratamientos. El parámetro NPQ (Fig. 4.1C) es considerado para ser una buena estimación de la cantidad de energía disipada no radiativamente por las plantas. Inmediatamente de la iluminación actínica, NPQ experimentó un rápido aumento, este incremento es dependiente de la intensidad de la luz actínica y el incremento es mayor para todas las intensidades en el tratamiento NF-.

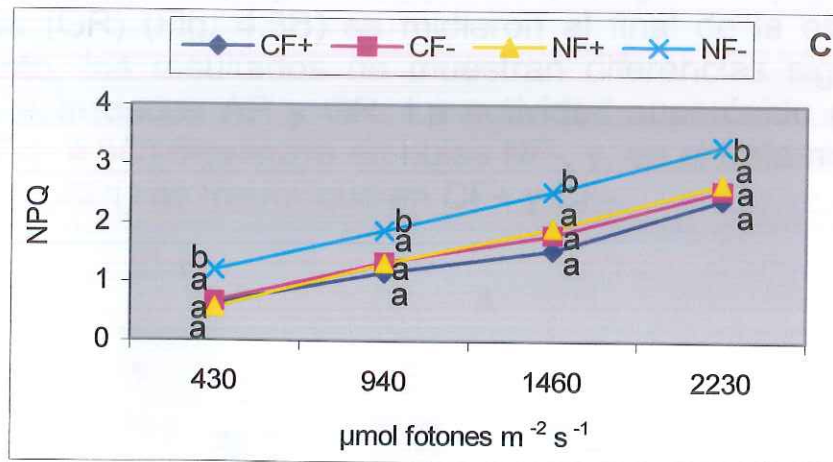
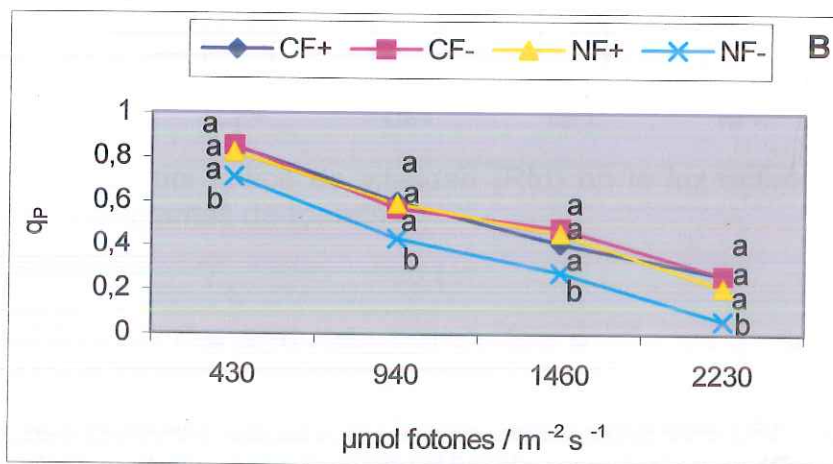
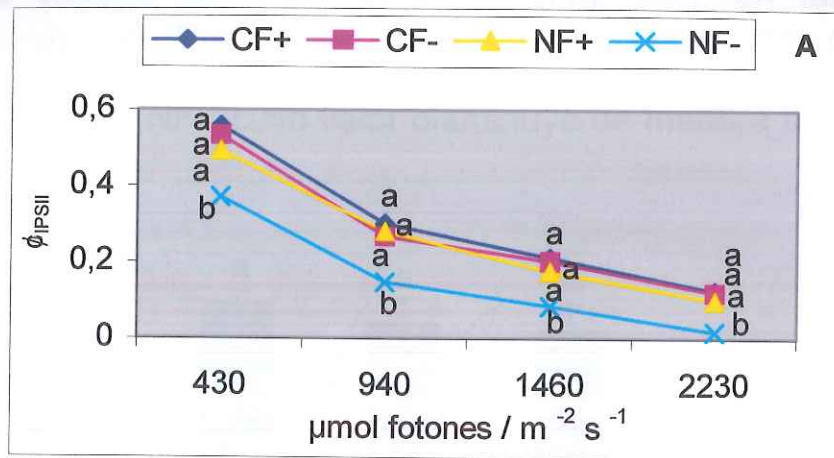


Figura 4.1. Cambios en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila en diferentes intensidades de luz actínica, son mostrados a través de los parámetros ϕ_{PSII} (A), qP (B), y NPQ (C) en hojas de tomate var. Tiny Tim. Los datos son valores medios para $n=8$. Los símbolos en las gráficas seguido por letras diferentes son estadísticamente diferentes a $p<0.05$ (LSD-test).

Los valores del parámetro Rfd (Fig. 4.2), en las plantas crecidas en los tratamientos: CF+, CF-, NF+, no presentan diferencias significativas en comparación con las plantas crecidas en el tratamiento NF-, cuyo valor disminuye de manera significativa.

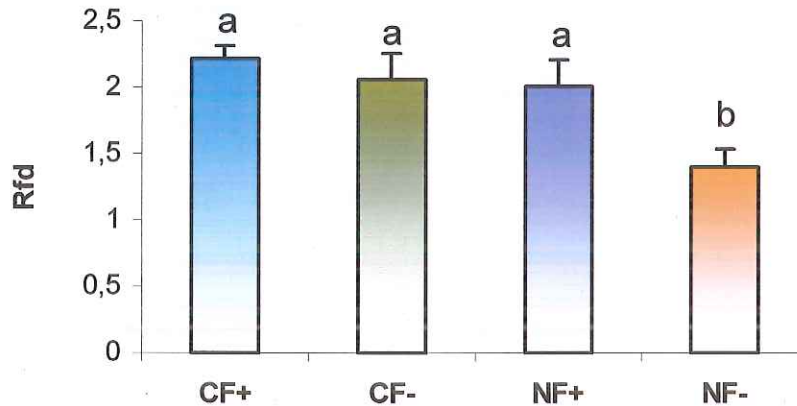
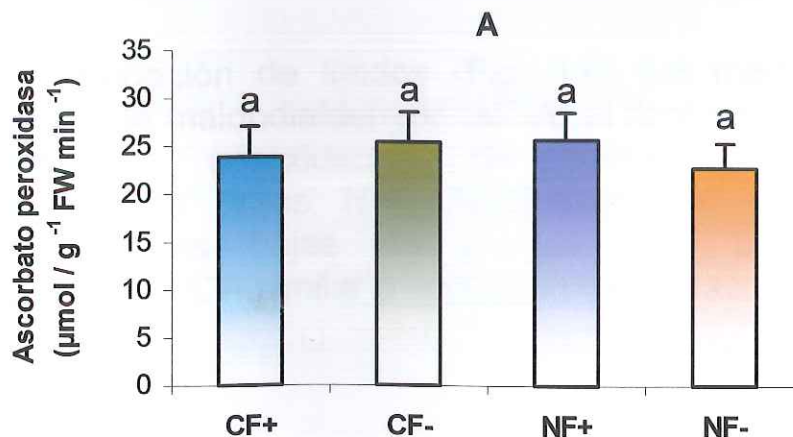


Figura 4.2. Valores del índice de vitalidad (Rfd) en la luz actínica ($430 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en plantas de tomate.

4.4.4 Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes

Las actividades de las enzimas antioxidantes (AP, GR, SOD) fueron medidas al final de la estación de crecimiento (Fig. 4.3). Las actividades ascorbato peroxidasa (AP) (Fig. 4.3A) y glutathion reductasa (GR) (Fig. 4.3B) se midieron al final de la estación de crecimiento, los resultados no muestran diferencias significativas para las actividades AP y GR. La actividad superóxido dismutasa (SOD) (Fig. 4.3C) disminuyó en hojas NF-, y, en el tratamiento NF+, la actividad SOD es mayor que en CF+ y CF-.



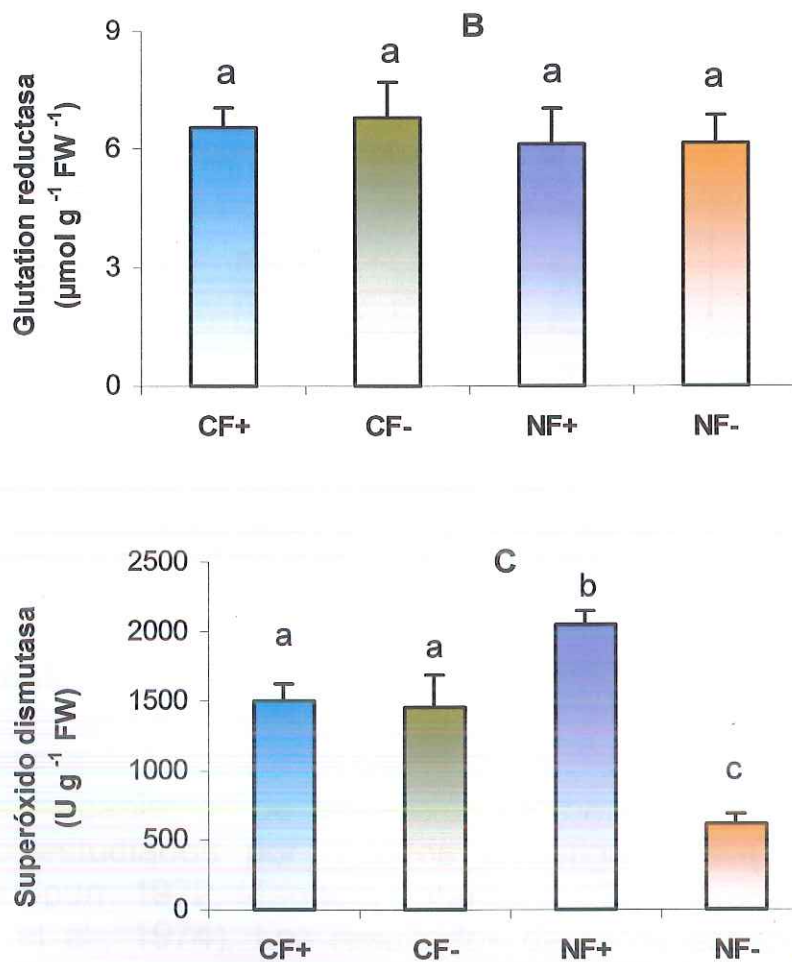


Figura 4.3. Actividades de las enzimas antioxidantes en hojas de tomate para diferentes tratamientos (CF+), (CF-), (NF+), y (NF-). Los datos son valores medios para $n=4 \pm SD$. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p < 0.05$ (LSD-test).

4.4.5 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos (Fig. 4.4) fue medida como la concentración de malondialdehído (MDA) al final de la estación de crecimiento. La peroxidación de lípidos se incrementó marcadamente en hojas NF-. Adicionalmente, los resultados muestran que las hojas de plantas NF+ presentan una concentración de MDA similar a la obtenida en hojas CF+ y CF-.

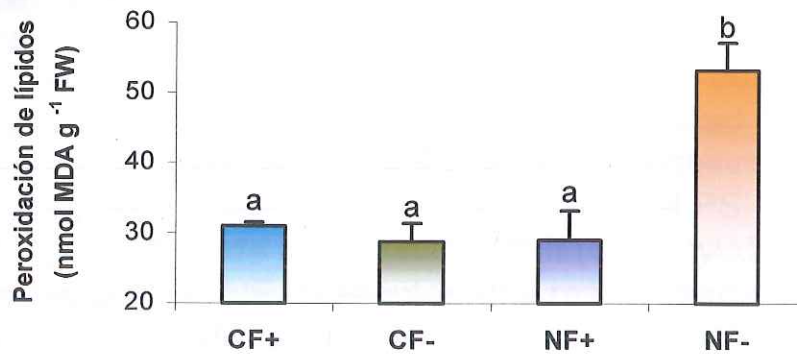


Figura 4.4. Contenido de malondialdehído (MDA) en plantas de tomate. Los datos son valores medios para $n=5 \pm$ SD. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p<0.05$ (LSD-test).

4.5 Discusión

Los mecanismos de protección del benomilo contra el ozono han sido estudiados por muchos investigadores (Taylor, 1970; Reinert y Spurr, 1972, Manning y Vardaro, 1973; Moyer et al., 1974; Manning et al., 1974). Los resultados de estos estudios están en concordancia con este trabajo, en el cual, el benomilo se ha mostrado efectivo en la prevención del daño inducido por el ozono a la planta, el cual podría ser evaluado por la disminución de la peroxidación de lípidos, mayor cociente F_v/F_m , y mayor ϕ_{PSII} , q_P y cociente Rfd. El análisis de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* en plantas de tomate cv. Tiny Tim presentó diferencias respecto a la calidad del aire y al tratamiento con benomilo. El cociente F_v/F_m indica la eficiencia fotoquímica máxima del PSII y una disminución en este parámetro es un signo de fotoinhibición (Krause, 1988). En plantas crecidas NF- este cociente disminuyó, con diferencias significativas, lo cual indica que las plantas son más sensibles a la luz. Los bajos valores observados en F_v/F_m , fueron principalmente como resultado de la disminución en el nivel de F_m , el cual indica que la capacidad de reducción de la Q_A fue deteriorada por el O_3 . Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Deltoro et al., (1999) en líquenes y Guidi et al., (1997), Ciompi et al., (1997) en plantas. El nivel de F_m en hojas NF+ no fue significativamente diferente al obtenido para CF+ o CF-, aunque el cociente F_v/F_m fue ligeramente menor. La reducción en

F_m esta relacionada con un incremento en la atenuación no-fotoquímica (NPQ) y/o una disminución en la atenuación fotoquímica (q_p) (Reiling y Davinson, 1994). Los bajos niveles de q_p exhibidos por las plantas NF- comparados con los otros tratamientos indican que el O_3 disminuyó la capacidad para reoxidar la Q_A durante la iluminación actínica. Esto significa que el O_3 incrementó la presión de excitación ($1-q_p$) sobre el PSII y contribuyó al cierre de los centros de reacción del PSII (Calatayud et al., 1999). En adición, las plantas NF- presentan una mayor pérdida de fotones absorbidos en forma de calor, indicado por el aumento para todas las intensidades de luz actínica del parámetro NPQ. El incremento en NPQ redujo el rendimiento cuántico fotoquímico del PSII, y consecuentemente disminuyó la eficiencia cuántica del transporte no-cíclico de electrones (ϕ_{PSII}). Por otra parte, el valor de Rfd es un indicador potencial de la conversión cuántica fotosintética y de la vitalidad de las plantas, que fue más bajo en hojas NF-, pero un incremento en el cociente Rfd en planta NF+ indicó un incremento potencial de la actividad fotosintética después de aplicado el benomilo. En resumen, los parámetros de la fluorescencia en plantas NF+ fueron similares al control, estos resultados indican que el benomilo incremento la protección al PSII. Los cambios en el rendimiento de la fluorescencia en hojas NF- pueden estar asociados a cambios en la permeabilidad de la membrana, los datos obtenidos por el análisis de TBARS parecen confirmar esta idea de un aumento en la peroxidación de lípidos de membrana. Las plantas NF- mostraron un incremento en MDA, el cual representa el estado de peroxidación de lípidos de membrana y ha sido demostrado que esta correlacionado con el grado de exposición de ozono (Price et al., 1990; Yoshida et al., 1994; Ranieri et al., 1996). Los radicales de oxígeno activo han sido propuestos como los iniciadores de la peroxidación de lípidos (Elstner, 1988; Winston, 1990). La concentración de MDA en plantas NF+ no muestran diferencias significativas con CF+ o CF-, estos resultados indican que el benomilo puede proporcionar protección a las plantas por disminuir el estrés oxidativo inducido por los oxidantes.

Una mayor actividad de los enzimas antioxidantes puede ayudar a la protección de las plantas frente al estrés oxidativo (Lee et al., 1984; Bowler et al., 1992; Brunschon-Harti et al., 1995; Asada, 1997). Sin embargo, en el presente estudio no hay diferencias significativas en las actividades de AP y GR entre tratamientos. Solamente en la actividad SOD hay diferencias, en

plantas NF-, la actividad de SOD fue más baja que en CF+ o CF-, estos resultados pueden ser debidos a la alta concentración de H₂O₂ que inhibió la actividad de SOD (Tanaka et al., 1982). La inducción de la actividad de SOD en NF+ respecto a CF+ o CF- puede ser explicadas en términos del tratamiento con benomilo, el incremento de la actividad puede aliviar el estrés oxidativo. Una posible explicación de la actividad SOD en plantas CF+ y CF-, es que estas plantas no presentan ningún estrés oxidativo y el tratamiento benomilo no muestra su función. Sin embargo, hay publicaciones científicas conflictivas respecto a los efectos de O₃ sobre la actividad de las enzimas antioxidantes (Bowler et al., 1992; Lyons et al., 1999). Diversos cultivares de espinaca con diferentes sensibilidades al O₃ fueron examinados, pero no se encontró una clara correlación entre la resistencia y niveles de ascorbato, glutation, SOD, catalasa, ascorbato peroxidasa, glutation reductasa (Tanaka et al., 1985).

En resumen, el presente estudio suministra una explicación parcial de los efectos de la adición de benomilo en presencia de ozono ambiental en plantas de tomate Tiny Tim. La aplicación de benomilo en plantas NF+ previene la peroxidación de lípidos de membranas, lo cual permite que una mayor fracción de la energía de la luz absorbida vaya a la conversión cuántica fotosintética (mayor flujo de electrones mediado por el PSII y mayor fracción de los centros de reacción abierto del PSII), mientras la de-excitación por la emisión de calor (NPQ) y la emisión de la fluorescencia de la clorofila fueron bajas comparados con los resultados obtenidos en las plantas NF-. Los valores de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila y de la concentración de MDA fueron similares en NF+, CF+ y CF-. El benomilo tienen el potencial para mejorar el estrés oxidativo inducido por ozono en las plantas del cultivo del tomate. Otros trabajos experimentales deben ser realizados para confirmar la función de las enzimas antioxidantes en los mecanismos protectores.



Foto 1. Tomate variedad Tiny Tim crecida en cámara CF.



Foto 2. Tomate variedad Tiny Tim crecida en cámara NF con síntomas visibles.



Foto 3. Detalle de los síntomas en hojas de tomate variedad Tiny Tim crecida en cámara NF.



Foto 4. Hojas de tomate variedad Tiny Tim con síntomas, crecidas en cámara NF.

5. EFECTO DE OZONO EN EL CULTIVO DE LECHUGA (*Lactuca sativa* L.) cv. CANDELE R7.

5.1 RESUMEN

El impacto del ozono fue estudiado en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Candele R7 en cámaras abiertas a través de las técnicas del intercambio gaseoso, fluorescencia modulada de la clorofila *a*, actividad de las enzimas antioxidantes, concentración de ascorbato y peroxidación de lípidos de membrana. Este experimento fue diseñado para determinar el efecto de tres calidades del aire: aire libre de O₃ (CF), aire ambiente (NF), aire ambiente más una dosis conocida de O₃ (NF+O₃) sobre el cultivo de lechuga.

Los resultados mostraron que las altas concentraciones de O₃, a los 90 días del periodo de crecimiento, disminuyen la absorción de CO₂, conductancia estomática, tasa de transpiración e incrementa la concentración de CO₂ intercelular. Además, los procesos dependientes de la integridad de la membrana tilacoidal, como el rendimiento cuántico fotoquímico (ϕ_{PSII}) asociado al transporte no-cíclico de electrones y la fracción de los centros abiertos del PSII (q_P), experimentaron una reducción significativa en plantas NF+O₃ a los 90 días. Los valores de la atenuación no-fotoquímica (NPQ), se incrementaron a los 60 días en todos los tratamientos. A los 90 días de crecimiento, el parámetro NPQ en las plantas NF+O₃ disminuye significativamente con relación a los demás tratamientos. La concentración de ascorbato fue mayor en el tratamiento CF que en las hojas NF+O₃. La actividad del enzima ascorbato peroxidasa disminuye en plantas NF+O₃, la actividad de la glutatión reductasa no se modifica en ningún tratamiento de la calidad de aire y la actividad de la superóxido dismutasa se incrementa significativamente en plantas NF+O₃ con relación a los demás tratamientos.

5.2 INTRODUCCIÓN

El ozono es un gas fitotóxico secundario que afecta a las plantas. La respuesta biológica de las plantas al estrés por ozono

depende de un gran número de factores, incluyendo especies, etapas de desarrollo del cultivo y condiciones ambientales (Cooley y Manning, 1987; Krupa y Kickert, 1987). La respuesta biológica de la planta es la culminación de una serie de eventos físicos, bioquímicos y fisiológicos, que se inicia con la absorción de los contaminantes por los estomas y finaliza con el desarrollo de los efectos biológicos sobre la planta. El efecto tóxico de ozono, ocurre solamente, si una cantidad suficiente alcanza los lugares celulares dentro de la planta. Tres factores biológicos controlan el paso del O_3 al interior de la hoja: 1) los estomas a través de los cuales se difunde el ozono dentro de la hoja, y van a ejercer un control sobre la difusión, 2) la presencia y/o el nivel de actividad del sistema de detoxificación, 3) la capacidad de las células de las plantas para reparar y/o compensar los daños por ozono (Tingey y Taylor, 1982).

La interacción de ozono con los procesos celulares puede ser medida como respuestas biológicas, que incluyen la capacidad de realizar la fotosíntesis, valores de conductancia estomática, detección de la senescencia prematura, daño foliar, modificación del nivel de los metabolitos antioxidantes o alteración en la actividad de las enzimas antioxidantes, entre otros procesos. En condiciones fisiológicas normales, el crecimiento y rendimiento de los cultivos, se encuentran relacionado con los procesos de la absorción, biosíntesis y transducción, y una alteración en uno de estos procesos, puede conducir a una reducción en el crecimiento y rendimiento si el proceso es una relación limitante.

Por otra parte, las plantas no parecen ser igualmente sensibles a la exposición de ozono en toda la etapa de su ciclo de vida. El follaje de la planta es más sensible a la exposición de ozono justo antes o en el máximo desarrollo de la hoja (US-EPA, 1978). Hay evidencias, que muchas zonas rurales del Mediterráneo están sufriendo un problema crítico con los oxidantes fotoquímicos (Gimeno et al., 1999; Calatayud y Barreno., 2001). Para caracterizar los niveles de contaminación que producen efectos sobre las plantas de lechuga, los experimentos se llevaron a cabo en cámaras abiertas y las plantas estuvieron expuestas a concentraciones reguladas de un contaminante específico, en nuestro caso, fue el ozono por que es el principal contaminante de la zona. El principal objetivo fue estudiar el efecto de tres calidades de aire (aire limpio, aire ambiente y fumigación de ozono) en plantas

de lechuga cultivar Candele R7. Este cultivar es ampliamente cultivado en la Comunidad Valenciana y tiene una gran importancia económica y comercial. El potencial de los efectos de ozono fue medido por el intercambio gaseoso, fluorescencia de la clorofila *a*, enzimas antioxidantes, concentración de ascorbato y peroxidación de lípidos.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Plantas

Las plántulas de lechuga (*Lactuca sativa L.*) cultivar Candele R7 fueron germinadas en vermiculita y mantenidas en un invernadero en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (Valencia). Las condiciones ambientales en el invernadero durante la germinación fueron las siguientes: 15 a 20 °C (día), 10 a 15 °C (noche); humedad relativa de 50 a 95%; radiación activa fotosintética a la máxima intensidad, 500-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plántulas de cuatro semanas de edad fueron transplantadas en grandes macetas conteniendo una mezcla de suelo comercial (Terraplant, BASF, Uchte, Germany) y transferidas a las OTC's donde permanecieron durante 90 días (desde el inicio de Diciembre al final de Febrero). Durante el periodo de crecimiento las plantas fueron regadas diariamente.

5.3.2 Tratamiento en las cámaras abiertas

Las plantas en macetas fueron crecidas en nueve cámaras abiertas (OTC's), localizadas en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent. Las OTC's se basaron sobre el original diseño empleado en el programa NCLAN (ver Heagle et al., 1973). Durante el periodo de permanencia de las plantas en las OTC's, tres OTC's fueron ventiladas continuamente (24 h día⁻¹) con el paso del aire a través de filtros de carbón activado y filtros de polvo (tipo SF / Q clase EU-3 y EU-4, SF / CG y RBAA2) (CF); tres OTC's fueron ventiladas con aire no filtrado (NF), y tres OTC' fueron ventiladas con aire no filtrado y fumigada con ozono (NF+O₃).

El ozono fue generado con oxígeno puro comprimido a través de descargas eléctricas (generador de ozono S-3003, G.O.A.C., DASIBI) y añadido al aire ambiente. La fumigación de ozono fue llevada a cabo desde las 10 horas a 15 horas GMT durante cinco días a la semana. La curva de O_3 que se inyectó a la corriente de aire ambiente para obtener el aire $NF+O_3$ es:

| | |
|---------------------------|--------|
| - 10 – 11 horas GMT | 30 ppb |
| - 11 – 12 horas GMT | 40 ppb |
| - 12 – 13 horas GMT | 70 ppb |
| - 13 – 14 horas GMT | 40 ppb |
| - 14 – 15 horas GMT | 10 ppb |

La concentración de los contaminantes gaseosos de O_3 , óxidos de nitrógeno (NO y NO_2) y dióxido de sulfuro (SO_2), velocidad del viento, dirección del viento, temperatura del aire, irradiancia y humedad relativa fueron continuamente registrados. Los niveles de O_3 , NO_x y SO_2 fueron registrados usando analizadores específicos para cada contaminante (modelo DASIBI 1008, 2108 y 4108 respectivamente). El analizador de ozono fue calibrado dos veces al mes con un modelo DASIBI 5008 (Dasibi Environmental Corp., Glendale, CA, USA).

5.3.3 Medida del intercambio gaseoso

La medida del intercambio gaseoso fue realizada sobre la hoja adulta de la lechuga, al final de la estación de crecimiento, usando un LICOR-6400, a partir de las 10.00 a.m hasta las 14 p.m. Los parámetros del cambio de gas en el nivel de saturación de la luz (alrededor de $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fueron: fotosíntesis neta (A_{max} , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), conductancia estomática (G_w , $\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y concentración de CO_2 intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Se realizaron ocho réplicas por cada cámara.

5.3.4 Medición de la fluorescencia de la clorofila *a*

Las medidas de la fluorescencia de la clorofila *a* se realizaron dentro de las OTC's a temperatura ambiente utilizando un fluorímetro portátil (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany) durante el periodo de cultivo. Las hojas fueron adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos antes de las mediciones. La fluorescencia mínima en oscuridad (F_o) fue obtenida por la excitación de las hojas con una luz débil ($1 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). La fluorescencia máxima (F_m) fue determinada después de un pulso saturante de luz blanca durante 600 ms. El rendimiento de la fluorescencia variable (F_v) fue calculada como $F_m - F_o$. Después de dos minutos de readaptación en la oscuridad, la luz actínica blanca ($430 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fue encendida y un pulso de saturación ($8000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fue aplicado a 60 segundos de intervalo durante 15 minutos para determinar el rendimiento de la fluorescencia máxima durante la iluminación actínica (F_m'), el nivel de la fluorescencia modulada durante una breve interrupción de la luz actínica en presencia de la luz roja lejana (F_o'), y el rendimiento de la fluorescencia de la clorofila durante la iluminación actínica (F_s). El cálculo de la atenuación debido a la disipación no-fotoquímica de la energía de la luz absorbida (NPQ) fue determinado en cada pulso de saturación, acorde con la ecuación $\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m'$ (Bilger y Björkman, 1991). El coeficiente de la atenuación fotoquímica, q_p , el cual representa la fracción de los centros de reacción abiertos del PSII, fue calculada como $(F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$ (Schreiber et al., 1986). La eficiencia cuántica fotoquímica del PSII, ϕ_{PSII} , asociada con el rendimiento cuántico del transporte no cíclico de electrones, fue estimada como $(F_m' - F_s) / F_m'$ (Genty et al., 1989). La relación de la disminución de la fluorescencia (F_d , desde F_m a F_s) al estado estable de la fluorescencia F_s ($R_{fd} = F_d / F_s$), R_{fd} , es un indicador de la conversión cuántica fotosintética potencial (Lichtenthaler y Buchmann, 1987), fue calculado en luz actínica ($430 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

5.3.5 Determinación del ascorbato

La determinación del ascorbato fue realizada, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.5, capítulo 3. La concentración

de AsA se expresó frente al peso seco (DW) de la hoja, dado que se observó diferente peso seco entre tratamientos.

5.3.6 Método analítico de la enzima antioxidante

Las enzimas ascorbato peroxidasa, glutathion reductasa y superóxido dismutasa fueron determinadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.3, capítulo 3. Las actividades enzimáticas se expresaron frente al peso seco.

5.3.7 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue determinada siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.4, capítulo 3, y se expresó su concentración frente al peso seco.

5.3.8 Análisis estadístico

El análisis de variancia (ANOVA) fueron realizados sobre los datos experimentales, con una significación estadística de $p < 0.05$ y fue estimado por el método de la mínima diferencia significativa (LSD). El análisis estadístico fue realizado usando un programa estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Calidad del aire

Las plantas fumigadas con ozono ($\text{NF} + \text{O}_3$) mostraron síntomas visibles de daños sobre las hojas adultas, como lesiones necróticas bifaciales, negruzcas, mayormente localizados en el área

marginal y intervainal, principalmente en el último mes de la estación de crecimiento (ver sección fotos al final del capítulo).

Durante el periodo de crecimiento las concentraciones de NO_x y SO₂ fueron bajas (menos de 2 nl l⁻¹ para el SO₂ y 8 nl l⁻¹ para el NO_x). Las concentraciones de ozono en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent fueron particularmente altas durante la estación de crecimiento. La concentración de ozono se describió con el índice: AOT40. Los datos del AOT40 en el tratamiento CF no sobrepasaron el umbral e los 40 nl l⁻¹. La concentración de ozono en el tratamiento NF, durante los tres meses de crecimiento no sobrepasan el límite para la protección de los cultivos (AOT40 = 3000 nl l⁻¹ h⁻¹) para el periodo de tres meses consecutivos (Fuhrer et al., 1997), registrándose una concentración total de 2197 nl l⁻¹ (AOT40) (Tabla 5.1). Las medias mensuales de las variables climáticas de temperatura (°C), humedad relativa (%) y radiación solar (W/m²) fueron variables durante el periodo de cultivo.

Tabla 5.1. Datos de la concentración acumulativa mensual de ozono (AOT40 nl l⁻¹), en el tratamiento (NF), y la media mensual de las variables climáticas, registrados desde el 1 de Diciembre de 1999 al 29 de Febrero de 2000, en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent, durante el experimento del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) variedad Candeale R7.

| Parámetros | Diciembre | Enero | Febrero |
|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|
| AOT40 (nl l ⁻¹) | 387 | 451 | 1359 |
| T (°C) | 12.50 ± 3.87 | 8.90 ± 1.71 | 14.50 ± 1.74 |
| H.R (%) | 68.00 ± 12.76 | 82.00 ± 8.18 | 65.00 ± 9.21 |
| R.S (W/m ²) | 174.00 ± 30.00 | 187.00 ± 40.00 | 258.00 ± 30.00 |

En la Tabla 5.2, el tratamiento NF+O₃, muestra un aumento mensual de las concentraciones de ozono (AOT40) en los meses de Enero y Febrero, registrándose una concentración total de 19997 nl l⁻¹ (AOT40). Las medias mensuales de las variables climáticas fueron similares al tratamiento NF. Durante el periodo de crecimiento, la mayor concentración de ozono se registró en el mes de Febrero con 10868 nl l⁻¹ (AOT40).

Tabla 5.2. Concentración acumulativa mensual de ozono expresado en AOT40 (nl l^{-1}), y los valores medios mensuales de las variables climáticas: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%) y radiación solar (W/m^2), en el tratamiento (NF+O₃). Los datos fueron registrados en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent, desde el inicio de Diciembre de 1999, hasta la finalización del mes de Febrero de 2000, durante el experimento con (*Lactuca sativa L*) cultivar Candele R7.

| Parámetros | Diciembre | Enero | Febrero |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| AOT40 (nl l^{-1}) | 3553 | 5576 | 10868 |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 12.60±3.48 | 9.1 ±1.74 | 15.00±1.71 |
| H.R (%) | 68.00±13.92 | 80.00±8.00 | 65.00±8.79 |
| R.S (W/m^2) | 174.00±30.00 | 187.00±40.00 | 258.00±30.00 |

5.4.2 Medición del intercambio gaseoso

Al final de la estación de crecimiento, las hojas adultas sin síntomas visibles fueron medidas en todos los tratamientos de las calidades del aire (Tabla 5.3). La fotosíntesis neta en el nivel de saturación de luz (A_{max}), disminuye en las plantas del tratamiento NF+O₃ con una reducción alrededor del 77% en comparación a las plantas crecidas en el tratamiento, CF, la disminución es menor en plantas NF, alrededor del 18%. La conductancia estomática y la transpiración también fueron afectadas: G_w y E, con una disminución en plantas de lechuga NF+O₃ de alrededor del 62% y 36% respectivamente, en comparación al control, en las plantas NF estos valores disminuyeron también en un 34% y 13% respectivamente. La disminución en los parámetros A_{max} y G_w en planta NF+O₃ fueron asociada con un incremento de la concentración de CO₂ intercelular (C_i).

Tabla 5.3. Medición del intercambio gaseoso en hojas de lechuga, a través de los parámetros de la fotosíntesis neta (A_{max}), conductancia estomática (G_w), concentración de CO₂ intercelular (C_i), y relación de transpiración (E). Los datos son valores medios para n=8. Los símbolos de las gráficas seguido de letras diferentes son estadísticamente diferentes en $p < 0.05$ (LSD-test).

| Tratamiento | G_w ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | A_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | C_i ($\mu\text{CO}_2 \text{mol}^{-1}$) | E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$) |
|-------------------|--|--|---|---|
| CF | 0.423 a | 15.48 a | 273.4 a | 3.32 a |
| NF | 0.278 b | 12.74 a | 268.4 a | 2.87 a |
| NF+O ₃ | 0.160 c | 3.505 b | 339.6 b | 2.13 b |

5.4.3 Parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a*

La tabla 5.4 muestra los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas de lechuga adaptadas a la oscuridad sujetas a los tratamientos CF, NF, NF+O₃, al final del periodo de crecimiento (90 días). El rendimiento cuántico máximo de la fotoquímica del PSII, F_v/F_m fue afectado por la exposición de O₃ (NF+O₃). La disminución en esta relación fue principalmente como resultado de la disminución en el parámetro de la fluorescencia F_m . El nivel mínimo de la fluorescencia F_o fue menos afectado que F_m como resultado de la fumigación de ozono. Los valores de F_v/F_m en las plantas NF no presentan diferencias significativas con la planta control. Estos parámetros también fueron medidos en dos días diferentes durante la estación de crecimiento (30, y 60 días), pero no se encontraron diferencias significativas en F_v/F_m , ni F_o , ni F_m . Aunque F_v/F_m fue menor en NF+O₃ comparados a las plantas control y plantas NF en todos los días medidos.

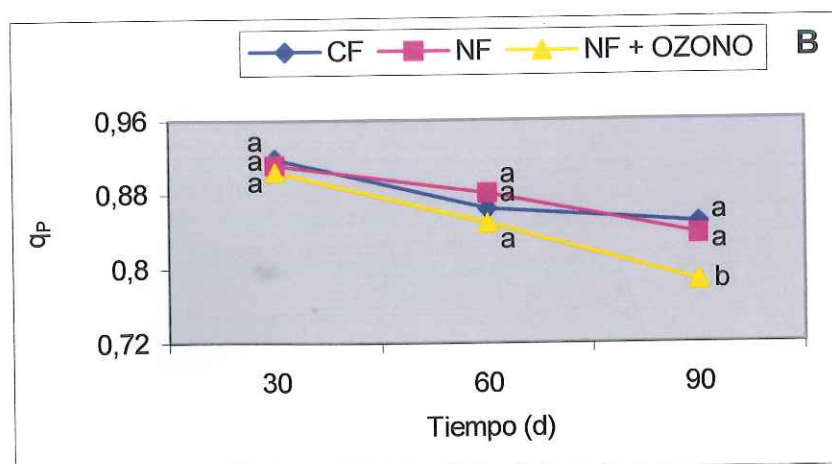
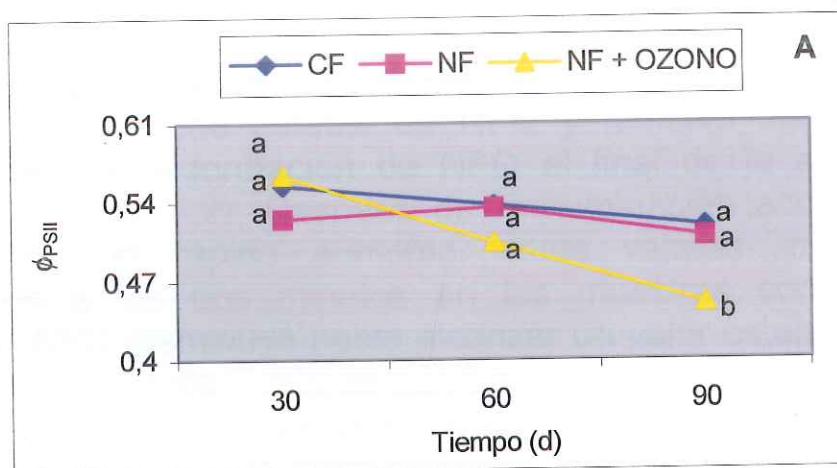
Tabla 5.4. Cambios en los parámetros de la fluorescencia modulada de la clorofila *a* en hojas de lechuga adaptadas a la oscuridad F_o , F_m , F_v/F_m , al final de la estación de crecimiento (90 días), en los tratamientos CF, NF, y NF+O₃. Los valores son medias de 10 muestras. Para comparar las medias se realizó el análisis de la variancia (ANOVA), seguida por el test de la diferencia significativa mínima (LSD), calculada al 95% del nivel de confianza. Valores seguidos por la misma letra indican diferencias no significativas.

| Tratamientos | F_o | F_m | F_v/F_m |
|---------------------|---------|---------|-----------|
| CF | 0.239 a | 1.346 a | 0.825 a |
| NF | 0.242 a | 1.311 a | 0.814 a |
| NF + O ₃ | 0.219 a | 1.121 b | 0.790 b |

Los cambios en los parámetros de la fluorescencia modulada de la Chl *a* al final de la cinética de la iluminación actínica (15 min) para tres días diferentes 30, 60 y al final de la estación de crecimiento son mostrados en la Figura 5.1. El rendimiento cuántico (ϕ_{PSII}) del transporte de electrón del PSII y la fracción de los centros abiertos del PSII, q_p , (Fig. 5.1A y 5.1B) experimentaron una disminución gradual respecto al periodo de crecimiento y exposición al ozono. La disminución más importante fue en plantas del

tratamiento NF+O₃ para ambos parámetros con una reducción significativa al final de la estación de crecimiento en comparación con la planta control. Los valores de ϕ_{PSII} y q_P en plantas NF no presentaron diferencias significativas con las plantas CF para los tres días de medición.

El parámetro NPQ (Fig. 5.1C) es considerado para ser un buen estimador de la cantidad de energía disipada no radiativamente por las plantas. Los valores de NPQ en el estado estacionario (al final de la cinética de inducción) aumentaron con el tiempo hasta los 60 días para todos los tratamientos, después los valores de NPQ en plantas NF+O₃ disminuyeron considerablemente respecto al control y hojas NF al final del periodo de crecimiento. Los valores de NPQ en las plantas control y NF se incrementaron hasta el final del periodo de crecimiento.



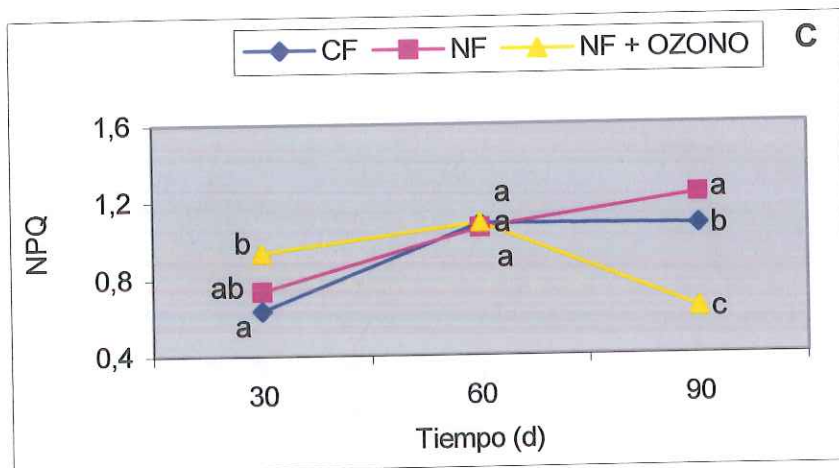


Figura 5.1. Los cambios en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila, son mostrados a través de los parámetros ϕ_{PSII} (A), q_P (B), NPQ (C) en hojas de lechuga. Los datos son medias para $n=8$. Los símbolos en las gráficas seguido por letras diferentes son estadísticamente diferentes en $p < 0.05$ (LSD-test).

La exposición de ozono disminuyó significativamente los valores en el estado estable de NPQ y también disminuyó las velocidades en la formación de NPQ al final de la estación de crecimiento (Fig. 5.2). Después de la iluminación actínica, NPQ experimentó un rápido aumento y los valores máximos se alcanzaron a los dos minutos en las muestras control y NF. Después, NPQ disminuyó hasta alcanzar un valor estable después de aproximadamente 7 min de iluminación actínica. Los valores de NPQ en el estado estable fueron más altos en plantas NF que en hojas CF. La capacidad para la formación del NPQ es menor en hojas NF+O₃, los valores en el estado estable disminuyeron alrededor del 34% respecto al control planta y 48% respecto a las hojas NF.

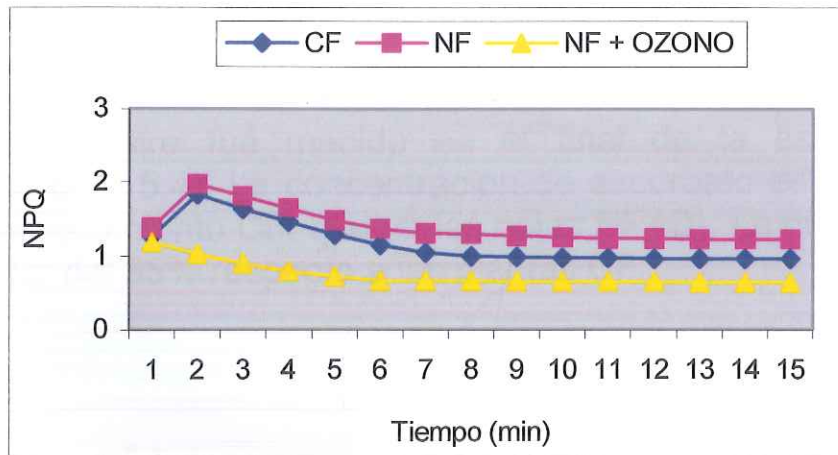


Figura 5.2. Valores de NPQ a lo largo de la cinética de inducción de la fluorescencia de la Chl a para hojas de lechuga al final del periodo de cultivo.

El cociente de la disminución de la fluorescencia Rfd al final de la estación de crecimiento (Fig. 5.3) fue similar en las hojas de CF y NF y disminuyó significativamente en plantas NF+O₃.

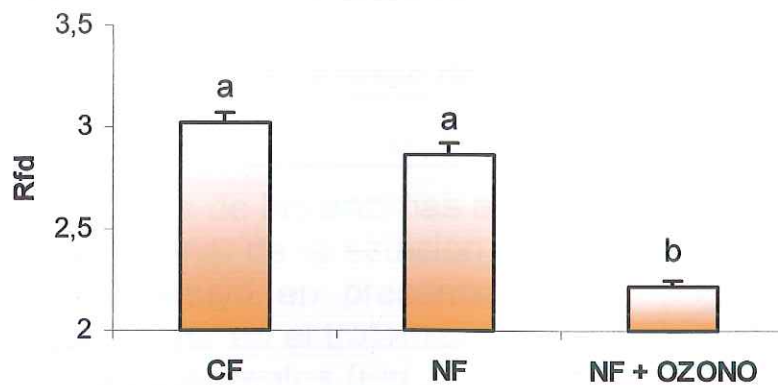


Figura 5.3. El índice de vitalidad, Rfd, al final del periodo de cultivo en hoja de lechuga. Los datos son valores medias \pm SD para n=8.

5.4.5 Concentración de ascorbato

La concentración de ascorbato para los tres tratamientos de la calidad del aire fue medida en el final de la estación de crecimiento (Fig. 5.4). La concentración de ascorbato es mayor en plantas del tratamiento CF, que en las hojas NF+O₃. La disminución es alrededor del 35% respecto a las plantas CF.

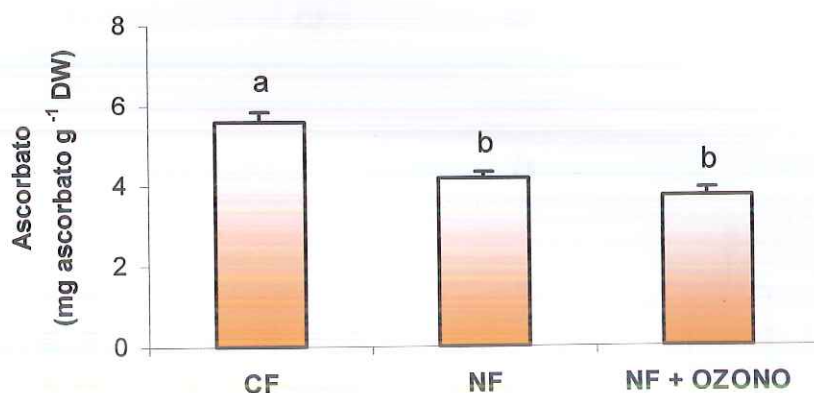


Figura 5.4. Contenido de ascorbato (AsA) en plantas de lechuga crecidas en cámaras abiertas con filtros de carbón (CF), plantas de lechuga crecidas en aire no filtrado (NF), y plantas de lechuga crecidas en aire no filtrado más ozono (NF+O₃). Los datos son valores medios \pm SD para n=4. Letras diferentes indican diferencias significativas en p<0.05 (LSD-test).

5.4.5 Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes

Las actividades de las enzimas antioxidantes (AP, GR y SOD) fueron medidas al final de la estación de crecimiento (Fig. 5.5). La actividad AP disminuyó en presencia de O₃ (Fig. 5.5A) y esta disminución fue mayor en el tratamiento NF+O₃. La actividad de GR fue similar entre tratamientos (Fig. 5.5B). La actividad de SOD (Fig. 5.5C) fue estimulada en presencia de ozono, con un incremento alrededor del 23% en las hojas NF y 130% en el tratamiento NF+O₃, respecto al control.

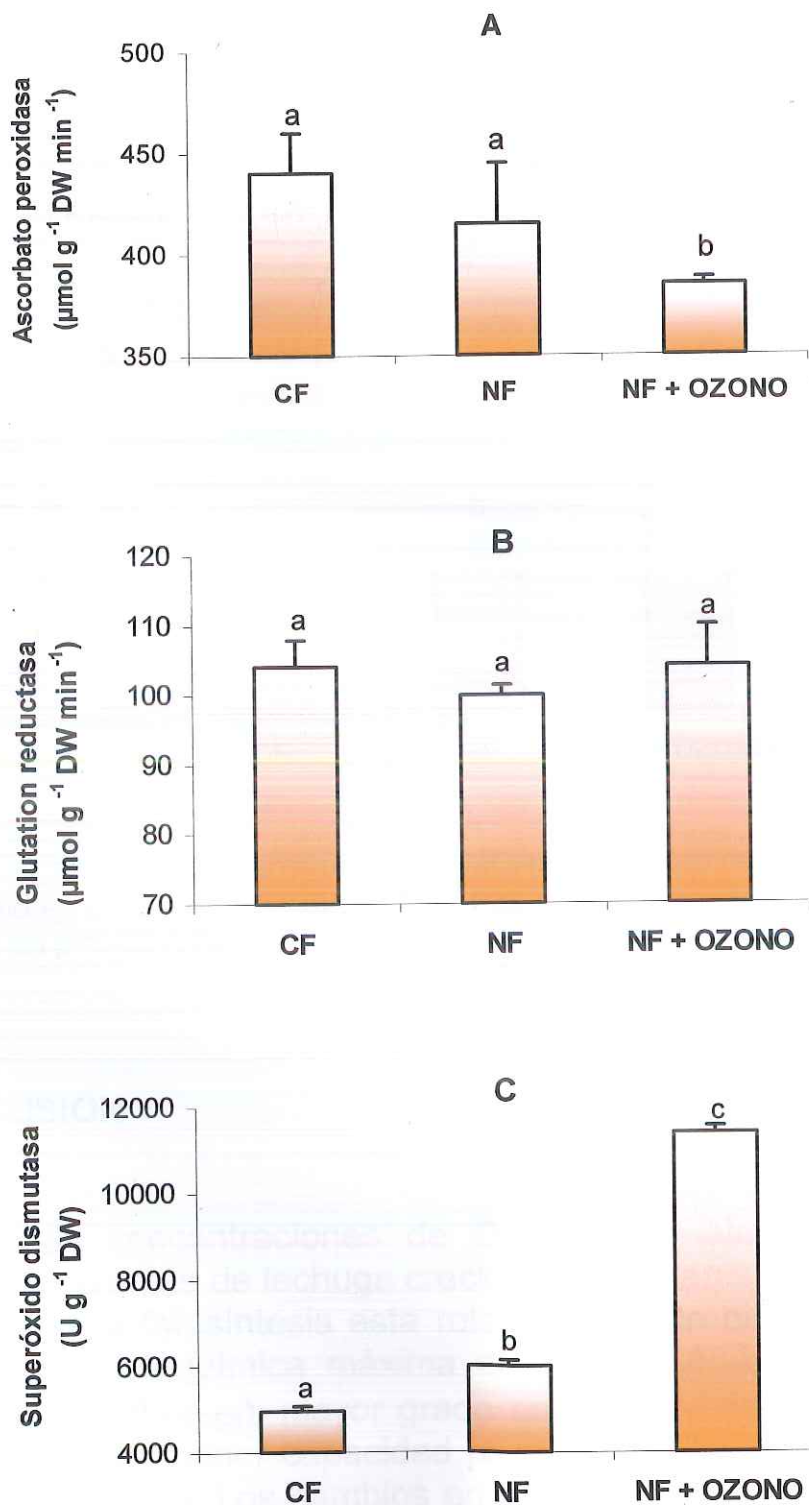


Figura 5.5. Actividades de las enzimas antioxidantes en hojas de lechuga para diferentes tratamientos (CF), (NF), y (NF+O₃). Los datos son valores medios para \pm SD n=4. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p < 0.05$ (LSD-test).

5.4.6 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos (Fig. 5.6) fue medido por la concentración de MDA. La peroxidación de lípidos se incrementa significativamente en hojas NF y NF+O₃ al final de la estación de crecimiento, el incremento fue mayor en el tratamiento NF+O₃.

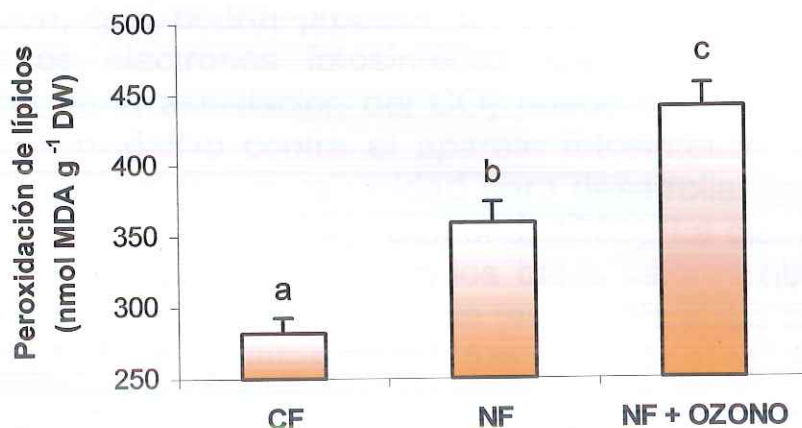


Figura 5.6. Contenido de malondialdehído (MDA) en plantas de lechuga. Los datos son valores medios \pm SD para $n=5$. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p<0.05$ (LSD-test).

5.5 DISCUSIÓN

Las altas concentraciones de O₃ (NF+O₃) afectaron a la fotosíntesis en plantas de lechuga crecidas en cámaras abiertas. La disminución de la fotosíntesis está relacionada con disminuciones en la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m), el flujo de electrones del PSII (ϕ_{PSII}), mayor grado en el cierre de los centros del PSII (q_p) y una menor capacidad para desarrollar los procesos fotoprotectivos (NPQ). Los cambios en los parámetros medidos en plantas NF respecto al control de plantas fueron menores que las hojas NF+O₃.

Las plantas de lechuga expuestas al O₃ presentaron una disminución en el consumo de CO₂, conductancia estomática y tasa

de transpiración, mientras la concentración de CO₂ intercelular aumentó. Las altas exposiciones de O₃ afectaron a la asimilación de CO₂, tanto por una limitación en la conductancia estomática, como por la disminución en la capacidad de fijación del CO₂ en el mesófilo. La alteración de la capacidad de las células del mesófilo en la fijación del CO₂ en plantas NF+O₃, han sido atribuidas por muchos autores (Farage et al., 1991; Nie et al., 1993; Pell et al., 1994; Pinto et al., 1995) a una reducción de la actividad y contenido de la rubisco que produce una disminución en el proceso de carboxilación, que podría producir un declive en la actividad del transporte de electrones fotosintético (Baker et al., 1994). La disminución de la asimilación del CO₂ puede ser explicada por el fuerte estrés oxidativo contra el aparato fotosintético, el cual fue relacionado con la menor capacidad para desarrollar los procesos fotoprotectores del PSII (NPQ) (Osmond, 1993). La disminución de la fotosíntesis fue relacionada con los bajos valores obtenidos de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a. La disminución del cociente F_v/F_m en plantas NF+O₃ fue atribuida al estrés del PSII, porque el parámetro NPQ fue afectado significativamente por la exposición al O₃. Los bajos valores de F_v/F_m fueron principalmente como resultado de una disminución en el nivel de F_m , indicado que la fotoquímica del PSII y la capacidad para reducir el primer aceptor de electrones Q_A fue afectada por el ozono. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Deltoro et al., (1999) en líquenes, Guidi et al., (1997), Ciompi et al., (1997), Calatayud y Barreno (2001) en plantas vasculares. En adición, los niveles más bajos de q_p exhibidos por las plantas NF+O₃ comparadas con el control o hojas NF, indicaron que el O₃ disminuyó la capacidad de reoxidación de la Q_A durante la iluminación actínica. Este significa que O₃ incrementó la presión de excitación sobre el PSII y contribuyó al cierre de los centros de reacción del PSII (Calatayud et al., 1999; Calatayud y Barreno, 2001). Estos hechos hace que disminuya la posibilidad del transporte de electrones entre PSII y PSI (Seaton y Walker, 1990). En nuestros resultados, el ϕ_{PSII} , correlacionado estrechamente con el rendimiento cuántico del transporte no-cíclico de electrones (Genty et al., 1989), fue reducido por la exposición al O₃. La atenuación no-fotoquímica es un proceso de disipación de la energía, localizada en la antena del PSII. Así, los procesos disipativos son muy dependientes sobre la integridad de la membrana y la acidificación del lumen (Walters y Horton, 1991), y de la rápida deepoxidación de violaxantina a anteroxantina y zeaxantina usando ascorbato como cofactor en la reacción de deepoxidación (Pfündlel y Bilger, 1994, Demmig-Adams et al.,

1995). En nuestros resultados, la menor capacidad para la formación de NPQ en plantas NF+O₃ puede ser debido a la baja relación del transporte no-cíclico de electrones asociado con una menor capacidad para establecer un gradiente de protón a través de la membrana tilacoidal y una menor concentración de AsA que podría interferir con la deepoxidación de la xantofila. La disminución en el contenido de AsA en plantas NF+O₃ puede ser una consecuencia del estrés oxidativo. El declive en el pool de AsA, que resulta del estrés de los contaminantes han sido documentadas por Kenyon y Duke (1985); Nouchi, (1993); Wellburn et al., (1996); Calatayud et al., (1999). El incremento en la concentración de MDA, en planta NF+O₃ el cual esta asociada con un aumento de la peroxidación de lípidos de membrana, confirman esta hipótesis. La atenuación no-fotoquímica durante la cinética de inducción de la fluorescencia de la Chl muestra en todos los tratamientos la misma forma, inicialmente es incrementada durante el primer minuto debido a la iniciación del transporte de electrones y la formación de ΔpH . Así, la relajación de NPQ ha sido asociada con la síntesis de ATP y la fijación de CO₂. Las plantas NF+O₃ presentan menores valores de NPQ debido a los efectos adversos de O₃ sobre la relación del transporte de electrones, menor disponibilidad de ATP y poder reductor, que conllevan a una inhibición de la fotosíntesis. Los efectos de la concentración de ozono en el aire ambiente (plantas NF), fueron mas bajas que en las hojas NF+O₃ porque el nivel de ozono en este periodo de crecimiento correspondiente al invierno es caracterizado por los bajos niveles de los contaminantes en esta área rural, aunque los valores de la fluorescencia de la clorofila y la fotosíntesis fueron más bajas que el control pero en muchos casos no presentaron diferencias significativas. Los valores más altos en NPQ al final del periodo de crecimiento puede ser asociado a una reducción en la atenuación fotoquímica, pero la concentración de AsA y los valores de ϕ_{PSII} podrían ser suficientemente altos como para mantener una disipación de energía no radiativa. Aunque, el nivel mínimo de AsA requerido para proteger a las plantas contra el estrés por ozono no es conocido y puede depender de las especies, condiciones ambientales y edad de la hoja (Burkey et al 2000).

La enzima AP, el cual usa específicamente AsA como reductor (Tommasi et al., 1987; Asada, 1992, De Gara et al., 2000) es considerada un componente esencial en la defensa enzimática contra el estrés oxidativo, una mayor actividad de la AP

aparentemente esta asociada con una mayor capacidad de biosíntesis de AsA (De Gara et al., 2000). Conklin et al., (1997), demostraron que la actividad de la AP es muy baja en el mutante *Arabidopsis vtc1*, el cual es deficiente en la biosíntesis de AsA. AP usa dos moléculas de AsA para reducir H_2O_2 a agua, con la concomitante generación de dos moléculas de monodehidroascorbato. En plantas NF+O₃ la actividad AP es más baja que en los otros tratamientos, asociado a una menor concentración de AsA en las hojas. El radical superóxido producido en los diferentes compartimentos de las células de las plantas es rápidamente convertido a H_2O_2 por la acción de la SOD en condiciones fisiológicas normales. El radical superóxido bajo estrés oxidativo se incrementa y puede estimular la actividad de SOD, este efecto fue observado en nuestros resultados. La actividad de la GR presenta los mismos valores para los diferentes tratamientos, este resultado es consistente con los anteriores trabajos publicados por Cakmak y Marschner, 1992; Calatayud y Barreno, 2000; Calatayud y Barreno, 2001, posiblemente porque la actividad de la enzima sea suficiente para permitir su función.

En resumen, los resultados aquí presentados indican que las altas concentraciones de O₃ disminuyen la fotosíntesis, afectan a la permeabilidad de la membrana y como consecuencia a todos los procesos dependientes de ella.



Foto 1. Lechuga var. Candeale R7 crecida en cámara CF.



Foto 2. Lechuga var. Candeale R7 crecida en cámara NF.



Foto 3. Lechuga var Candeale R7 crecida en cámara NF+O₃.



Foto 4. Detalle de las hojas de lechuga crecidas en cámara NF+O₃ con síntomas visibles.

6. EFECTOS DEL OZONO SOBRE DOS VARIEDADES DE ESPINACAS CULTIVADAS EN CÁMARAS ABIERTAS.

6.1 RESUMEN

Las respuestas fisiológicas de dos variedades de espinaca (*Spinacia oleracea* L.): Avanti y Clermont cultivadas en cámaras abiertas, fueron estudiadas durante un periodo de 90 días de exposición al ozono utilizando las técnicas del intercambio gaseoso, fluorescencia modulada de la clorofila *a*, concentración endógena de ascorbato, actividad de las enzimas antioxidantes y peroxidación de lípidos de membrana. Los resultados obtenidos en el tratamiento NF+O₃, tanto en la variedad Avanti como en la variedad Clermont, nos indica que el ozono disminuye la absorción de CO₂, la conductancia estomática, la tasa de transpiración y aumenta las concentraciones de CO₂ intercelular.

Los resultados en el análisis de la fluorescencia de la clorofila *a*, en el tratamiento NF+O₃, indican una disminución en el rendimiento cuántico actual, ϕ_{PSII} , asociado al flujo no-cíclico de electrones, en la atenuación fotoquímica, q_p , y un incremento en la atenuación no-fotoquímica, NPQ en ambas variedades. Las actividades de las enzimas AP y SOD fueron incrementadas como resultado del estrés oxidativo ocasionado por las altas concentraciones de ozono en las plantas de espinacas, permaneciendo sin cambios la actividad enzimática GR en la variedad Clermont, en cambio la variedad Avanti disminuye ligeramente. La concentración de ascorbato disminuye ligeramente en las plantas tratadas con altas concentraciones de ozono, contribuyendo esta disminución a un aumento en los niveles de la peroxidación de lípidos de membrana.

6.2 INTRODUCCIÓN

El ozono troposférico, es un contaminante secundario formado por la interacción de los hidrocarburos, óxidos de nitrógenos y la luz. Las respuestas de las plantas al O₃ son dependientes de las concentraciones del contaminante, tiempo de exposición, etapa de

desarrollo de la planta y otras condiciones que afectan a la conductancia estomática para la difusión del gas dentro de la hoja (Darrall, 1989; Heath, 1994; Schmieden y Wild, 1995). La toxicidad del ozono en el sistema biológico está relacionado con la formación de especies de oxígeno activo (Heath y Taylor, 1997). Los radicales libres atacan la pared celular y a la membrana plasmática y conducen al deterioro de la célula, pérdida de la eficiencia fotosintética, senescencia prematura de las hojas, abscisión foliar, pérdida de capacidad para tolerar otros estreses, y reducciones en el crecimiento y rendimiento del cultivo (Farage et al., 1991; Pell et al., 1992; Moldau et al., 1993). Por otra parte, el mecanismo de regulación de los estomas es el medio principal de la planta que permite controlar el intercambio de gases a través de la superficie de la hoja, este control biológico es ejercido por las células guarda y células oclusivas las cuales circundan el poro del estoma. La exposición al ozono puede disminuir o en algunos casos, puede incrementar la conductancia estomática según las diferentes especies de plantas (Darral, 1989). La regulación en la apertura de los estomas no es el único mecanismo operativo para proteger a las plantas contra los efectos deletéreos del ozono (Barnes y Pfirman, 1992; Mulchi et al., 1992), también la capacidad de las plantas para activar los procesos de protección y de reparación contribuyen a paliar los efectos del O₃ (Sanderman, 1996).

El objetivo de este capítulo fue estudiar las respuestas de las espinacas variedades Avanti y Clermont al daño por ozono, en cámaras abiertas en tres condiciones de aire: aire filtrado (CF), aire no filtrado (aire ambiente, NF), aire no filtrado mas una concentración determinada de ozono (NF+O₃). La respuesta de las espinacas al ozono bajo los tres tratamientos, fue investigada usando las técnicas del intercambio gaseoso, fluorescencia de la clorofila a, enzima antioxidantes, concentración de ascorbato y peroxidación de lípidos de membrana.

6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

6.3.1 Plantas

Las plántulas de espinaca (*Spinacia oleracea L.*), tanto la variedad Avanti como la variedad Clermont fueron germinadas en

vermiculita y mantenidas en el invernadero de la Estación Experimental Agraria de Carcaixent (Valencia). Las condiciones ambientales en el invernadero durante el crecimiento fueron las siguientes: 15 a 20 °C (día), 10 a 15 °C (noche); humedad relativa de 50 a 95%; radiación activa fotosintética a las máximas intensidades en el invernadero es de 500-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A las cuatro semanas de edad, las plántulas fueron transplantadas en maceteros grandes conteniendo una mezcla de suelo comercial (Terraplant, BASF, Uchte, Germany) y transferidas a las OTC's donde permanecieron tres meses (desde el inicio de Diciembre al final de Febrero). Durante el periodo de crecimiento las plantas fueron regadas diariamente por goteo.

6.3.2 Tratamiento en las cámaras abiertas

Las plantas en macetas fueron crecidas en nueve cámaras abiertas (OTC's), localizadas en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent. La instalación de las OTC's se basó sobre el diseño original empleado en el programa NCLAN (ver Heagle et al., 1973). Las plántulas fueron ventiladas continuamente las 24 horas del día bajo los siguientes tratamientos: tres cámaras con aire filtrado (CF), tres cámaras con aire no filtrado (NF) y tres cámaras con aire no filtrado más la concentración de ozono (NF+O₃). Las características de cada tratamiento, concentración de ozono registrada durante el día, características de los registros de los contaminante y otras características se indican en la sección 5.3.2, capítulo 5.

6.3.3 Las medidas del intercambio gaseoso

Las medidas del intercambio gaseoso fueron realizadas sobre hojas adultas en las dos variedades de espinaca al final del periodo de cultivo, usando un LICOR-6400, a partir de las 10.00 hasta las 14 horas. Los parámetros del intercambio gaseoso en el nivel de saturación de la luz (alrededor de 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fueron: fotosíntesis neta (A_{max} , $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$), conductancia estomática (G_w , $\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tasa de transpiración (E , $\text{mmol H}_2\text{O}_2$), y concentración de CO_2 intercelular (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$). Se realizaron 8 réplicas por cada cámara.

6.3.4 Medición de la fluorescencia de la clorofila a

La medición de la fluorescencia de la clorofila a fue realizada siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.3.4, capítulo 5.

6.3.5 Determinación del ascorbato

La determinación del ascorbato fue realizada siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.5, capítulo 3. La concentración se expresó frente al peso seco (DW).

6.3.6 Método analítico de los enzimas antioxidantes

Las enzimas: ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa fueron determinadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.3, capítulo 3. La actividad enzimática se expresó frente al peso seco (DW).

6.3.7 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue determinada siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.4, capítulo 3. La concentración de MDA se expresó frente al peso seco.

6.3.8 Análisis estadístico

El análisis de variancia (ANOVA) fueron realizadas sobre los datos experimentales a una significación estadística de ($p < 0.05$) y fue estimado por el método de la mínima diferencia significativa (LSD). El análisis estadístico fue realizado usando un programa estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6.4 RESULTADOS

6.4.1 Calidad del aire

Las altas concentraciones de ozono ($\text{NF}+\text{O}_3$) en las hojas maduras de las variedades Avanti y Clermont provocan clorosis internerviales (los nervios destacan de un color más intenso) (ver fotos al final del capítulo).

Los datos de los contaminantes atmosféricos (NO_x y SO_2), concentración acumulativa mensual de ozono (AOT40) y de los valores medios mensuales de las variables climáticas son idénticos a los descritos en la sección 5.4.1, capítulo 5.

6.4.2 Medición del intercambio gaseoso

La medición de los parámetros del intercambio gaseoso (A_{max} , G_w , C_i , E) fue efectuada en todos los tratamientos (CF, NF, $\text{NF}+\text{O}_3$) al final del periodo de cultivo (90 días) sobre las hojas adultas del cultivo de espinaca en las variedades Avanti y Clermont (Tabla 6.2). La fotosíntesis neta en el nivel de saturación de luz (A_{max}) disminuyen significativamente por los efectos adversos de la fumigación de O_3 ($\text{NF}+\text{O}_3$) en un 63% y 61% en las variedades Avanti y Clermont respectivamente, con relación a los controles. En el tratamiento NF, los valores de A_{max} fueron menores sin diferenciarse significativamente con relación a las plantas del tratamiento control. Los valores de la conductancia estomática (G_w), en el tratamiento $\text{NF}+\text{O}_3$ de las variedades Avanti y Clermont, también fueron afectados significativamente por la exposición al O_3 , disminuyendo en un 46% en Avanti y 42% en Clermont, comparadas con las plantas crecidas en el tratamiento control, CF.

Los valores de las concentraciones de CO_2 intercelular (C_i), al final del periodo de crecimiento fueron incrementadas en las plantas del tratamiento $\text{NF}+\text{O}_3$ con un 28% en Avanti y 22% en Clermont respectivamente, en comparación a las plantas crecidas en el tratamiento control, CF. Los cambios en las actividades de A_{max} y

G_w , del tratamiento NF+O₃ fueron asociados con los incrementos de las concentraciones de CO₂ intercelular en ambas variedades. Los valores de la tasa de transpiración (E), experimentan una disminución en plantas tratadas con O₃ (NF+O₃) en un 23% y 20% en ambos cultivares, en comparación a las plantas crecidas en el tratamiento control, CF.

Tabla 6.2. Valores de la fotosíntesis neta (A_{max}) y conductancia estomática (G_w), concentración de CO₂ y tasa de transpiración al final del periodo de cultivo. Los datos son valores medios para n=8. La comparación de las medias fue realizada por el análisis de variancia (ANOVA) seguido de la prueba de la menor diferencia significativa (LSD) para un nivel de confianza del 95%. Letras iguales indican que no se diferencian significativamente.

| Variedad | Avanti | Clermont | Avanti | Clermont |
|-------------------|---|----------|---|----------|
| Tratamiento | Fotosíntesis neta A_{max} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | | Conductancia estomática G_w ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | |
| CF | 23.00 a | 23.00 a | 0.458 a | 0.458 a |
| NF | 17.23 a | 17.27 a | 0.432 a | 0.432 a |
| NF+O ₃ | 8.48 b | 8.95 b | 0.246 b | 0.267 b |

| Variedad | Avanti | Clermont | Avanti | Clermont |
|-------------------|---|----------|---|----------|
| Tratamiento | CO ₂ Intercelular C_i ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) | | Transpiración E ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | |
| CF | 246 a | 246 a | 3.72 a | 3.75 a |
| NF | 272 a | 279 a | 3.81 a | 3.60 a |
| NF+O ₃ | 316 b | 301 b | 3.81 a | 3.60 a |

6.4.3 Parámetros de la fluorescencia de la clorofila a

La Tabla 6.3, muestran los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a en hojas de espinacas en las variedades Avanti y Clermont adaptadas a la oscuridad para los tratamientos CF, NF, NF+O₃, al final del periodo de cultivo (90 días). Los valores de los parámetros F_o , F_m , F_v/F_m en el tratamiento NF no presentan diferencias significativas con relación a los controles en ambas variedades. En cambio, los valores de los parámetros F_m y F_v/F_m en las hojas NF+O₃ disminuyen significativamente sus valores con relación a los tratamientos CF y NF.

Tabla 6.3. Cambios en el estado adaptado a la oscuridad F_o , F_m , F_v/F_m en hojas de espinacas de las variedades Avanti y Clermont, al final de la estación de crecimiento (90 días), en tratamientos CF, NF, NF+O₃. Los valores son medias de n=10. Para comparar las medias se realizó el análisis de la variancia (ANOVA).

| Variedades: | Avanti | | | Clermont | | |
|-------------------|---------|---------|-----------|----------|---------|-----------|
| Tratamiento | F_o | F_m | F_v/F_m | F_o | F_m | F_v/F_m |
| CF | 0.241 a | 1.388 a | 0.826 a | 0.239 a | 1.470 a | 0.837 a |
| NF | 0.237 a | 1.391 a | 0.827 a | 0.240 a | 1.472 a | 0.837 a |
| NF+O ₃ | 0.240 a | 1.326 b | 0.818 b | 0.249 a | 1.412 b | 0.822 b |

Los cambios en los parámetros de la fluorescencia modulada de la Chl *a* en el estado estacionario al final de la cinética de iluminación actínica (15 min), son mostrados en la Tabla 6.4 para ambas variedades. En el tratamiento NF+O₃, el flujo de electrones no-cíclico a través del PSII (ϕ_{PSII}) y la fracción de los centros abiertos asociados con el estado de oxidación-reducción de la Q_A (q_P) disminuyen significativamente con relación a los controles en ambas variedades. En el tratamiento NF, el valor de (q_P) en la variedad Clermont disminuye significativamente con respecto al control. Los valores de la atenuación no-fotoquímica (NPQ) aumentan en presencia de ozono en ambas variedades, siendo mayor el aumento en el tratamiento NF+O₃. El aumento de la atenuación no-fotoquímica (NPQ) va acompañada de una disminución en la atenuación fotoquímica (q_P) y del flujo de electrones no-cíclico en el PSII(ϕ_{PSII}).

Tabla 6.4. Parámetros de la fluorescencia modulada de la clorofila *a* (ϕ_{PSII} , q_P y NPQ) en hojas maduras de espinacas en las variedades: Avanti y Clermont al final del periodo de cultivo (90 días en el campo) en los tratamientos CF, NF, NF+O₃. Los valores son medias de n=8. La comparación de medias fue realizada por el análisis de variancia (ANOVA) seguido de la prueba de la menor diferencia significativa para el nivel de confianza del 5%. Valores seguidos de letras iguales indican diferencias no significativas.

| Espinaca: | Avanti | | | Clermont | | |
|-------------------|---------------|---------|---------|---------------|---------|---------|
| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q_P | NPQ | ϕ_{PSII} | q_P | NPQ |
| CF | 0.623 a | 0.901 a | 0.561 a | 0.627 a | 0.902 a | 0.581 a |
| NF | 0.581 a | 0.880 a | 0.653 b | 0.617 a | 0.861 b | 0.540 a |
| NF+O ₃ | 0.526 b | 0.749 b | 0.674 b | 0.509 b | 0.702 c | 0.640 b |

En la Tabla 6.5, los valores del cociente Rfd al final de la estación de crecimiento disminuyen en un 23% y 19%

respectivamente tanto en Avanti y en Clermont por la exposición al O₃ (NF+O₃), en comparación a las plantas del tratamiento control, CF. Los valores de Rfd en las plantas del tratamiento NF, disminuyen en un 12% y 3% respectivamente en ambas variedades, en comparación a los controles.

Tabla 6.5. Cambios en el parámetro Rfd en las variedades Avanti y Clermont después de 90 días en los tratamientos CF, NF, NF+O₃. Los datos son medias para n=8. La comparación de medias fue realizada por el análisis de la variancia (ANOVA), seguido por el test de la diferencia significativa mínima (LSD), calculada al 95% del nivel de confianza. Valores seguidos por la misma letra indican diferencias no significativas.

| Espinaca: | Avanti | Clermont |
|-------------------|----------|----------|
| Tratamiento | Rfd | Rfd |
| CF | 2.547 a | 2.705 a |
| NF | 2.247 ab | 2.627 a |
| NF+O ₃ | 1.950 b | 1.950 b |

6.4.4 Determinación de la concentración de AsA endógena

En la Tabla 6.6 los niveles de ascorbato endógeno disminuyen debido a la alta concentración de ozono en el tratamiento NF+O₃ en un 15% y 8% respectivamente, con relación a los controles en ambas variedades.

Tabla 6.6. Contenido de ascorbato con relación al peso seco (DW) (mg ascorbato g⁻¹ DW) (AsA) en plantas de espinacas de las variedades Avanti y Clermont crecidas en cámaras abiertas con filtros de carbón (CF), en aire no filtrado (NF) y aire no filtrado más ozono (NF+O₃). Los datos son valores medios para n=5. La comparación de medias fue realizada por el análisis de la variancia (ANOVA), seguido por el test de la diferencia significativa mínima para el nivel de confianza del 5%. Valores seguidos de letras indican diferencias no significativas.

| Espinaca: | Avanti | Clermont |
|-------------------|---------|----------|
| Tratamiento | AsA | AsA |
| CF | 4.17 a | 3.46 a |
| NF | 3.88 ab | 3.65 a |
| NF+O ₃ | 3.55 b | 3.20 a |

6.4.5 Cambios en las actividades de las enzimas antioxidantes

Las actividades de las enzimas antioxidantes (AP, GR, y SOD) fueron medidas al final de la estación de crecimiento. En la Tabla 6.7, los valores de la actividad AP fueron estimulados tras la exposición de O₃ (NF+O₃), aumentando un 16% y 12% en Avanti y Clermont respectivamente, en comparación a las plantas del tratamiento control, CF. En el tratamiento NF, la actividad AP disminuye en un 4% en la variedad Avanti y aumenta un 21% en la variedad Clermont, comparadas con los controles.

Tabla 6.7. Actividad de la enzima antioxidante ascorbato peroxidasa en hojas de espinacas en las variedades Avanti y Clermont bajo diferentes tratamientos (CF, NF, NF+O₃). Los datos son valores medios para n=8. La comparación de medias fue realizada por el análisis de la variancia (ANOVA), seguido por el test de la diferencia significativa mínima (LSD), calculada al 95% del nivel de confianza. Letras diferentes indican diferencias significativas.

| Espinaca: | Avanti | Clermont |
|-------------------|---|---|
| Tratamiento | Ascorbato peroxidasa ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$) | Ascorbato peroxidasa ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$) |
| CF | 365.16 a | 310.51 a |
| NF | 349.00 a | 377.16 b |
| NF+O ₃ | 422.00 b | 347.06 c |

En la Tabla 6.8, los valores de la actividad glutatión reductasa, GR en el tratamiento NF+O₃ disminuyen en un 11% y 2% respectivamente en ambas variedades, con relación a las plantas crecidas en los controles. En el tratamiento NF, los valores de la actividad GR también disminuyen un 6% en Avanti pero en la variedad Clermont se incrementa en un 5% con relación a los controles.

Tabla 6.8. Actividad de la enzima antioxidante glutatión reductasa, GR, en hojas de espinacas en las variedades Avanti y Clermont para diferentes tratamientos CF, NF, NF+O₃. Los datos son valores medios para n=8.

| Espinaca: | Avanti | Clermont |
|-------------------|--|--|
| Tratamiento | Glutatión reductasa ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$) | Glutatión reductasa ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{DW min}^{-1}$) |
| CF | 71.48 a | 63.29 a |
| NF | 67.45 ab | 66.33 a |
| NF+O ₃ | 63.38 b | 62.11 a |

La actividad de la enzima superóxido dismutasa, SOD, (Tabla 6.9) en el tratamiento NF+O₃ fue estimulada en presencia de ozono, incrementándose alrededor del 67% y 8% en las hojas de las variedades Avanti y Clermont, en comparación a las plantas del tratamiento control, CF. En el tratamiento NF, la actividad del SOD, también fue estimulada por la concentración del ozono ambiental, aumentando un 49% en Avanti; en cambio, Clermont fue disminuida en un 4%, con relación a los controles.

Tabla 6.9. Actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa, SOD, en hojas de espinacas en las variedades Avanti y Clermont bajo diferentes tratamientos (CF), (NF), (NF+O₃). Los datos son valores medios para n=8.

| Espinaca: | Avanti | Clermont |
|-------------------|--|--|
| Tratamiento | Superóxido dismutasa (U g ⁻¹ DW) | Superóxido dismutasa (U g ⁻¹ DW) |
| CF | 5951.23 a | 6430.00 a |
| NF | 8882.46 b | 6200.00 a |
| NF+O ₃ | 9930.27 c | 6950.00 b |

6.4.6 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos (Tabla 6.10) fue medida como la concentración de MDA. En el tratamiento NF+O₃, la peroxidación de lípidos aumenta en un 33% en Avanti y un 24 % en Clermont, con relación a las plantas crecidas en los controles. En el tratamiento NF, los índices de la peroxidación de lípidos aumentan en un 20% y 2% para Avanti y Clermont respectivamente, en comparación a los controles.

Tabla 6.10. Contenido de malondialdehído (MDA) en plantas de espinacas de las variedades Avanti y Clermont. Los datos son valores medios para n=8.

| Espinaca: | Avanti | Clermont |
|-------------------|--|--|
| Tratamiento | Peroxidación de lípidos (nmol MDA g ⁻¹ DW) | Peroxidación de lípidos (nmol MDA g ⁻¹ DW) |
| CF | 264.37 a | 242.04 a |
| NF | 316.45 b | 246.20 a |
| NF+O ₃ | 349.86 c | 300.00 b |

6.5 DISCUSIÓN

Al final del periodo de cultivo, las altas concentraciones de ozono en el tratamiento NF+O₃, afectaron a la fotosíntesis en el cultivo de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) en las variedades Avanti y Clermont crecidas en cámaras abiertas. La disminución de la absorción de CO₂ (A_{max}), conductancia estomática (G_w), y tasa de transpiración (E), fue observada en las células de ambos cultivares, y fue acompañado por un incremento en la concentración de CO₂ intercelular (C_i). Estos resultados obtenidos, están de acuerdo con los trabajos publicados por Guidi et al., (1997), quienes reportaron una disminución significativa en A_{max}, G_w, y E, y un incremento significativo en (C_i) en plantas de *Phaseolus vulgaris*, cv. Pinto, después de 4 horas de exposición al ozono (80 ppb). Soldatini et al., (1998a) indican una disminución en la fotosíntesis neta (P_N) y pequeños cambios en G_w en plantas de álamo fumigadas con ozono. Reichenauer et al., (1998) reportaron que las plantas de trigo fumigadas por ozono tienen bajos niveles de G_w y disminuida la P_N. Plazek et al., (2000) observaron una disminución en P_N en plantas de cebada, cultivar Movek. Además indican que la disminución inducida por ozono en P_N, fue debido al cierre de los estomas.

La disminución en la fijación de CO₂, como consecuencia de la exposición al ozono, han sido atribuidos por muchos autores (Farage et al., 1991; Nie et al., 1993; Pell et al., 1994; Pinto et al., 1995) a una reducción en la actividad y concentración de Rubisco, produciéndose una disminución en el proceso de la carboxilación, que podría producir un declive en la actividad del transporte de electrones fotosintéticos (Baker et al., 1994). La marcada pérdida en la asimilación de CO₂ no puede ser explicada solamente como un daño causado directamente por el estrés oxidativo contra el aparato

fotosintético, sino, también como un mecanismo de regulación llevado a cabo por las plantas para adaptar su metabolismo fotosintético a las condiciones adversas del medio ambiente. La disminución de la fotosíntesis observada en el presente trabajo de investigación se relaciona con la disminución de los parámetros de la fluorescencia de la Chl *a*. La fluorescencia basal, F_o , representa la emisión de las moléculas excitadas de Chl *a* de la antena que tiene lugar antes que los excitones hayan sido capturados por los centros de reacción activos del PSII. Los resultados obtenidos en los tratamientos NF+O₃, de ambas variedades nos indican que los valores de la fluorescencia basal, de las hojas adaptadas a la oscuridad no sufren cambios como resultado de las fumigaciones e indica que el ozono no produce modificación en los pigmentos en la antena o en la eficiencia de la captura de los excitones en los centros de reacción del PSII. Los valores de la fluorescencia máxima en la oscuridad (F_m), fueron disminuidos en el tratamiento NF+O₃, indicando que la fotoquímica y la capacidad para reducir la Q_A , fueron afectadas en ambas variedades. La disminución de F_m afecta a la eficiencia fotoquímica máxima F_v/F_m , la disminución podría ser debida al daño en los centros del PSII, pero también a un incremento en la atenuación no-fotoquímica asociada una disipación de la energía no radiativa como mecanismo de protección, o a ambas causas (Osmond, 1994). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Deltoro et al., (1999) en líquenes; Guidi et al., (1997, 1999), Reichenauer et al., (1998), Ciompi et al., (1997), Soja et al., (1998), Calatayud y Barreno, (2001) en plantas vasculares.

La disminución de los valores de F_m y F_v/F_m están asociados a bajos valores obtenidos en q_p en las variedades Avanti y Clermont, indicando que el ozono disminuye la capacidad para reoxidar la Q_A durante la iluminación actínica, aumentando la presión de excitación ($1-q_p$) sobre el PSII, provocando el cierre de los centros de reacción en el PSII (Calatayud et al., 1999; Calatayud y Barreno, 2001). La capacidad de las plantas para disipar la energía de modo no radiativo es estimada por el parámetro NPQ, (Schreiber et al., 1994) el cual depende de la acidificación del lumen (Walters y Horton, 1991), de la integridad de las membranas tilacoidales (Park et al., 1996) y de la actividad del ciclo de las xantofilas (Krause y Weiss, 1991; Pfündel y Bilger, 1994; Demmig-Adams et al., 1995). En nuestros resultados, los valores de NPQ en ambas variedades, son mayores en el tratamiento NF+O₃, comparados con los controles de

ambos cultivares, indicando que tienen una mayor capacidad para disipar el exceso de energía de manera no radiativa. La mayor capacidad de disipación puede ser debido a la presencia fundamental de AsA como cofactor en la reacción de deepoxidación de violaxantina, anteroxantina y zeaxantina (Pfündel y Bilger, 1994; Demmig-Adams., 1995). El incremento de la atenuación no-fotoquímica, disminuye el rendimiento cuántico actual del PSII (ϕ_{PSII}), y consecuentemente disminuye la eficiencia cuántica del transporte no-cíclico de electrones. El parámetro Rfd, mide la actividad fotosintética potencial de las plantas y se correlaciona con la tasa de fijación de carbono (Lichtenthaler, 1990; Mohammed et al., 1995), en nuestros resultados los valores de Rfd en el tratamiento NF+O₃ fueron menores en ambas variedades. En resumen, los valores obtenidos en los parámetros del intercambio gaseoso y de la fluorescencia modulada de la Chl *a* indican una disminución de la fotosíntesis neta y cambios en el aparato fotosintético. Las modificaciones observadas en ambos parámetros están asociados con los cambios ocurridos en la membrana tilacoidal y se sugiere que el O₃ altera las propiedades de la membrana.

El análisis de TBARS confirman que las dos variedades de espinacas crecidas en el tratamiento NF+O₃ muestran un incremento en la concentración de MDA, el cual está relacionado con los niveles de la peroxidación de lípidos de membrana. La toxicidad de ozono modifica la estructura y función de las membranas conduciendo a una alteración de la permeabilidad y su posterior deterioro de los procesos quimiorregulatorios (Chimiklis y Heath, 1975, Sutton y Ting, 1977). La generación de radicales libres de oxígeno induce el desarrollo peroxidativo de los lípidos de la membrana (Soldatini et al., 1998a). Estos resultados obtenidos son consistentes con las observaciones realizadas por Sakaki et al., (1983) quienes mencionan que las elevadas concentraciones de ozono en el cultivo de *Spinacia oleracea* L., incrementa el nivel de MDA. La disminución de fosfolípidos en hojas de trigo fue acompañada por un incremento de los ácidos grasos libres (Mackay et al., 1987). El deterioro y destrucción de la membrana durante la senescencia (Paliyath y Droillard, 1992; Maccarrone et al., 1992; Ranieri et al., 1996; Wellburn y Wellburn, 1996; Ederli et al., 1997; Pell et al., 1997), fueron asociados con desordenes en las membranas de las plantas, producidas entre otras causas por la peroxidación de lípidos de membrana (Marangoni et al., 1996a).

Heath, (1994); Kangasjärvi et al., (1994); Hippeli y Elstner (1996), también demostraron que la peroxidación de lípidos y daños de la membrana plasmática, fue causada por el desarrollo del estrés oxidativo en las células de las plantas. En concordancia con estos resultados, Guidi et al., (1999), demostraron que las hojas del cultivo de *Vicia faba L. cv. Gigante d'Ingegnoli* expuestas al ozono experimentan un incremento en MDA.

El AsA actúa como antioxidante o bien asociado a los ciclos enzimáticos antioxidantes, eliminando los radicales libres generados por el ozono o por las actividades metabólicas de la planta y nuestros resultados nos indican que, los niveles de ascorbato son altos y su concentración sólo disminuye ligeramente en ambas variedades en presencia de altas concentraciones de ozono, el cual fue relacionado con el aumento de la peroxidación de lípidos de membrana (33% y 24%) en Avanti y Clermont, respectivamente, disminuyendo el potencial de daños, y que de esta manera, el AsA ha tenido una función fundamental en la protección de las plantas frente al estrés oxidativo. Aunque los niveles mínimos de AsA requeridos para la protección de las plantas contra el estrés oxidativo no son conocidos y pueden depender de las especies, condiciones ambientales y edad de la hoja (Burkey et al., 2000). Nuestros resultados son consistentes con las observaciones realizadas por Castillo y Greppin, (1986, 1988); Luwe, (1996); Wellburn et al., (1996); Herrero-Martínez et al., (2000) y Turcsányi et al., (2000).

Las actividades de la AP y SOD son incrementadas como resultado de la exposición al estrés (Bowler et al., 1992, Foyer et al., 1994a,b). La enzima AP, es la peroxidasa más importante que interviene en la detoxificación del peróxido de hidrógeno (Foyer y Halliwell, 1976; Noctoc y Foyer, 1998). Nuestros resultados nos indican que la actividad de la AP fue estimulada por las altas concentraciones de ozono en ambas variedades, indicando mayor capacidad en la protección y eliminación del peróxido de hidrógeno en la célula de las plantas, impidiendo su acumulación. Los resultados obtenidos son concordantes con Peters et al., (1989); Foyer et al., (1991); Sen Gupta et al., (1993); Foyer y Lelandais, (1993); De Gara et al., (2000); Ranieri et al., (2000). La actividad SOD, también fue estimulada por las altas concentraciones de ozono en ambas variedades, indicando mayor capacidad en la

detoxificación del radical superóxido. Los resultados obtenidos son concordantes con Declaire et al., (1984) en hojas de (*Spinacia oleracea* L.). La actividad de la GR no presenta variaciones en la variedad Clermont, indicando que el ozono no afecta a la velocidad del enzima antioxidante, posiblemente por que su velocidad en condiciones fisiológicas "normales" es suficiente para mantener el ciclo (Aono et al., 1995; Foyer et al., 1995; Guidi et al., 1993). Este resultado es consistente con los obtenidos por Calatayud y Barreno, (2000); Calatayud y Barreno, (2001). En la variedad Avanti, la actividad GR disminuye en presencia de O₃, posiblemente relacionado con las alteraciones del ciclo AsA-Glutation.

En resumen, los cambios inducidos por el ozono pueden involucrar reacciones químicas específicas que ejercen efectos directos sobre los procesos metabólicos, disminuyendo la fotosíntesis, produciendo cambios en la estructura de la membrana y alterando las funciones fisiológicas que influyen en los mecanismos de acción de las células afectadas.



Foto 1. Espinaca var. Avanti crecida en cámara CF.



Foto 2. Planta de espinaca var. Clermont crecida en cámara CF.



Foto 3. A) Hoja de espinaca var. Clermont crecida en $\text{NF}+\text{O}_3$, con manchas plateadas.
B) Hoja sin síntoma.



Foto 4. Detalle de una hoja de espinaca var. Avanti con síntomas visibles en cámara $\text{NF}+\text{O}_3$.

7. EFECTOS DEL OZONO Y ABONADO DE NITRÓGENO SOBRE EL CULTIVO DE SANDÍA (*Citrullus lanatus* T.) cv. REINA DE CORAZONES

7.1 RESUMEN

El objetivo del experimento fue determinar el efecto de diferentes dosis de abonado nitrogenado con relación a las altas concentraciones de ozono sobre el cultivo de sandía cv. Reina de Corazones. Se utilizaron tres dosis de nitrógeno: Control, 2X y 3X, y fueron aplicadas en tres calidades de aire: tres cámaras CF (aire filtrado), tres cámaras NF (aire ambiente) y tres cámaras NF+O₃ (aire ambiente más una concentración conocida de ozono). El estudio para evaluar los efectos de las interacciones entre el aporte de N y el O₃ fueron realizados a través de las evaluaciones de las técnicas de la fluorescencia modulada de la clorofila *a*, peroxidación de lípidos, análisis foliar del contenido de nitrógeno y producción.

En las cámaras CF, la aplicación de las distintas dosis de N no afecta a los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a*, reflejado por el transporte de electrones del PSII, el estado de oxidación-reducción de la Q_A, y disipación de la energía no radiativa, los centros de reacción del PSII no manifiestan indicios de fotoinhibición y los niveles de la peroxidación de lípidos no varían con el aporte de nitrógeno, observándose una ligera disminución de la productividad en la dosis 3X de nitrógeno. Las plantas crecidas en cámaras NF disminuyen ligeramente los parámetros de la fluorescencia y presentan indicios de fotoinhibición, como consecuencia del estrés se produce un incremento de los niveles de la peroxidación de lípidos, pero la producción de frutos aumenta ligeramente en plantas tratadas con dosis 3X de nitrógeno. En cambio en las cámaras NF+O₃, se observa una disminución en los parámetros de la fluorescencia, la fotoinhibición es más acentuada en las plantas tratadas con dosis 3X de nitrógeno y la peroxidación de lípidos se incrementa considerablemente con respecto a NF y CF, disminuyendo la producción de los frutos.

7.2 INTRODUCCIÓN

El deterioro en la fotosíntesis ha sido atribuido por algunos autores a un desequilibrio en el control iónico celular inducido por las especies tóxicas de oxígeno derivadas del ozono sobre la membrana plasmática, el cual puede conducir a un daño del aparato fotosintético (Nie et al., 1993; Baker et al., 1994; Heath, 1994). Los daños visibles no pueden ser el mejor indicador del impacto de los contaminantes del aire sobre las plantas. Las grandes reducciones de la fotosíntesis pueden ocurrir antes o en ausencia de la expresión de los daños visibles. Estos resultados han sido demostrados en especies de árboles (Tjoelker et al., 1993; Volin et al., 1993) y en plantas agrícolas (Fuhrer et al., 1992; Guidi et al., 1993; Guzy y Heath, 1993; Guidi et al., 1997). El crecimiento de las plantas bajo una intensidad moderada de luz solar, pero expuestas a la combinación de otros estreses como el frío, heladas, contaminantes del aire, deficiencia de minerales (Ciompi et al., 1997; Verhoeven et al., 1997), pueden experimentar un aumento de la fotoinhibición y consecuentemente la reducción de la actividad fotosintética.

Existe escasa información bibliográfica de los efectos del suministro de nitrógeno sobre las plantas en respuesta al ozono, la mayoría de los estudios están enfocados sobre el impacto en la limitación de nutrientes (Maurer et al., 1997; Whyfield et al., 1998). Sin embargo estos pocos estudios que han sido conducidos, indican que las plantas que exhiben bajo contenido de nitrógeno pueden ser menos susceptibles al ozono. Por ejemplo, Brewer et al. demostraron que existía una reducción de daños visibles inducidos por ozono cuando las plantas de *Spinacia oleracea* L. y *Beta vulgaris* L. fueron crecidas con bajas concentraciones de N, en comparación con las plantas crecidas con altos niveles de N (Brewer et al., 1961). Similares resultados fueron encontrados en *Raphanus sativus* L. (Pell et al., 1990) y *Pinus taeda* L. (Tjoelker y Luxmoore, 1991) observándose en ambos cultivos reducciones en la biomasa foliar inducida por ozono con alto suministro de N. El ozono pueda afectar el metabolismo del nitrógeno por la oxidación de las proteínas o aminoácidos que contienen azufre o anillos aromáticos (Rowland et al., 1988). Chapin et al. (1986) demostraron que existe una inversa relación entre la

concentración de carbohidratos y el suministro de nitrógeno en la planta; el carbono será utilizado para producir proteínas si el suministro de N es alto o carbohidratos si el nitrógeno es menos disponible. La interacción entre ozono y el aporte de N sugiere que las plantas que crecen con alto suministro de nitrógeno son más sensibles al estrés crónico por ozono en términos de la reducción de la biomasa foliar, pudiendo causar un declive significativo en la productividad (Tjoelker y Luxmoore 1991).

El objetivo del presente trabajo de investigación fue estudiar si las dosis suplementarias de abono nitrogenado aumenta la susceptibilidad al ozono, para ello se emplearon las técnicas de la medición de la fluorescencia modulada de la clorofila *a*, peroxidación de lípidos, análisis foliar de nitrógeno y producción. Es de interés evaluar en la Comunidad Valenciana la interacción del N con el O₃ debido a las altas dosis de N existentes en las aguas de riego y al exceso de abonado en ciertas prácticas agrícolas junto con las altas concentraciones de ozono presentes en la atmósfera sobre todo en las estaciones de primavera y verano.

7.3 MATERIALES Y MÉTODOS

7.3.1 Material vegetal

Las plántulas de sandía (*Citrullus lanatus Thunb*) variedad Reina de Corazones fueron germinadas y obtenidas de invernaderos particulares y luego transferidas a macetas que contenían un suelo comercial (Terraplant, BASF, Uchte, Germany) dentro de las cámaras (OTC's) de la Estación Experimental Agraria de Carcaixent, donde permanecieron durante 95 días, desde el 15 de Junio hasta el 20 de Septiembre de 2000. Se instalaron cuatro macetas por cámara, y las plantas fueron abonadas con nitrato amónico: una planta con la dosis 3x de nitrógeno, otra con la dosis 2x de nitrógeno, y otra para el Control, la cual fue tratada con agua de riego (250-300 ppm de N) y otra maceta en la cual fue cultivada la sandía variedad Toro, que sirvió como polinizador para la variedad Reina de Corazones.

7.3.2 Fertilización nitrogenada

Para el abonado de las plantas, se utilizó el nitrato amónico cuyas dosis y periodo de abonado fue diseñada por el Dr. Fernando Pomares (IVIA), y se detalla a continuación:

| SEMANAS | FECHAS | ABONADO% | GRAMOS 2X | GRAMOS 3X |
|---------|--------------|----------|-----------|-----------|
| 1 | 18-25/Junio | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 26-02/Julio | 4 | 1.80 | 3.80 |
| 3 | 03-09/Julio | 4 | 1.80 | 3.80 |
| 4 | 10-16/Julio | 4 | 1.80 | 3.80 |
| 5 | 17-23/Julio | 8 | 3.60 | 7.60 |
| 6 | 24-30/Julio | 8 | 3.60 | 7.60 |
| 7 | 31-06/Agosto | 8 | 3.60 | 7.60 |
| 8 | 07-13/Agosto | 12 | 5.40 | 11.40 |
| 9 | 14-20/Agosto | 12 | 5.40 | 11.40 |
| 10 | 21-27/Agosto | 12 | 5.40 | 11.40 |
| 11 | 28-03/Sep. | 7 | 3.15 | 6.65 |
| 12 | 04-10/Sep. | 7 | 3.15 | 6.65 |
| 13 | 11-17/Sep. | 7 | 3.15 | 6.65 |
| 14 | 18-24/Sep. | 7 | 3.15 | 6.65 |
| 15 | 25-30/Sep. | 0 | 0 | 0 |

La dosis de nitrato amónico fue preparada con una solución de agua destilada y aplicado semanalmente a las plantas 2X y 3X, a la planta Control se le añadió la misma cantidad de agua.

7.3.3 Tratamiento en las cámaras abiertas

En la sección 5.3.2, capítulo 5, se detallan las características de los tratamientos, tiempo de fumigación, de los registros de los contaminantes. Solamente fue cambiada la curva de inyección de ozono a la corriente del aire ambiente para obtener el aire $NF+O_3$, que fue de la siguiente manera:

- 10 - 11 horas GMT..... 41 ppb
- 11 - 12 horas GMT..... 75 ppb
- 12 - 13 horas GMT..... 140 ppb
- 13 - 14 horas GMT..... 66 ppb
- 14 - 15 horas GMT..... 26 ppb

7.3.4 Medición de la fluorescencia modulada de la clorofila a

La medición de la fluorescencia modulada de la clorofila a fue realizada al final del periodo de cultivo. En la sección 5.3.4, capítulo 5 se describe el protocolo de la medición. La medición de la fotoinhibición fue realizada sobre hojas maduras y sin síntomas visibles las cuales fueron adaptadas a la oscuridad durante 30 minutos, después fue aplicado un pulso de saturación de luz actínica y seguidamente fue calculado F_o , F_m y F_v/F_m . Inmediatamente las hojas fueron exhibidas a la luz solar ($1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por un periodo de 30 minutos. Seguidamente las hojas fueron mantenidas en la oscuridad, programándose una aplicación de pulsos saturantes de luz actínica cada 5 minutos por un periodo de tiempo de 60 minutos con la finalidad de constatar la recuperación del parámetro F_v/F_m en las plantas.

7.3.5 Determinación de la peroxidación de lípidos

El protocolo empleado para la determinación de la peroxidación de lípidos se describe en la sección 3.3.5, capítulo 3.

7.3.6 Determinación del análisis foliar de nitrógeno

La determinación del análisis foliar de nitrógeno en el cultivo de la sandía, variedad Reina de Corazones, fue programada y efectuada en base a las diferentes etapas fenológicas del cultivo, recolectándose las hojas, en 1) después del cuajado del fruto (22/07/00), 2) cuando los frutos tenían un tamaño intermedio (16/08/00) y 3) al final del periodo

de cultivo (14/09/00). La recolección de hojas fue efectuada en los tres tratamientos de la calidad de aire (CF, NF, NF+O₃), cada cámara contenía tres plantas (3X, 2X y Control). Las hojas fueron secadas en una estufa a una temperatura de 60 °C, durante tres días en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent. Las muestras fueron analizadas por la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección General de Innovación Agraria y Ganadería, Servicio de Análisis Agroalimentario Generalitat de Valencia.

7.3.7 Análisis estadístico

El análisis de variancia (ANOVA) se llevó a cabo sobre los datos experimentales, con una significación estadística de $p < 0.05$) y fue estimado por el método de la menor diferencia significativa (LSD). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa estadístico SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Calidad de aire

Las hojas de la variedad Reina de Corazones expuestas a las altas concentraciones de ozono (NF+O₃) y dosis alta de abono nitrogenado mostraron síntomas visibles de daños en las hojas adultas manifestadas con lesiones rojizas internerviales que posteriormente evolucionan a un plateado característico, y manchas cloróticas y necróticas de color marrón (ver fotos al final del capítulo).

Durante el periodo de cultivo, las concentraciones de NO_x y SO₂ son bajas, menos de 8 nl l⁻¹ para NO_x y 2 nl l⁻¹ para el SO₂. Las concentraciones de ozono son expresadas como AOT40 (nl l⁻¹), definida anteriormente en los demás capítulos. El AOT40 en el tratamiento NF y NF+O₃ registrados durante los 95 días del periodo de cultivo exceden considerablemente los valores críticos de los cultivos

dictado por la UN-ECE que es de 3000 nl l^{-1} para tres meses consecutivos. Los datos del AOT40 en el tratamiento CF no exceden el umbral de los 40 nl l^{-1} , NF registró 7380 nl l^{-1} , y NF+O₃ 36555 nl l^{-1} . Las variables ambientales son expuestas en la tabla 7.1.

Tabla 7.1 Datos de la concentración acumulativa de ozono, expresado como AOT40 (nl l^{-1}) en un periodo de 12 horas de luz solar y los valores medios mensuales de las variables climáticas: temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%) y radiación solar (W/m^2), registradas en los tratamientos CF, NF y NF+O₃ durante el periodo del cultivo, (desde el 15 de Junio hasta el 20 de Septiembre de 2000).

| PARÁMETROS | CF | NF | NF+O ₃ |
|--------------------------|------------|------------|-------------------|
| AOT40 | 0 | 7380 | 36555 |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 26.50±1.42 | 27.25±1.56 | 27.10±1.44 |
| H.R (%) | 63.50±1.73 | 62.00±1.82 | 62.25±2.06 |
| R.S (W/m^2) | 338.25±41 | 338.25±41 | 338.25±41 |

7.4.2 Parámetros de la fluorescencia de la clorofila a

La Figura 7.1, muestra la eficiencia fotoquímica máxima del PSII (F_v/F_m) en hojas de sandía variedad Reina de Corazones adaptadas a la oscuridad para los tratamientos CF, NF y NF+O₃ y dosis de nitrógeno (Control, 2X y 3X). Los valores de F_v/F_m en la cámara CF, no fueron afectados por las dosis de nitrógeno y sus valores no presentan diferencias. En el tratamiento NF, los valores de F_v/F_m disminuyen en plantas tratadas con la dosis 3X de nitrógeno. La disminución en los valores de F_v/F_m es más pronunciada en las plantas tratadas con la dosis 3X de nitrógeno en el tratamiento NF+O₃.

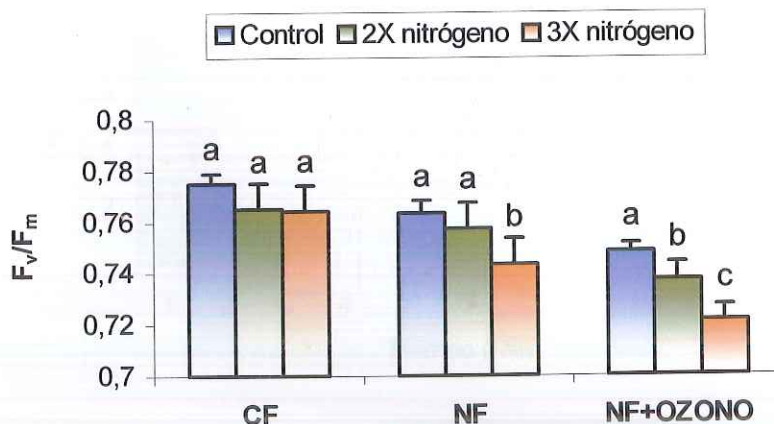


Figura 7.1. Cambios del estado adaptado a la oscuridad de la eficiencia fotoquímica máxima, F_v/F_m y dosis de nitrógeno en plantas de sandía variedad Reina de Corazones al final del periodo de crecimiento en cámaras CF, NF y NF+O₃. Los datos son medias de 8 muestras. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (LSD).

Las medidas de la cinética de la fluorescencia de la clorofila *a*, fueron realizadas al final del periodo de cultivo. En el tratamiento CF (Fig. 7.2), el flujo de electrones no-cíclico del PSII (ϕ_{PSII}) (Fig. 7.2A), al igual que el estado de oxidación-reducción del primer aceptor estable de electrones, Q_A (q_P) (Fig. 7.2B), incrementan rápidamente sus valores en cada pulso de saturación de luz actínica durante los primeros minutos de inducción de la cinética hasta alcanzar el estado estacionario que se mantiene hasta el final de la cinética de inducción de la fluorescencia. Los valores de ambos parámetros son parecidos en los tres niveles de nitrógeno (Control, 2X y 3X). La atenuación no-fotoquímica (NPQ) (Fig. 7.2C), en el primer pulso de saturación de luz actínica los valores aumentan para luego relajarse rápidamente. También en todo los pulsos, los valores son parecidos en las tres dosis de nitrógeno, indicando que el comportamiento de la fluorescencia en estos tres parámetros, no fueron afectados por la dosis de nitrógeno en plantas crecidas en cámaras CF.

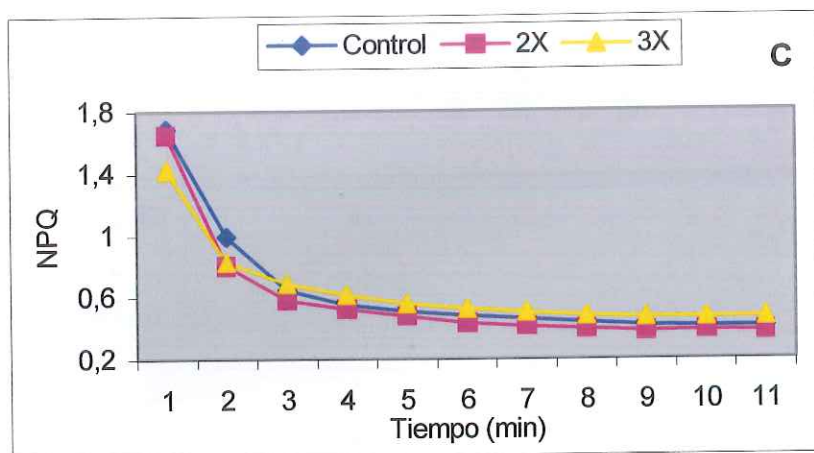
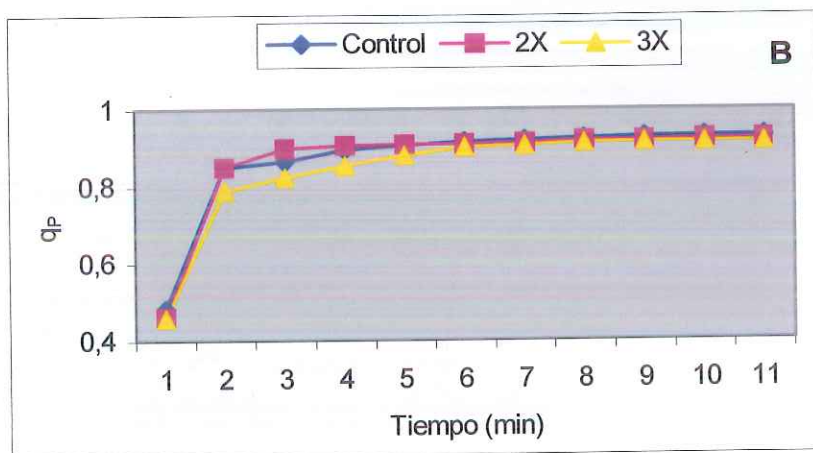
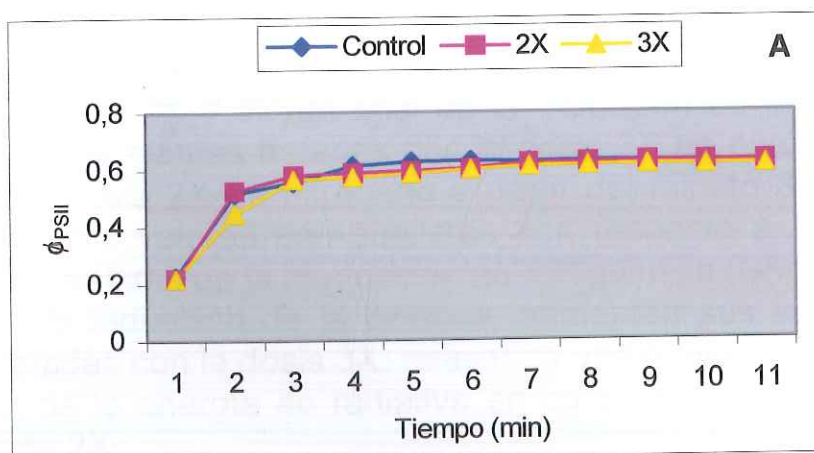
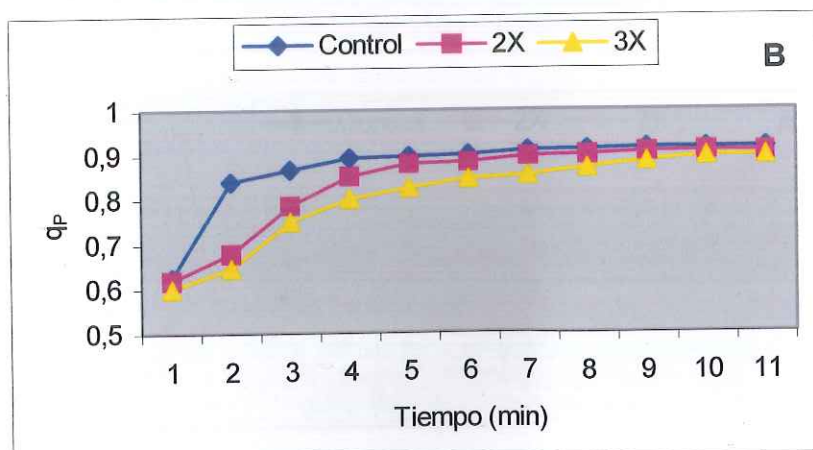
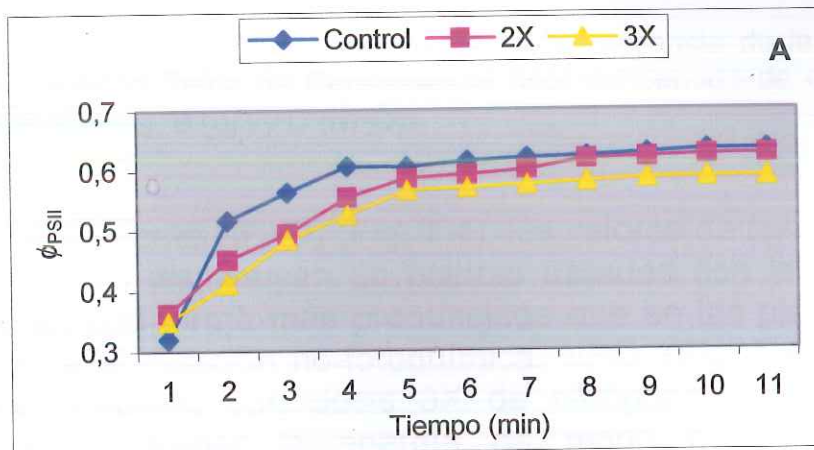


Figura 7.2. Cambios en los parámetros de la fluorescencia modulada de la clorofila a en plantas de la variedad Reina de Corazones al final del periodo de crecimiento en cámaras CF: A (ϕ_{PSII}), B (q_p) y C (NPQ). Los datos son medias de 8 muestras.

En el tratamiento NF (Fig. 7.3), los valores del flujo de electrones no-cíclico a través del PSII (ϕ_{PSII}) (Fig. 7.3A) y la atenuación fotoquímica q_P (Fig. 7.3B) al final de la inducción de la cinética son menores en las plantas tratadas con la dosis 3X de nitrógeno. En las plantas con dosis 2X de nitrógeno a partir del minuto 8 y en ambos parámetros sus valores son similares con respecto a las dosis del Control. Los valores de la atenuación no-fotoquímica (NPQ) (Fig. 7.3C) al final de la inducción de la cinética, aumentan sus valores en las plantas tratadas con la dosis 3X, reflejando una mayor capacidad en la disipación de la energía no radiativa en comparación a las dosis del Control y de 2X.



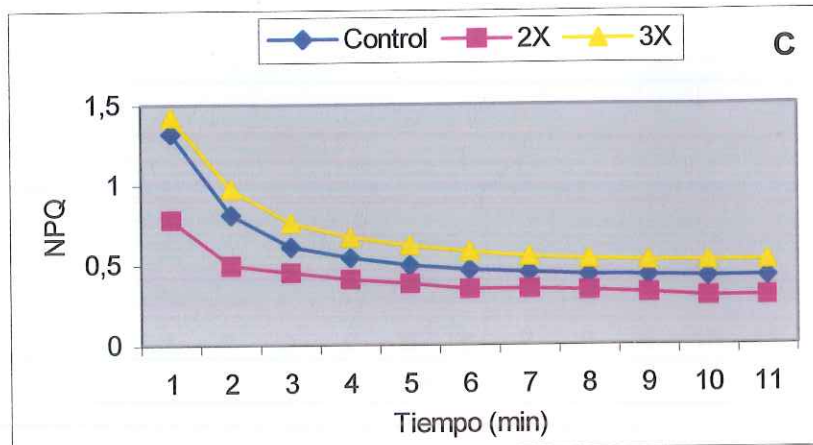
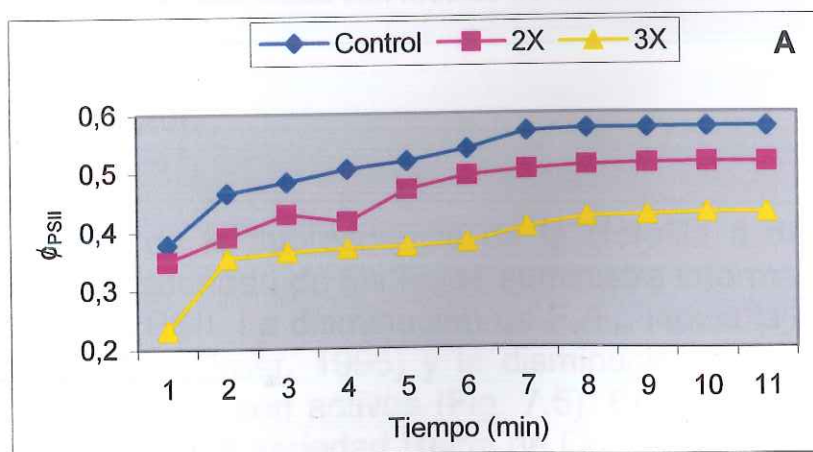


Figura 7.3. Cambios en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a en plantas de variedad Reina de Corazones al final del periodo de crecimiento en cámaras NF: A (ϕ_{PSII}), B (q_P) y C (NPQ).

En el ambiente NF+O₃ (Fig. 7.4), los valores de (ϕ_{PSII}) (Fig. 7.4A) y q_P (Fig. 7.4B) disminuyen en plantas tratadas con la dosis 3X de nitrógeno en una forma más pronunciada que en las plantas 2X. Los valores de la atenuación no-fotoquímica, NPQ, (Fig. 7.4C) aumentan en plantas tratadas con dosis 3X de nitrógeno, indicando mayor capacidad de disipar la energía de modo no radiativa como consecuencia de la disminución en los procesos fotoquímicos.



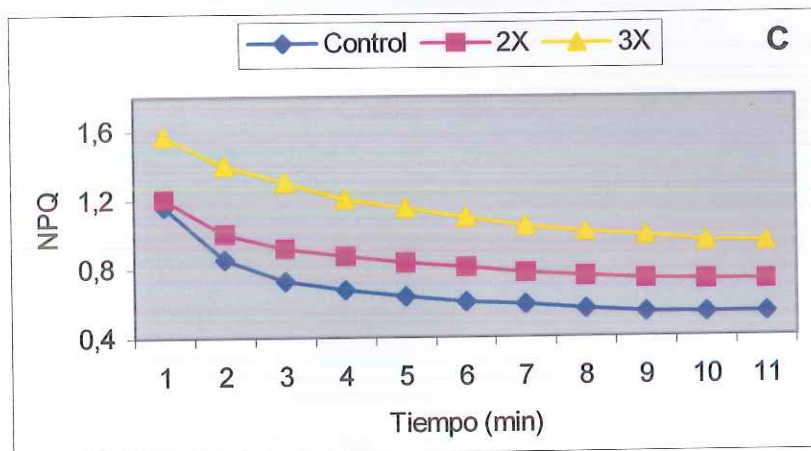
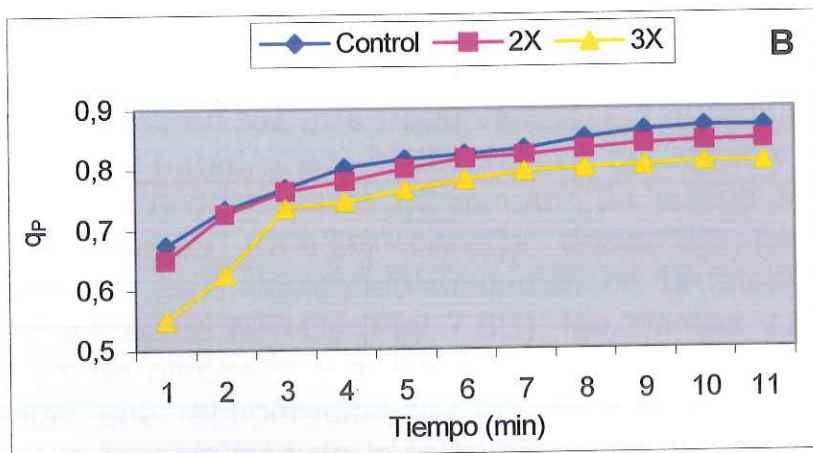
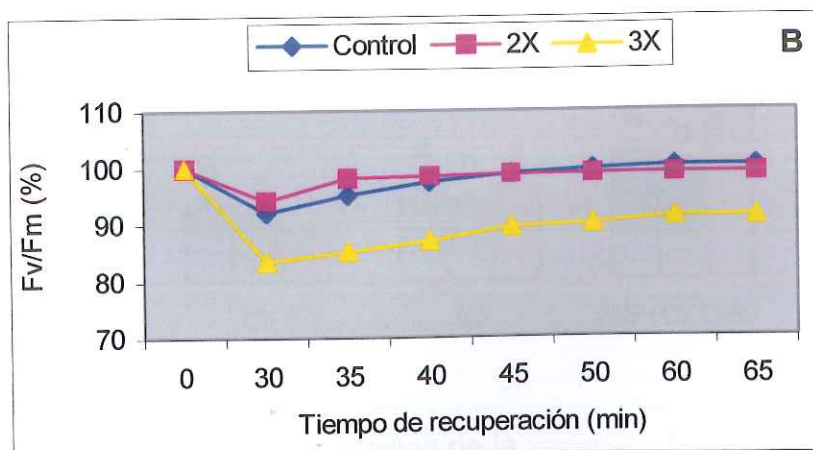
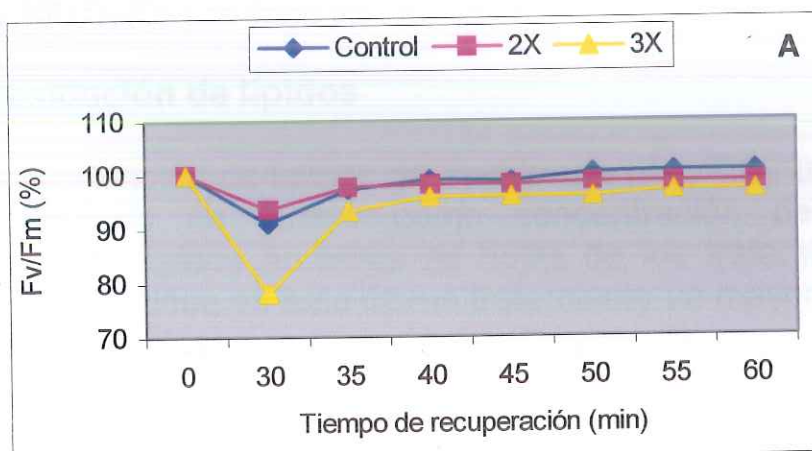


Figura 7.4. Cambios en los parámetros de la fluorescencia modulada de la clorofila a en plantas de la variedad Reina de Corazones crecida en cámaras NF+O₃: A (ϕ_{PSII}), B (q_P) y C (NPQ). Los datos son medias de 8 muestras.

7.4.3 Fotoinhibición

La medida de la fluorescencia de la clorofila a después de la adaptación a la oscuridad de las hojas suministra información sobre la fotoinhibición del PSII. La disminución de F_v/F_m indica la pérdida de la eficiencia del PSII (Greer, 1995) y la disminución de los centros de reacción del PSII que son activos (Fig. 7.5). En el ambiente CF (Fig. 7.5A), las plantas de la variedad Reina de Corazones tratadas con las dosis 3X, 2X de nitrógeno y Control, después de 30 minutos de

exposición a la luz del sol, experimentan una disminución en los valores de F_v/F_m , siendo mas acentuada en las plantas tratadas con la dosis 3X, transcurridos los 60 minutos los valores de F_v/F_m se recuperan al 100% en los tres tratamientos. En el ambiente NF (Fig. 7.5B), las plantas tratadas con la dosis 2x de nitrógeno y el Control se recuperan al 100% después de 60 minutos de pulsos saturantes, en cambio, las plantas tratadas con la dosis 3X presentan una recuperación del 90%, indicando inhibición de la fotosíntesis en un 10%. En el ambiente NF+O₃ (Fig. 7.5C), las plantas tratadas con la dosis 3X, 2X de nitrógeno y el Control, transcurridos los 60 minutos experimentan una recuperación del 80, 64 y 40% respectivamente, indicando que la inhibición de la fotosíntesis en la luz es del 20, 36 y 60% respectivamente.



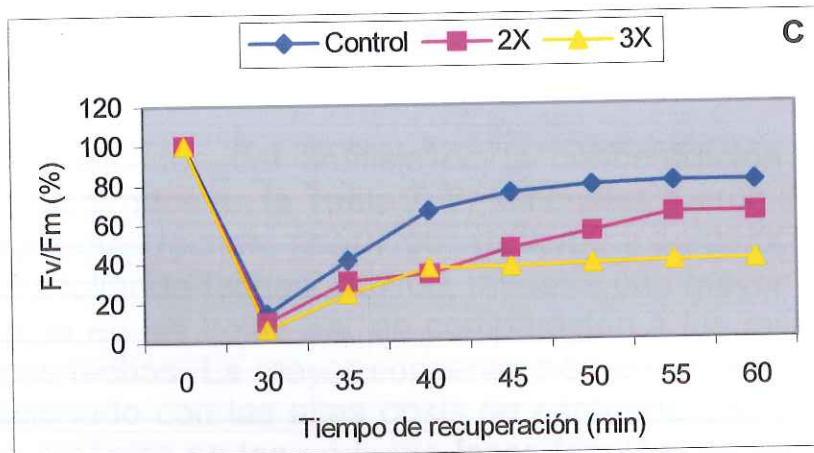


Figura 7.5. Porcentaje de fotoinhibición (%) a través de la recuperación del parámetro F_v/F_m de la fluorescencia modulada de la clorofila *a* en plantas de la variedad Reina de Corazones al final del periodo de crecimiento en cámaras CF (A), NF (B), NF+O₃ (C). Los datos son medias de 8 muestras.

7.4.4 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos de membrana (Fig. 7.6) fue medida al final del periodo de cultivo como concentración de MDA. La peroxidación de lípidos aumenta en hojas de los tratamientos NF y NF+O₃, observándose en este último tratamiento un mayor incremento en las plantas crecidas con la dosis de nitrógeno 3X.

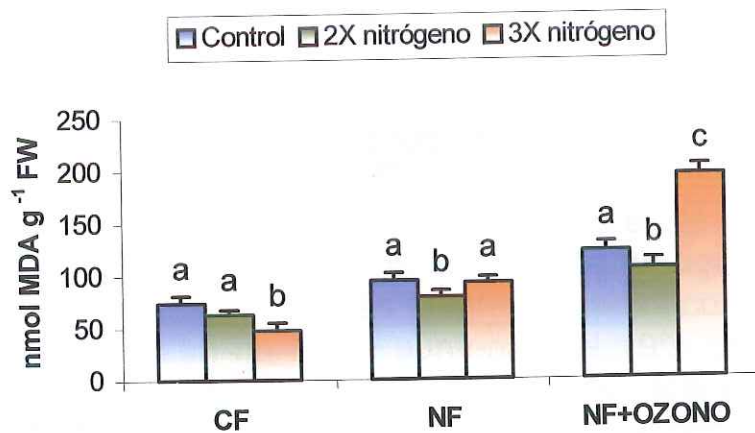


Figura 7.6. Contenido de MDA en plantas de la variedad Reina de Corazones. Los datos son medias de 8 muestras \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (LSD).

7.4.5 Análisis foliar del nitrógeno total

Los resultados del análisis de la concentración del nitrógeno foliar son mostrados en la Tabla 7. 2, los cuales fueron llevados acabo en las siguientes fechas: (22/07/00, 16/08/00 y 14/09/00). El resultado del análisis foliar de fecha 22/07/00, muestra una mayor concentración de nitrógeno en las hojas 3X, en comparación a los resultados de las dos últimas fechas. La mayor concentración de nitrógeno encontrado, esta relacionado con las altas dosis de nitrógeno aportadas en forma de nitrato amónico en las primeras fases fenológicas de la planta. Los valores de los resultados de las dos últimos análisis del nitrógeno, nos indican que el N disminuye por el mayor requerimiento y absorción.

Tabla 7.2. Resultados del análisis del nitrógeno foliar en las plantas de la variedad Reina de Corazones crecida en cámaras CF, NF y NF+O₃ y dosis de nitrógeno (s.m.s %).

| Cámaras | CF | | | NF | | | NF+O ₃ | | |
|------------|------|------|------|------|------|------|-------------------|------|------|
| | C | 2X | 3X | C | 2X | 3X | C | 2X | 3X |
| Dosis de N | | | | | | | | | |
| 22/07/00 | 2.76 | 2.69 | 4.52 | 2.78 | 3.33 | 4.61 | 2.74 | 3.36 | 5.14 |
| 16/08/00 | 3.32 | 3.53 | 3.51 | 3.13 | 4.41 | 4.25 | 1.82 | 3.57 | 2.86 |
| 14/09/00 | 2.99 | 2.98 | 2.97 | 2.60 | 3.34 | 3.33 | 3.09 | 2.88 | 2.76 |

7.4.6 Producción total de frutos

La Tabla 7.3 muestra el efecto del abonado nitrogenado en la producción total de frutos de sandía variedad Reina de Corazones. En el tratamiento CF, las variaciones son mínimas en la producción total de frutos con relación a las diferentes dosis de nitrógeno aportadas a la planta. En el tratamiento NF, las plantas tratadas con la dosis 3X de nitrógeno experimentan un ligero aumento del 19% en la producción total con relación a su control. En cambio, en el tratamiento NF+O₃, la producción total de las plantas tratadas con la dosis 2X y 3X de nitrógeno disminuyen en un 18 y 35% respectivamente, en comparación al Control.

Tabla 7.3. Efecto del abono nitrogenado sobre la producción total de sandía Reina de Corazones en diferentes calidades de aire

| Cámaras | CF | | | NF | | | NF+O ₃ | | |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|-------|------|
| | C | 2X | 3X | C | 2X | 3X | C | 2X | 3X |
| Producción Total (kg) | 14.60 | 13.71 | 12.44 | 11.38 | 11.32 | 13.53 | 13.26 | 10.81 | 8.64 |

7.5 DISCUSIÓN

La información bibliográfica de los efectos conjuntos de la concentración de ozono y las respuestas de las plantas al suministro exógeno de nitrógeno son escasas. Brewer et al (1961), indican que las plantas de *Spinacea oleracea* y *Brassica oleracea* que exhiben un bajo contenido de nitrógeno son menos susceptibles al efecto del ozono en comparación a las plantas crecidas con altos niveles de nitrógeno y se manifiestan como un aumento de daños visibles. Otros estudios indican una reducción en la biomasa foliar inducida por ozono en presencia de altas concentraciones de nitrógeno en *Raphanus sativus* L. (Pell et al., 1990) y *Pinus taeda* L. que podrían causar el declive significativo en la productividad (Tjoelker y Luxmoore, 1991). En nuestros resultados, las altas concentraciones de ozono y las plantas tratadas con dosis 3X de nitrógeno disminuyen los valores de la eficiencia cuántica fotoquímica asociada al flujo de electrones no cíclico del PSII (ϕ_{PSII}), atenuación fotoquímica del PSII (q_P) y consecuentemente aumenta la disipación de la energía no radiativa (NPQ), probablemente porque las plantas que crecen con mayor suministro de nitrógeno invierten una mayor proporción de carbono en proteínas (Makino et al., 1984), produciéndose una relación inversa entre la concentración de carbohidratos y el suministro de nitrógeno en la planta (Chapin et al., 1986). Por otra parte, la proteína rubisco ha sido identificada como un lugar potencial de acción del O₃ (Pell y Pearson, 1983; Dann y Pell, 1989). Si el contenido de rubisco es alto en plantas crecidas con altas concentraciones de N, los efectos del O₃ pueden ser maximizados por incrementarse los lugares celulares para su oxidación. En efecto, Rowland y colaboradores (1988), indican que existe un incremento en la síntesis de la proteína en presencia de altas dosis de N, además el ozono es conocido por oxidar los grupos amino y SH de las proteínas de membranas. Estos resultados son

concordantes con el aumento de la peroxidación de lípidos de membrana observados en la variedad Reina de Corazones crecidas en NF+O₃ y tratadas con dosis 3X de nitrógeno. La respuesta en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila refleja alteración de la capacidad fotosintética del PSII, el cual puede estar relacionado con el aumento de la peroxidación de lípidos de membrana que presentan las hojas de sandía variedad Reina de Corazones. La fluorescencia modulada de la clorofila a no fue afectada por las dosis de nitrógeno en el ambiente CF; en cambio los valores de los parámetros asociados a los procesos fotoquímicos (ϕ_{PSII} y q_P) en la dosis 3X disminuyen en plantas crecida en cámaras NF, siendo más acentuada la disminución en las plantas tratadas con dosis 3X en el ambiente NF+O₃.

Las interacciones entre los efectos de ozono y el aporte de nitrógeno han sido investigadas sobre el crecimiento y daño foliar en las plantas. Ormrod et al (1973) demostraron que cuando las plantas de rábano cv. Cavalier fueron expuestas a 0.25 $\mu\text{l l}^{-1}$ de O₃ por 4 horas, las plantas crecidas con un bajo régimen de nitrógeno exhibieron menos efectos sobre el peso seco que las plantas crecidas con alto suministro de nitrógeno. Otros investigadores demostraron que el daño foliar inducido por O₃ en *Spinacia oleracea* cv. *Viroflay* y *Nicotiana rústica* L. fueron aumentados cuando las plantas fueron crecidas en tratamientos de nitrógeno relativamente altos (Brewer et al., 1961; Leone et al., 1966; Ormrod et al., 1973). En nuestros resultados la interacción entre ozono y nitrógeno sugiere que las plantas crecidas con altos niveles de N se manifiestan con una mayor sensibilidad al estrés causado por el ozono, que podría estar relacionado en términos de biomasa foliar (Tjoelker y Luxmoore, 1991), disminuyendo la capacidad de asimilación de CO₂, de la actividad del transporte de electrón fotosintético (Ferrar y Osmond, 1986; Seemann et al., 1987; Baker et al., 1994) y de diversas enzimas claves involucradas en el ciclo de Calvin (Terashime y Evans, 1988; Sugiharto et al., 1990), todas estas acciones llevadas a cabo en la planta pueden explicar la disminución de la producción total de frutos de un 35% observadas en las plantas de sandía variedad Reina de Corazones crecidas en el ambiente NF+O₃ y tratadas con dosis 3X de nitrógeno. Tanto los parámetros de la fluorescencia como en el rendimiento de la producción de frutos, fueron manifestados con un

efecto sinérgico de las altas concentraciones de ozono y dosis altas de nitrógeno en el ambiente NF+O₃.

El cociente de la fluorescencia de la clorofila F_v/F_m correlacionado con el número de centros funcionales del PSII y el rendimiento cuántico de evolución del oxígeno (Öquist et al., 1992) fue utilizado para determinar la fotoinhibición. La recuperación de F_v/F_m , fue más afectada en el ambiente NF+O₃, especialmente en las plantas tratadas con la dosis 3x (Farage et al., 1991; Ögren y Rosenqvist, 1992; Gray et al., 1994). La fotoinhibición es la inhibición de la fotosíntesis por la luz y puede incrementarse en presencia de otros estreses y puede destruir los componentes estructurales de los centros de reacción del PSII.

En resumen, mayor concentración del ozono y altas dosis de nitrógeno presentan un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo de la planta, coincidiendo con la disminución de los procesos fotoquímicos, un mayor incremento de la atenuación no-fotoquímica, mayor daño oxidativo reflejado por el aumento de la fotoinhibición y la peroxidación de lípidos, y como consecuencia la productividad disminuye.



Foto 1. Plantas de sandía var. Reina de Corazones crecidas en cámara CF.



Foto 2. Plantas de sandía var. Reina de Corazones crecidas en cámara NF.

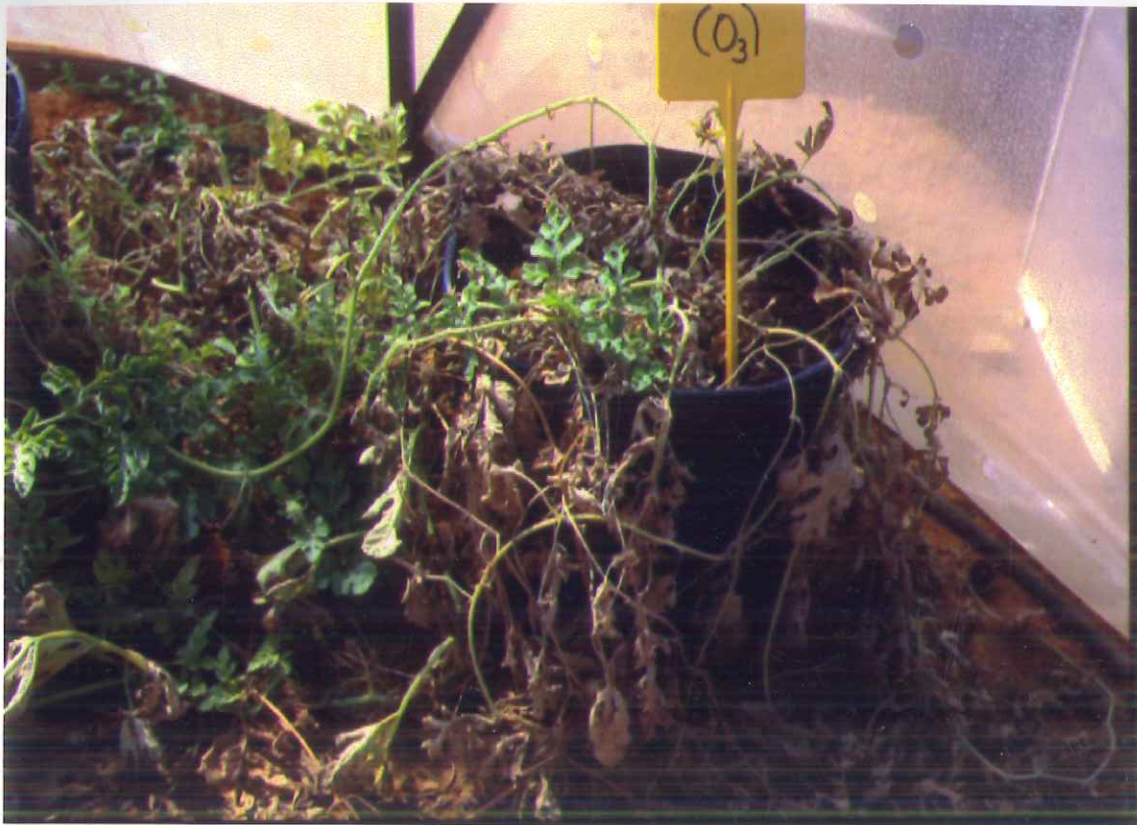


Foto 3. Planta de sandía var. Reina de Corazones crecida en cámara NF+O₃.



Foto 4. Detalle de las hojas de sandía con síntomas visibles en cámara NF.

8. EFECTOS SIMILARES DEL OZONO EN CUATRO VARIEDADES DE LECHUGA CRECIDAS EN CÁMARAS ABIERTAS DURANTE EL INVIERNO

8.1 RESUMEN

Se estudiaron los efectos de diferentes concentraciones de ozono sobre cuatro variedades de lechuga durante el invierno a través de la fluorescencia de la clorofila *a*, peroxidación de lípidos y longitud de raíces en cámaras abiertas (OTC's). Bajo condiciones de alta concentración de O₃, la conversión cuántica fotosintética disminuye mientras la emisión por calor y la emisión de la fluorescencia de la Chl *a* se incrementan en todas las variedades. Los cambios en los parámetros de la fluorescencia de la Chl pueden estar asociados con un incremento en la peroxidación de lípidos de membrana, y en la reducción de la longitud de las raíces bajo estrés por ozono.

8.2 INTRODUCCIÓN

El ozono es un contaminante fotoquímico que puede afectar seriamente a la vegetación (Heck et al., 1983). Hay evidencias que muchas áreas del Mediterráneo están sufriendo un problema crítico por los oxidantes fotoquímicos (Gimeno et al., 1999, Calatayud y Barreno, 2000, 2001) especialmente durante la primavera y el verano pero poco se ha estudiado respecto a la sensibilidad del O₃ durante el invierno. Estos estudios son interesantes porque se ha detectado niveles de O₃ en Valencia durante el invierno, el cual puede modificar la respuesta de los cultivos.

Los efectos del O₃ sobre los organismos biológicos se atribuyen a su capacidad para dismutar espontáneamente o reaccionar con los constituyentes celulares para generar un exceso de especies activas de oxígeno (AOS) (Rao et al., 2000). El O₃ es considerado uno de los más importantes contaminantes del aire que causan pérdidas significativas en el rendimiento de los cultivos sensibles (Heck et al., 1988), aunque el mecanismo de acción del

O₃ no ha sido totalmente determinado (Tingey y Anderson, 1991). Muchos estudios aportan, que el ozono deteriora las funciones de la membrana, disminuye la fotosíntesis, impacta sobre las raíces y tallos e induce a la senescencia prematura (Lefohn, 1992).

La medición de la fluorescencia de la Chl *a* suministra información sobre la reacción de la luz en la fotosíntesis y sirve como un indicador no intrusivo del estado de los centros de reacción fotosintética de las plantas.

El aparato fotosintético representa un punto crucial de contacto entre la planta y el ambiente y es particularmente sensible al O₃. Cuando las plantas están expuestas al O₃ u otros estreses, el exceso de luz solar puede conducir a una disminución en la eficiencia del PSII y por lo tanto a una disminución de la fotosíntesis. Las plantas pueden disipar el exceso de la energía por la atenuación no-fotoquímica como un mecanismo de adaptación que sirve como protección para evitar el daño al PSII, en otros casos si los límites son excedidos y la capacidad de adaptación es excedida, puede resultar un daño permanente o la muerte (Krause, 1994, Demmig-Adams y Adams, 1992, Foyer et al., 1994, Ciompi et al., 1997, Calatayud y Barreno, 2001). El aparato fotosintético no es el único objetivo afectado por el O₃, las membranas y otros puntos de las células resultan modificadas en su estructura produciéndose cambios en las relaciones iónicas y de los solutos de los componentes celulares, las cuales pueden luego alterar la fotosíntesis (Heath, 1988).

En este trabajo se estudió el efecto de la fumigación con ozono comparado con el aire ambiente y con aire filtrado sobre cuatro variedades de lechuga durante el invierno en cámaras abiertas. La fluorescencia de la Chl *a*, la peroxidación de lípidos y la longitud de raíces fueron investigadas para evaluar el daño por ozono en las plántulas de lechuga.

8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

8.3.1 Plantas

Las plántulas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) de cuatro variedades: Valladolid, Del Prat, Odra y Maravilla Verde, fueron germinadas en vermiculita y mantenidas en el invernadero de la Estación Experimental Agraria de Carcaixent en Valencia. Las condiciones ambientales durante el periodo de crecimiento en el invernadero fueron como sigue: de 15 a 20 °C (día), 6 a 12 °C (noche); la humedad relativa de 50 a 95%; la radiación activa fotosintética de las máximas intensidades tiempo-día en plantas vasculares en el invernadero, 500-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plántulas fueron transplantadas en una bandeja de corcho que contenía una mezcla de suelo comercial (Terraplant, BASF, Unchte, Germany) y transferidos dentro de las OTC's durante un periodo de 30 días (desde el 08/12/00 hasta el 08/01/01. Durante este periodo de crecimiento, las plantas fueron regadas diariamente por goteo.

8.3.2 Tratamiento en las cámaras abiertas

Las plántulas se dispusieron en bandejas de corcho y se situaron en las nueve cámaras abiertas (OTC's), localizadas en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent, cada bandeja de corcho contenía una variedad. La instalación de las OTC's se basó sobre el diseño original empleado en el programa NCLAN (ver Heagle et al., 1973). Las plántulas fueron ventiladas continuamente las 24 horas del día bajo los siguientes tratamientos: tres cámaras con aire filtrado (CF), tres cámaras con aire no filtrado (NF) y tres cámaras con aire no filtrado más una concentración de ozono (NF+O₃). Las características de cada tratamiento, concentración de ozono registrado durante el día, características de los registros de los contaminantes y otros se indican en la sección 5.3.2, capítulo 5.

8.3.3 Medición de la fluorescencia de la clorofila a

La medición de la fluorescencia de la clorofila a fue realizada al final del periodo de crecimiento siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.3.4, capítulo 5. Además, en esta medición de la fluorescencia fueron incluidos los siguientes parámetros: la eficiencia intrínseca del PSII que fue calculada como F_v'/F_m' , ϕ_{exc} (Genty et al., 1989). El cociente $(1-q_p)/NPQ$ fue utilizado para estimar el exceso de fotones y por lo tanto la susceptibilidad del PSII a la luz (Park et al., 1995). La fracción de luz absorbida que se disipa en la antena del PSII (%D) y la utilizada en la fotoquímica del PSII (%P) fue estimada como $1-(F_v'/F_m') \times 100$ y $(F_v'/F_m')q_p \times 100$ respectivamente (Demmig-Adams et al., 1996). La fracción de luz absorbida por el PSII que no es utilizado en la fotoquímica ni disipada en la antena del PSII (%X) fue estimada como $(F_v'/F_m')(1-q_p) \times 100$ (Demmig-Adams et al., 1996).

8.3.4 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue determinada siguiendo el protocolo descrita en la sección 5.3.5, capítulo 5.

8.3.5 Medición de la longitud de la raíz principal

La medición de la longitud de la raíz principal (cm) fue realizada el último día de permanencia de las plántulas de lechuga en las cámaras abiertas, para lo cual se aplicó un riego ligero a las plántulas para desprender todo el sustrato y se procedió a su medición.

8.3.6 Análisis estadístico

El análisis de variancia (ANOVA) fueron realizados sobre los datos experimentales a una significación estadística de $p < 0.05$ y fue estimada por el método de la mínima diferencia significativa (LSD).

El análisis estadístico fue realizada usando un programa estadístico SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

8.4 RESULTADOS

8.4.1 Calidad del aire

Los daños causados por las altas concentraciones de ozono (NF+O₃) fueron manifestados por la incidencia de daños visibles en la variedad Maravilla Verde con manchas rojizas purpúreas y plateadas aparecidas en el ápice y bordes de la hoja en comparación a las demás variedades que manifiestan un encogimiento de las hojas y una menor turgencia (ver fotos al final del capítulo).

Durante el periodo de cultivo, las concentraciones de NO_x y SO₂ fueron bajas (menos de 8 nl l⁻¹ para los NO_x y 2 nl l⁻¹ para el SO₂). Las concentraciones de ozono acumuladas que sobrepasen el umbral de los 40 nl l⁻¹ durante las horas de luz solar fueron expresadas como AOT40. El AOT40 en el tratamiento NF+O₃, registrados durante 30 días de periodo de cultivo fue de 9490 nl l⁻¹. Los datos del AOT40 en el tratamiento CF no sobrepasaron el umbral de los 40 nl l⁻¹; y el tratamiento NF registro 160 nl l⁻¹ (Tabla 8.1).

Tabla 8.1. Datos de la concentración acumulativa de ozono, expresado como AOT40 y la media mensual de las variables climáticas (temperatura (°C), humedad relativa (%)) y radiación solar (W/m²), registrados desde el 08/12/00 al 08/01/01 en los tratamientos CF, NF, NF+O₃.

| PARÁMETRO | CF | NF | NF+O ₃ |
|-------------------------|------------|------------|-------------------|
| AOT40 | 0 | 160 | 9490 |
| T (°C) | 11.50±2.39 | 11.30±2.54 | 12.20±2.33 |
| H.R (%) | 74.30±12.2 | 77.50±13.0 | 70.10±13.2 |
| R.S (W/m ²) | 176.00±24 | 176.00±24 | 176.00±24 |

8.4.2 Parámetros de la fluorescencia de la clorofila a

La Tabla 8.2, muestran los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a en hojas adaptadas a la oscuridad de las cuatro variedades de plántulas lechuga: Valladolid, Del Prat, Odra y Maravilla Verde en los tratamientos CF, NF y NF+O₃, al final del periodo de cultivo (30 días). El rendimiento cuántico máximo del PSII, F_v/F_m no cambia significativamente en presencia de altas concentraciones de O₃. Esto indica que las hojas de las plantas crecidas en NF y NF+O₃ no presenta signos de fotoinhibición. El menor valor obtenido en este cociente fue el resultado de una disminución del parámetro de la fluorescencia máxima F_m , permaneciendo sin cambios los valores de la fluorescencia basal, F_o en todas las variedades y tratamientos.

Tabla 8.2. Cambios del estado adaptado a la oscuridad de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a (F_o , F_m , y F_v/F_m) en hojas de lechuga al final de la estación de crecimiento (30 días). Los valores son medios para n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p < 0.05$ (LSD).

| Tratamientos | Valladolid | | | Del Prat | | |
|-------------------|------------|--------|-----------|----------|--------|-----------|
| | F_o | F_m | F_v/F_m | F_o | F_m | F_v/F_m |
| CF | 0.271a | 1.544a | 0.824a | 0.267a | 1.456a | 0.831a |
| NF | 0.279a | 1.421a | 0.813a | 0.273a | 1.623a | 0.815a |
| NF+O ₃ | 0.253a | 1.387a | 0.817a | 0.255a | 1.290a | 0.802a |

| Tratamientos | Odra | | | Maravilla Verde | | |
|-------------------|--------|--------|-----------|-----------------|--------|-----------|
| | F_o | F_m | F_v/F_m | F_o | F_m | F_v/F_m |
| CF | 0.265a | 1.438a | 0.822a | 0.251a | 1.362a | 0.815a |
| NF | 0.272a | 1.536a | 0.814a | 0.247a | 1.276a | 0.802a |
| NF+O ₃ | 0.260a | 1.325a | 0.802a | 0.237a | 1.224a | 0.801a |

La atenuación de la fluorescencia de la Chl a en el estado estacionario de la cinética de inducción de la fluorescencia fue medida en las cuatro variedades de plántulas de lechuga (Tabla 8.3). La fumigación con ozono (NF+O₃) conduce a una disminución en la eficiencia fotoquímica actual del PSII (ϕ_{PSII}) y en la fracción de los centros abiertos del PSII (q_p) en todas las variedades de

lechuga. El parámetro NPQ es un buen estimador de la disipación del calor del PSII, cuyos valores aumentan en todas las variedades en los tratamientos NF y NF+O₃, siendo mayor en este último tratamiento. El cociente entre la presión de excitación (1-q_P) y NPQ es un estimador del exceso de fotones absorbidos durante la inducción de la fotosíntesis. Los valores de este cociente no cambian en las hojas de las plantas crecidas en NF y NF+O₃ con respecto al control, excepto en la variedad Valladolid. Los valores de la eficiencia intrínseca del PSII en la captura de excitones, ϕ_{exc} , fueron menores en las hojas de los tratamientos NF y NF+O₃ en todas las variedades, indicando que los centros abiertos mostraron una disminución en la eficiencia de la captura de excitones. Los valores del cociente de la disminución de la fluorescencia, Rfd, fueron menores por la fumigación con ozono en todas las variedades. Desde los parámetros de la fluorescencia es posible estimar el destino de la luz absorbida (Tabla 8.3). La fracción de luz absorbida por la antena del PSII usada en la fotoquímica (%P) fue disminuida en todas las variedades y tratamientos NF y NF+O₃ y la fracción termal disipada en la antena (%D) y la fracción no usada en la fotoquímica, ni disipada en la antena (%X) aumentaron en todas las variedades y para los tratamientos NF y NF+O₃.

Tabla 8.3. Cambios en los parámetros de la clorofila *a* en cuatro variedades de lechuga después de 30 días en cámaras abiertas. Los valores son medios de 8 muestras. Letras diferentes indican diferencias significativas en $p < 0.05$ (LSD).

| Valladolid | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|----------------|--------|--------------|-----------------------|-------|-----|-----|-----|
| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q _P | NPQ | ϕ_{exc} | 1-q _P /NPQ | Rfd | %P | %D | %X |
| CF | 0.605a | 0.810a | 1.072a | 0.747a | 0.17a | 3.48a | 61a | 25a | 14a |
| NF | 0.485b | 0.793a | 1.469b | 0.611b | 0.15a | 3.40a | 49b | 38b | 13a |
| NF+O ₃ | 0.447c | 0.720b | 1.899c | 0.620b | 0.11b | 3.25a | 44b | 39b | 17a |

| Del Prat | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|----------------|--------|--------------|-----------------------|-------|-----|-----|-----|
| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q _P | NPQ | ϕ_{exc} | 1-q _P /NPQ | Rfd | %P | %D | %X |
| CF | 0.573a | 0.847a | 0.875a | 0.676a | 0.17a | 3.56a | 58a | 32a | 10a |
| NF | 0.543a | 0.809a | 1.013b | 0.671a | 0.19a | 3.08b | 54a | 33a | 13a |
| NF+O ₃ | 0.445b | 0.715b | 1.661c | 0.622b | 0.17a | 2.54c | 44b | 39b | 17b |

Odra

| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q_P | NPQ | ϕ_{exc} | $1-q_P/NPQ$ | Rfd | %P | %D | %X |
|-------------------|---------------|--------|--------|--------------|-------------|-------|-----|-----|-----|
| CF | 0.540a | 0.851a | 1.290a | 0.634a | 0.11a | 3.42a | 54a | 37a | 9a |
| NF | 0.524a | 0.845a | 1.326a | 0.620a | 0.12a | 3.47a | 52a | 38a | 10a |
| NF+O ₃ | 0.429b | 0.803b | 1.548b | 0.534b | 0.13a | 3.22a | 43b | 47b | 10a |

Maravilla Verde

| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q_P | NPQ | ϕ_{exc} | $1-q_P/NPQ$ | Rfd | %P | %D | %X |
|-------------------|---------------|--------|--------|--------------|-------------|-------|-----|-----|-----|
| CF | 0.608a | 0.855a | 0.629a | 0.711a | 0.23a | 2.83a | 60a | 30a | 10a |
| NF | 0.544b | 0.819b | 0.850b | 0.664b | 0.22a | 2.70a | 54b | 34a | 12a |
| NF+O ₃ | 0.493c | 0.792b | 1.028c | 0.622b | 0.21a | 2.45b | 49c | 38a | 13a |

8.4.3 Peroxidación de lípidos y longitud de raíces

La Tabla 8.4 muestra los resultados del contenido de MDA y de la longitud de las raíces en las plantas de lechuga sujetas a diferentes calidades de aire. La peroxidación de lípidos fue incrementada significativamente en las hojas después de la exposición al ozono. Este incremento fue mayor bajo el tratamiento NF+O₃ que en NF en comparación a CF. La longitud de raíces fue disminuida en todas las variedades en los tratamientos NF y NF+O₃ con respecto al control CF.

Tabla 8.4. Contenido de MDA (nmol MDA g⁻¹ (FW)) y longitud de raíces (L.R) (cm) en las variedades: Valladolid, Del Prat, Odra y Maravilla Verde en diferentes tratamientos. El análisis fue llevado a cabo después de 30 días en las cámaras abiertas. Los valores representan las medias de cinco repeticiones. En cada columna, los números seguidos por las mismas letras indican no diferencias significativas a p<0.05 (LSD).

| Tratamiento | Valladolid | | Del Prat | | Odra | | Maravilla V. | |
|-------------------|------------|---------|----------|--------|--------|---------|--------------|--------|
| | MDA | L.R | MDA | L.R | MDA | L.R | MDA | L.R |
| CF | 16.88a | 17.38a | 24.27a | 18.41a | 24.25a | 17.03a | 16.45a | 17.13a |
| NF | 22.69b | 15.93ab | 32.19b | 15.04b | 27.48a | 15.30ab | 22.83b | 17.00a |
| NF+O ₃ | 32.74c | 13.90b | 37.63b | 13.08b | 36.90b | 13.21b | 37.84c | 13.50b |

8.5 DISCUSIÓN

La exposición de las plántulas de lechuga a la concentración del ozono invernal (NF) y fumigación de ozono (NF+O₃) causó una modificación en los parámetros de la fluorescencia de la Chl *a*: disminuyendo el transporte no-cíclico de electrones, la atenuación fotoquímica, e incrementando la disipación del calor y peroxidación de lípidos, mientras la longitud de raíz fue disminuida en las cuatro variedades crecidas en la OTC's.

Las hojas del tratamiento NF y NF+O₃ no muestran ningún signo de fotoinhibición, indicado por los valores del cociente F_v/F_m que no presentan diferencias significativas en comparación con el control. Bajo el estado estacionario de la cinética de inducción de la fluorescencia, las hojas NF y NF+O₃ muestran una disminución en la eficiencia fotoquímica actual del PSII (ϕ_{PSII}) y en la fracción de los centros abiertos del PSII (q_P), comparados con el control indicando que el ozono disminuye la eficiencia cuántica del transporte no-cíclico de electrones y la capacidad para reoxidar la Q_A durante la iluminación actínica. Cuando las plantas crecen bajo condiciones ambientales estresantes, la activación de los procesos de la atenuación permite a las plantas modular sus reacciones fotoquímicas primarias, como consecuencia la eficiencia fotoquímica actual (ϕ_{PSII}) puede ser limitada, y de este modo prevenir la sobrerreducción de los transportadores de electrones (Foyer et al., 1994) y el aumento de la disipación de la energía no radiativa como calor, puede ser una estrategia fotoprotectiva (Osmond, 1994; Horton et al., 1996). Paralelo a la disminución de q_P , un incremento en los valores de NPQ fue observado en hojas NF y NF+O₃. El incremento de NPQ en ambos tratamientos con respecto al control (CF), corresponde con una mayor fracción de la Q_A reducida, favoreciendo el desarrollo de la atenuación no-fotoquímica a expensas de la utilización de la energía de excitación (disminución de ϕ_{exc} y ϕ_{PSII}). En nuestros resultados, la energía de excitación que alcanza a los centros del PSII disminuye, indicado por la disminución de los valores de la eficiencia intrínseca en la captura de excitones por los centros de reacción abiertos del PSII (ϕ_{exc}). El cociente $(1-q_P)/NPQ$ relaciona los valores entre la presión de excitación y la atenuación no-fotoquímica y es un estimador del exceso de fotones. Los valores de esta relación fueron similares

para todos los tratamientos (CF, NF y NF+O₃) en todas las variedades, excepto en la variedad Valladolid, indicando que aunque los valores de la presión de excitación (1-q_p) disminuyen con respecto al control, los valores de NPQ fueron suficientemente altos para mantener esta relación y prevenir el daño mediante la disipación de la energía de excitación por calor en el PSII.

Los resultados obtenidos, indican que la disminución en el rendimiento cuántico del transporte de electrones del PSII, la menor eficiencia de la captura de los excitones por los centros de reacción abiertos del PSII, y del incremento de la proporción de centros cerrados del PSII, y el aumento de los valores de NPQ pueden ser un mecanismo de regulación en el proceso fotosintético.

La distribución de la energía en hojas expuestas al O₃ fue diferente con respecto al control en todas las variedades. El ozono ambiental y la fumigación con ozono limitan la actividad fotosintética, indicada por la disminución del parámetro %P, y un incremento de la energía absorbida fue disipada como energía termal %E y vías alternativas %X. La distribución de la energía fue relacionada con los datos obtenidos en los parámetros de la fluorescencia.

Los cambios en el rendimiento de la fluorescencia en hojas crecidas en NF y NF+O₃ fueron asociados con los cambios ocurridos en las membranas tilacoidales, y se ha sugerido que el ozono altera las propiedades de la membrana (Calatayud et al., 2002; Calatayud y Barreno 2001; Guidi et al., 2000). El O₃ o los AOS pueden reaccionar con los ácidos grasos insaturados formando hidroperóxidos (Knox y Dodge, 1985). El daño a la membrana debido a la peroxidación de lípidos fue medido en todos los tratamientos y variedades. El análisis de MDA parece confirmar que la mayor peroxidación de lípidos de membrana se da en los tratamientos NF y NF+O₃, comparadas con las hojas crecidas en CF. El contenido de MDA ha sido relacionado con el grado de exposición por ozono en las plantas vasculares (Price et al., 1990, Yoshida et al., 1994, Ranieri et al., 1996, Calatayud y Barreno 2001).

El incremento de los niveles del O₃ conduce a una reducción en la longitud de las raíces en todos los cultivares de lechuga, después de 30 días de exposición. La reducción en la longitud de las raíces puede estar asociada con la disminución del crecimiento de las raíces (Ollerenshaw et al., 1999). Muchos estudios indican que el O₃ causa un menor crecimiento en las raíces, que en los tallos (Cooley y Manning, 1987, Kasana, 1991). Esta respuesta ha sido discutida en términos de que el O₃ induce alteraciones en las relaciones fuente-sumidero (Cooley y Manning 1987, Miller, 1988, Renaud et al., 1997). Una menor disponibilidad de carbono para exportar a las raíces puede disminuir el crecimiento de las raíces en beneficio del tallo. Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados obtenidos, en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a.

En resumen, las plántulas de lechuga compuestas por las variedades: Valladolid, Del Prat, Odra y Maravilla Verde expuestas al ozono presentan alteraciones y modificaciones en las células de las plantas, afectando los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a, incrementando la peroxidación de lípidos y disminuyendo la longitud de las raíces.



Foto 1. Plántulas de lechuga crecidas en cámaras CF.

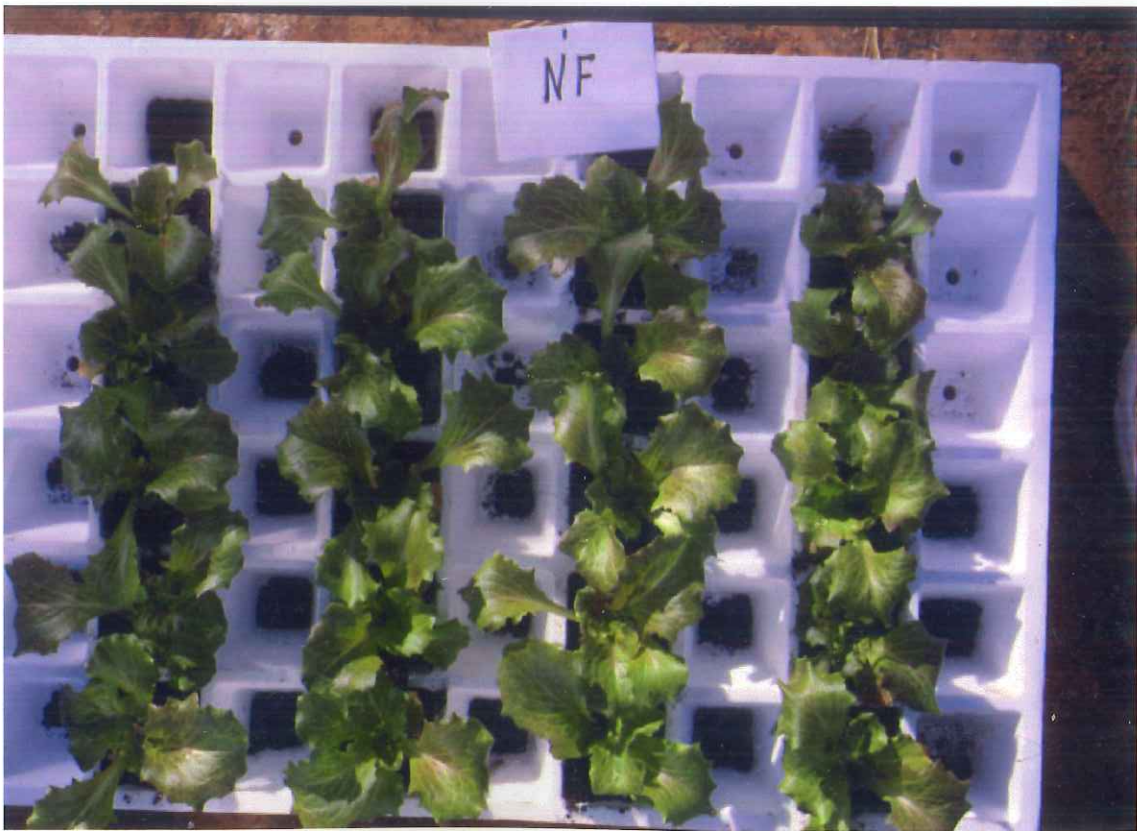


Foto 2. Plántulas de lechuga var. Maravilla Verde crecidas en cámaras NF.



Foto 3. Plántulas de lechuga var. Del Prat crecidas en cámaras NF+O₃.



Foto 4. Plántulas de lechuga var. Odra crecidas en cámaras NF+O₃.

9. EFECTOS DEL OZONO SOBRE EL CULTIVO DE LA COL (*Brassica oleracea* L.) EN CÁMARAS ABIERTAS

9.1 RESUMEN

Los efectos de las fumigaciones con O₃ y concentraciones del ozono ambiental sobre las plántulas de col de las variedades Caramba, Sentinel y Othelo, crecidas en cámaras abiertas durante un periodo de tiempo de 30 días, y fueron estudiadas por medio de la fluorescencia modulada de la clorofila a, peroxidación de lípidos y conductividad de solutos.

El incremento de las exposiciones de ozono disminuye el rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m), el flujo no-cíclico de electrones (ϕ_{PSII}), atenuación fotoquímica (q_p) y el cociente de la conversión cuántica fotosintética potencial (Rfd), siendo más pronunciados estos efectos en las variedades Caramba y Sentinel y en menor grado en la variedad Othelo. El ozono tiene efectos deletéreos sobre las membranas provocando cambios en el incremento de la conductividad de solutos y así como en la peroxidación de lípidos de membrana y fue más intensificada en las variedades Caramba y Sentinel que en Othelo. Las alteraciones de las membranas disminuyen la capacidad de desarrollar la atenuación fotoquímica y no-fotoquímica.

9.2 INTRODUCCIÓN

En los recientes años, el ozono fitotóxico ha sido reconocido como uno de los más frecuentes contaminantes del aire cuya concentración ha ido incrementándose en la troposfera (Versino, 1997). En el área Mediterránea su efecto ha sido documentado por algunos investigadores (Lorenzini y Panattoni, 1986; Calatayud y Barreno 2000; Calatayud et al., 2001). Las concentraciones ambientales de ozono, afectan de manera particular el aparato fotosintético, incluso antes de que se manifiesten los síntomas visibles, reduciendo la absorción del CO₂ asociado a una disminución de la

conductividad estomática y a la capacidad de fijar CO₂ por las células del mesófilo (Ciompi et al., 1997), y una acelerada senescencia de la hoja (Koch et al., 1998; Reichenauer et al., 1998). El ozono actúa como un fuerte oxidante que modifica la estructura y función de la membrana produciéndose cambios en las relaciones iónicas y de los solutos en los componentes celulares, el cual puede alterar el metabolismo fotosintético (Heath, 1988). Las alteraciones en el balance de los iones son causadas por la interrupción de la integridad de las membranas como consecuencia de la producción de especies de radicales de oxígeno tóxico que producen la oxidación de sus grupos sulfidrilos protéicos y de los lípidos.

El objetivo de esta investigación fue estudiar los efectos del ozono sobre las tres variedades de plántulas de coles (*Brassica oleracea* L.): Sentinel, Othelo y Caramba cultivadas en cámaras abiertas y fue estudiada a través de las técnicas de la fluorescencia modulada de la clorofila *a*, peroxidación de lípidos de membrana y conductividad de solutos.

9.3 MATERIALES Y MÉTODOS

9.3.1 Plantas

Las plántulas de col (*Brassica oleracea* L.) de tres variedades: Sentinel, Othelo y Caramba, fueron germinadas en vermiculita y mantenidos en el invernadero de la Estación Experimental Agraria de Carcaixent en Valencia. Las condiciones ambientales durante el crecimiento de la planta en el invernadero fueron los siguientes: de 15 a 20 °C (día), de 10 a 15 °C (noche); la humedad relativa de 50 a 95%; la radiación activa fotosintética de las máximas intensidades en el invernadero, de 500-700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las plántulas después de cuatro semanas de edad fueron transplantadas en bandejas de corcho, cuadradas y con orificios en la base, con una altura de 12 cm. En cada cuadrado se instaló una plántula en una mezcla de suelo comercial (Terraplant, BASF, Uchte, Germany), y transferidas dentro de las OTC's donde permanecieron 30 días (desde el 15 de Febrero

al 15 de Marzo). Durante este periodo de crecimiento fueron regadas diariamente por goteo. Cada OTC's contenía 10 plántulas de cada variedad.

9.3.2 Tratamiento en las cámaras abiertas

Las plántulas en bandeja de corcho, fueron crecidas en nueve cámaras abiertas (OTC's), localizadas en la Estación Experimental Agraria de Carcaixent. Las instalación de las OTC's se basó sobre el diseño original empleado en el programa NCLAN (ver Heagle et al., 1973). Las plántulas fueron ventiladas continuamente las 24 horas del día bajo los siguientes tratamientos: tres cámaras con aire filtrado (CF), tres cámaras con aire no filtrado (NF) y tres cámaras con aire no filtrado más la concentración de ozono (NF+O₃). Las adiciones de ozono fueron llevadas acabo desde las 10 h GMT hasta las 15 h GMT durante cinco días a la semana. Las características de cada tratamiento, concentración de ozono registrado durante el día, características de los registros de los contaminantes y otros se indican en la sección 5.3.2, capítulo 5.

9.3.3 Medición de la fluorescencia de la clorofila a

La medición de la fluorescencia de la clorofila a fue realizada al final del periodo de crecimiento siguiendo el protocolo descrito en la sección 8.3.3, capítulo 8.

9.3.4 Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos fue determinada siguiendo el protocolo descrita en la sección 3.3.5, capítulo 3.

9.3.5 Conductividad de solutos

La medición de la conductividad de solutos fue estimada acorde al protocolo empleado por Nali et al., (1998). Cinco hojas de cada variedad y tratamiento de aire fueron cogidas para la realización de veinte discos de hoja de un tamaño de 10 mm que fueron lavados durante 10 minutos con agua destilada para eliminar la materia y los electrolitos exógenos. Seguidamente los 20 discos fueron colocados en 10 ml de agua ultrapura (Millipore, Milli-Q Plus) y agitados a temperatura ambiente. La conductividad de la solución fue medida periódicamente cada 30 minutos durante 4 horas usando un conductímetro (Crison modelo 525). Posteriormente se mantuvieron las muestras durante 24 horas a una temperatura de -20 °C con el fin de romper células y liberar todos los electrolitos. La medición de la conductancia en diferentes intervalos tiempos se expresó como porcentaje del total de electrolitos liberados después de romper las células (Dijak y Armrod, 1982).

9.3.6 Análisis estadístico

El análisis de variancia (ANOVA) fueron realizados sobre los datos experimentales a una significación estadística de $p < 0.05$ y fue estimada por el método de la mínima diferencia significativa (LSD). El análisis estadístico fue realizada usando un programa estadístico SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

9.4 RESULTADOS

9.4.1 Calidad del aire

Las altas concentraciones de ozono ($\text{NF} + \text{O}_3$) por un periodo de 30 días de fumigación inducen lesiones en forma de moteaduras (manchas rojizas apreciables a la trasluz) en las hojas de las plántulas

de coles de las variedades Caramba y Sentinel (ver fotos al final del capítulo).

Durante el periodo de cultivo, las concentraciones de NO_x y SO_2 fueron bajas (menos de 2 nl l^{-1} para el SO_2 y 8 nl l^{-1} para el NO_x). Las concentraciones de ozono acumuladas que sobrepasen el umbral de los 40 nl l^{-1} durante las horas de luz solar fueron expresadas como AOT40. El AOT40 en el tratamiento $\text{NF}+\text{O}_3$, registrados durante 30 días de periodo de cultivo fue de 12549 nl l^{-1} . Los datos del AOT40 en el tratamiento CF no sobrepasaron el umbral de los 40 nl l^{-1} ; el tratamiento NF registro 59 nl l^{-1} .

Tabla 9.1. Datos de la concentración acumulativa de ozono, expresado como AOT40 (desde las 9.00 am hasta las 3.00 pm) y los valores medios mensuales de las variables climáticas (temperatura ($^{\circ}\text{C}$), humedad relativa (%)) y radiación solar (W/m^2), registrados durante el periodo de cultivo en los tratamientos CF, NF, $\text{NF}+\text{O}_3$.

| PARÁMETRO | CF | NF | $\text{NF}+\text{O}_3$ |
|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| AOT40 | 0 | 59 | 12549 |
| T ($^{\circ}\text{C}$) | 14.82 ± 4.33 | 15.07 ± 4.27 | 14.98 ± 4.29 |
| H.R (%) | 68.68 ± 13.00 | 69.00 ± 13.00 | 71.00 ± 14.00 |
| R.S (W/m^2) | 245.82 ± 58.38 | 245.82 ± 58.38 | 245.82 ± 58.38 |

9.4.2 Parámetros de la fluorescencia de la clorofila a

La Tabla 9.2 muestran los parámetros de la fluorescencia de la clorofila a en hojas de plántulas de tres variedades de coles: Sentinel, Othelo y Caramba adaptadas a la oscuridad en los tratamientos CF, NF y $\text{NF}+\text{O}_3$, al final del periodo de cultivo (30 días). Los valores de F_0 en el tratamiento $\text{NF}+\text{O}_3$ aumenta significativamente en Caramba y Sentinel con relación al control; en cambio en la variedad Othelo se observa una disminución significativa. Los valores de la fluorescencia máxima, F_m , en el tratamiento $\text{NF}+\text{O}_3$ disminuyen significativamente en las tres variedades con relación a CF. Los valores del rendimiento cuántico máximo expresado por el cociente F_v/F_m disminuyen significativamente en el tratamiento $\text{NF}+\text{O}_3$ en las variedades Caramba y Sentinel en comparación al control. La disminución de este cociente

fue atribuida a la disminuci3n de los valores de F_m y al aumento de F_o ; en cambio la variedad Othelo no presenta diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 9.2. Cambios en los parámetros F_o , F_m , F_v/F_m adaptados en la oscuridad en hojas de col al final de la estaci3n de crecimiento en los tratamientos CF, NF, F_v/F_v . Los datos son valores medios para $n= 10$. Letras diferentes indican diferencias significativas a $p<0.05$ (LSD).

| Caramba | | | |
|-------------------|----------|---------|-----------|
| Tratamiento | F_o | F_m | F_v/F_m |
| CF | 0.236 a | 1.116 a | 0.789 a |
| NF | 0.242 ab | 0.955 b | 0.743 b |
| NF+O ₃ | 0.257 b | 0.793 c | 0.675 c |

| Sentinel | | | |
|-------------------|----------|----------|-----------|
| Tratamiento | F_o | F_m | F_v/F_m |
| CF | 0.236 a | 1.127 a | 0.790 a |
| NF | 0.241 ab | 1.052 ab | 0.770 a |
| NF+O ₃ | 0.255 b | 0.870 b | 0.705 b |

| Othelo | | | |
|-------------------|---------|---------|-----------|
| Tratamiento | F_o | F_m | F_v/F_m |
| CF | 0.248 a | 1.203 a | 0.794 a |
| NF | 0.256 a | 1.220 a | 0.789 a |
| NF+O ₃ | 0.226 b | 1.045 b | 0.780 a |

Los cambios en los parámetros de la fluorescencia modulada de la clorofila *a* al final de la cinética de la iluminaci3n actínica (15 min), se presentan en la Tabla 9.3 en los tratamientos CF, NF y NF+O₃. El flujo de electrones no-cíclico a trav3s del PSII (ϕ_{PSII}) y la fracci3n de los centros abiertos (q_p) asociados con el estado de oxidaci3n-reducci3n de la Q_A disminuyen significativamente con la fumigaci3n de ozono (NF+O₃) en las variedades: Caramba Sentinel y Othelo en comparaci3n a los controles. En el tratamiento NF las concentraciones de ozono afectaron significativamente a los valores de, ϕ_{PSII} , y q_p en Sentinel; en Caramba solamente fue observada una disminuci3n.

significativa en los valores de, ϕ_{PSII} ; en cambio la variedad Othelo no presenta diferencias significativas con relación a los controles. La disipación de la energía no radiativa (NPQ) disminuye significativamente entre tratamientos en la variedad Caramba y Sentinel en comparación al control; Othelo muestra mayores mecanismos de protección con un mayor incremento significativo de sus valores en plantas fumigadas (NF+O₃) con relación al control. El cociente de la presión de excitación (1-q_p)/NPQ estima el exceso de fotones absorbidos durante la inducción fotosintética. Los cambios en este cociente indican que un gran exceso de fotones fue registrado en el tratamiento NF+O₃ en las variedades Caramba y Sentinel; diferenciándose la variedad Othelo cuyos valores no presentan diferencias significativas entre tratamientos. La eficiencia intrínseca del PSII en la captura de excitones, ϕ_{exc} fue disminuida en las plantas tratadas con ozono (NF+O₃) en las tres variedades estudiadas indicando que los centros abiertos presentan una disminución en la eficiencia de la captura de excitones. Los valores del cociente de la disminución de la fluorescencia, Rfd, fueron disminuidos significativamente por las fumigaciones de ozono (NF+O₃) en las variedades Caramba y Sentinel, pero no en Othelo. A partir de los parámetros de la atenuación de la fluorescencia es posible estimar el destino de las diferentes fracciones de luz absorbida. La fracción de luz absorbida por la antena del PSII usada en la fotoquímica (%P) disminuye significativamente en plantas fumigadas con ozono en las tres variedades, la fracción termal disipada (%D) y la fracción que no es usada en la fotoquímica, ni disipada en la antena (%X) aumentan significativamente en todas las variedades crecidas en el ambiente NF+O₃.

Tabla 9.3. Cambios en los parámetros de la fluorescencia modulada de la clorofila *a* y P%, %D, y %X en variedades de Col después de 30 días en cámaras abiertas. Los datos son medias para n=8. Letras diferentes indican diferencias significativas a p<0.05 (LSD).

| Caramba | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|--------|--------|--------------|-------------|-------|------|-----|-----|
| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q_P | NPQ | ϕ_{exc} | $1-q_P/NPQ$ | Rfd | %P | %D | %X |
| CF | 0.590a | 0.875a | 0.868a | 0.674a | 0.13a | 2.73a | 60a | 33a | 7a |
| NF | 0.517b | 0.865a | 0.725b | 0.598b | 0.19b | 2.13a | 52ab | 40b | 8a |
| NF+O ₃ | 0.442c | 0.777b | 0.687c | 0.568b | 0.33c | 1.55b | 44b | 43b | 13b |

| Sentinel | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|--------|--------|--------------|-------------|-------|-----|-----|-----|
| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q_P | NPQ | ϕ_{exc} | $1-q_P/NPQ$ | Rfd | %P | %D | %X |
| CF | 0.622a | 0.920a | 0.789a | 0.671a | 0.10a | 2.72a | 62a | 33a | 5a |
| NF | 0.575b | 0.883b | 0.682b | 0.651a | 0.16b | 2.40a | 57b | 35a | 8b |
| NF+O ₃ | 0.475c | 0.815c | 0.550c | 0.581b | 0.34c | 1.69b | 47c | 42b | 11c |

| Othelo | | | | | | | | | |
|-------------------|---------------|--------|--------|--------------|-------------|-------|-----|-----|-----|
| Tratamiento | ϕ_{PSII} | q_P | NPQ | ϕ_{exc} | $1-q_P/NPQ$ | Rfd | %P | %D | %X |
| CF | 0.664a | 0.950a | 0.467a | 0.700a | 0.11a | 2.40a | 67a | 30a | 3a |
| NF | 0.628a | 0.922a | 0.490a | 0.684a | 0.15a | 2.30a | 63a | 32a | 5ab |
| NF+O ₃ | 0.552b | 0.887b | 0.943b | 0.621b | 0.12a | 1.97a | 55b | 38b | 7b |

9.4.3 Peroxidación de lípidos y conductividad de solutos

La Tabla 9.4 muestra los resultados del contenido de MDA y porcentaje de conductividad de solutos (% total) en hojas de plántulas de col sujetas a diferentes calidades de aire. La peroxidación de lípidos y la conductividad de solutos fue incrementada significativamente en NF y NF+O₃. El incremento fue mayor en plantas crecidas en el tratamiento NF+O₃: Caramba (76% en TBARS y 60% en la conductividad de solutos), Sentinel (67% en TBARS y 129% en la conductividad de solutos) Othelo (35% en TBARS y 33% en la conductividad de solutos).

Tabla 9.4. Contenido de malondialdehído (nmol MDA g⁻¹ FW) y porcentaje de la conductividad de solutos (% del total) en hojas de las variedades de Caramba, Sentinel y Othelo. Los análisis fueron llevados a cabo después de 30 días en las cámaras abiertas. Los valores representan las medias de 5 repeticiones. En cada columna, los números seguidos por las mismas letras indican no diferencias significativas al p<0.05.

| Coles: | Sentinel | | Caramba | | Othelo | |
|-------------------|----------|--------------|---------|--------------|---------|------------|
| | MDA | % Conductiv. | MDA | % Conductiv. | MDA | % Conduct. |
| CF | 63.8 a | 18.33 a | 74.9 a | 13.9 a | 66.51 a | 18.10 a |
| NF | 85.3 b | 23.60 b | 88.5 b | 20.2 b | 87.54 b | 19.56 a |
| NF+O ₃ | 112.0 c | 31.75 c | 125.0 c | 32.0 c | 90.00 b | 24.02 b |

9.5 Discusión

El ozono actúa como un poderoso oxidante que modifica la estructura y función de las membranas biológicas (Soldatini et al., 1998a), conduciendo a un aumento de la peroxidación de lípidos y conductividad de los solutos. El cociente F_v/F_m indica la eficiencia fotoquímica del PSII y una disminución en este parámetro es un signo de fotoinhibición en los centros de reacción del PSII (Backer y Horton, 1987; Krause y Weiss, 1991). En las plantas fumigadas con ozono este cociente disminuye en las variedades Sentinel y Caramba, el cual indica que las plantas son más sensibles a la luz. La disminución de este cociente fue atribuible, tanto a la disminución de los valores de F_m el cual indica que la fotoquímica del PSII y la capacidad de reducir el primer aceptor Q_A se ven afectadas por la exposición de O_3 , como a un incremento de los valores F_0 el cual indica que el ozono modifica los pigmentos de la antena o disminuye la eficiencia de la captura de excitones en los centros de reacción del PSII (Osmond, 1994). Estos resultados son similares a los obtenidos por Guidi et al., (1997), Ciompi et al., 1997, Guidi et al., (2000) y Calatayud y Barreno (2001). En la variedad Othelo los valores de F_v/F_m son similares en todos los tratamientos, indicando que allí no hay daño fotoinhibitorio en los centros de reacción del PSII. El tratamiento ozono disminuye el transporte de electrón a través del PSII (ϕ_{PSII}), este efecto puede ser dependiente de la disminución en la proporción de los centros abiertos del PSII (q_P) y/o la baja eficiencia de la captura de los excitones por las

Tabla 9.4. Contenido de malondialdehído (nmol MDA g⁻¹ FW) y porcentaje de la conductividad de solutos (% del total) en hojas de las variedades de Caramba, Sentinel y Othelo. Los análisis fueron llevados a cabo después de 30 días en las cámaras abiertas. Los valores representan las medias de 5 repeticiones. En cada columna, los números seguidos por las mismas letras indican no diferencias significativas al p<0.05.

| Coles: | Sentinel | | Caramba | | Othelo | |
|-------------------|----------|--------------|---------|--------------|---------|------------|
| | MDA | % Conductiv. | MDA | % Conductiv. | MDA | % Conduct. |
| Tratamiento | | | | | | |
| CF | 63.8 a | 18.33 a | 74.9 a | 13.9 a | 66.51 a | 18.10 a |
| NF | 85.3 b | 23.60 b | 88.5 b | 20.2 b | 87.54 b | 19.56 a |
| NF+O ₃ | 112.0 c | 31.75 c | 125.0 c | 32.0 c | 90.00 b | 24.02 b |

9.5 Discusión

El ozono actúa como un poderoso oxidante que modifica la estructura y función de las membranas biológicas (Soldatini et al., 1998a), conduciendo a un aumento de la peroxidación de lípidos y conductividad de los solutos. El cociente F_v/F_m indica la eficiencia fotoquímica del PSII y una disminución en este parámetro es un signo de fotoinhibición en los centros de reacción del PSII (Backer y Horton, 1987; Krause y Weiss, 1991). En las plantas fumigadas con ozono este cociente disminuye en las variedades Sentinel y Caramba, el cual indica que las plantas son más sensibles a la luz. La disminución de este cociente fue atribuible, tanto a la disminución de los valores de F_m el cual indica que la fotoquímica del PSII y la capacidad de reducir el primer aceptor Q_A se ven afectadas por la exposición de O_3 , como a un incremento de los valores F_0 el cual indica que el ozono modifica los pigmentos de la antena o disminuye la eficiencia de la captura de excitones en los centros de reacción del PSII (Osmond, 1994). Estos resultados son similares a los obtenidos por Guidi et al., (1997), Ciompi et al., 1997, Guidi et al., (2000) y Calatayud y Barreno (2001). En la variedad Othelo los valores de F_v/F_m son similares en todos los tratamientos, indicando que allí no hay daño fotoinhibitorio en los centros de reacción del PSII. El tratamiento ozono disminuye el transporte de electrón a través del PSII (ϕ_{PSII}), este efecto puede ser dependiente de la disminución en la proporción de los centros abiertos del PSII (q_P) y/o la baja eficiencia de la captura de los excitones por las

unidades del PSII (ϕ_{exc}), dado que $\phi_{PSII} = q_P \times \phi_{exc}$. En nuestros resultados, ambos parámetros fueron afectados por el ozono en el estado estacionario de la cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* en las tres variedades de coles, cuando todas las enzimas involucradas en la fijación de CO_2 están activas. El cociente $(1-q_P)/NPQ$ relaciona los valores entre la presión de excitación y la atenuación no-fotoquímica asociado con un exceso de luz durante el proceso de la fotosíntesis, en los tratamientos NF y NF+O₃ de las variedades Caramba y Sentinel este cociente fue mayor que en el tratamiento CF, indicando la presencia de un exceso de fotones debido a que los valores de la presión de excitación $(1-q_P)$ no fueron suficientemente bajos en las plantas NF y NF+O₃ y/o los valores de NPQ no fueron suficientemente altos para disminuir este cociente, asociado con el daño a los centros de reacción por el incremento observado en F_0 . Se ha demostrado, que la fotoinhibición ocurre cuando se excede la capacidad de los centros del PSII para disipar la energía de modo no radiativo, y coincide con una acumulación de centros de reacción con la Q_A reducida (van Wijk & Hasselt, 1993). En la variedad Othelo este cociente es similar en todos los tratamientos, aunque los valores de $(1-q_P)$ aumentan desde CF a NF+O₃, el NPQ fue suficientemente alto para mantener un menor exceso de fotones.

Los mecanismos protectores de la atenuación no-fotoquímica (NPQ) en la variedad Othelo se incrementan como consecuencia de la disminución de la fluorescencia basal en plantas fumigadas con ozono, diferenciándose de las variedades Sentinel y Caramba. Los menores valores obtenidos en R_{fd} en las variedades Caramba y Sentinel en presencia de O₃ indican que la conversión cuántica fue afectada. La distribución de energía fue diferente entre variedades y tratamientos, el O₃ limita la actividad fotosintética indicada por el parámetro %P, el cual disminuye en comparación a los controles en todas las variedades, y un incremento de la fracción de la energía absorbida fue disipado como energía termal en la antena del PSII (%D) y vías alternativas (%X). El incremento en la fracción %X en NF+O₃ puede conducir a la de-excitación de la clorofila singlete produciendo Chl^* y es por lo tanto la vía menos deseable (Demmig-Adams et al., 1996), el incremento de %X fue mayor en las variedades Caramba y Sentinel en comparación a la variedad Othelo. En resumen, los resultados obtenidos del análisis de la fluorescencia modulada de la clorofila *a*

suministran evidencias del efecto del estrés oxidativo inducidos por el ozono sobre el transporte de electrones fotosintético indicando una disminución de la fotosíntesis. Estos cambios observados en los parámetros de la fluorescencia modulada de la clorofila *a* están asociados con daños a los centros de reacción y sugiere que el ozono altera las propiedades de las membranas. Los datos obtenidos por el análisis de TBARS confirman la presencia de peroxidación de lípidos de membrana en las tres variedades de col en estudio. En efecto, las hojas de col de las variedades Sentinel, Othelo y Caramba expuestas al ozono demostraron un incremento en MDA el cual representa el estado de la peroxidación de lípidos de membrana. La producción de radicales libres de oxígeno adicionada con la presencia de la Chl^* induce modificaciones de la estructura de la membrana y por lo tanto modifica los equilibrios iónicos de la célula, afectando a la estructura de la membrana (Guidi et al. , 2000, Plazek et al., 2000, Calatayud y Barreno 2001). Los datos obtenidos por TBARS y conductividad de solutos confirman la presencia de la peroxidación de lípidos y mayor permeabilidad de la membrana en las tres variedades del tratamiento $NF+O_3$. El daño en la membrana plasmática fue mayor en las variedades Caramba y Sentinel. El NPQ esta relacionado con un proceso disipativo altamente dependiente de la integridad de la membrana (Walters y Horton, 1991), los bajos valores de NPQ en las plantas crecidas en NF y $NF+O_3$ con respecto a CF puede ser debido a la baja relación del ϕ_{PSII} y al daño en las membranas tilacoidales como consecuencia de la peroxidación de lípidos o al incremento en la conductividad entre otras cosas.

En resumen, el estrés producido por el O_3 en las tres variedades de plántulas de col compuestas por Sentinel, Othelo y Caramba puede ser atribuido a las alteraciones y modificaciones producidas en las células, manifestado a través de los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a*, del incremento de la peroxidación de lípidos y de la conductividad de las reacciones iónicas y solutos de las células. En el presente estudio la mayor sensibilidad al O_3 se dio en las variedades Caramba y Sentinel, siendo menos sensible la variedad Othelo.



Foto 1. Plántulas de coles crecidas en cámara CF.

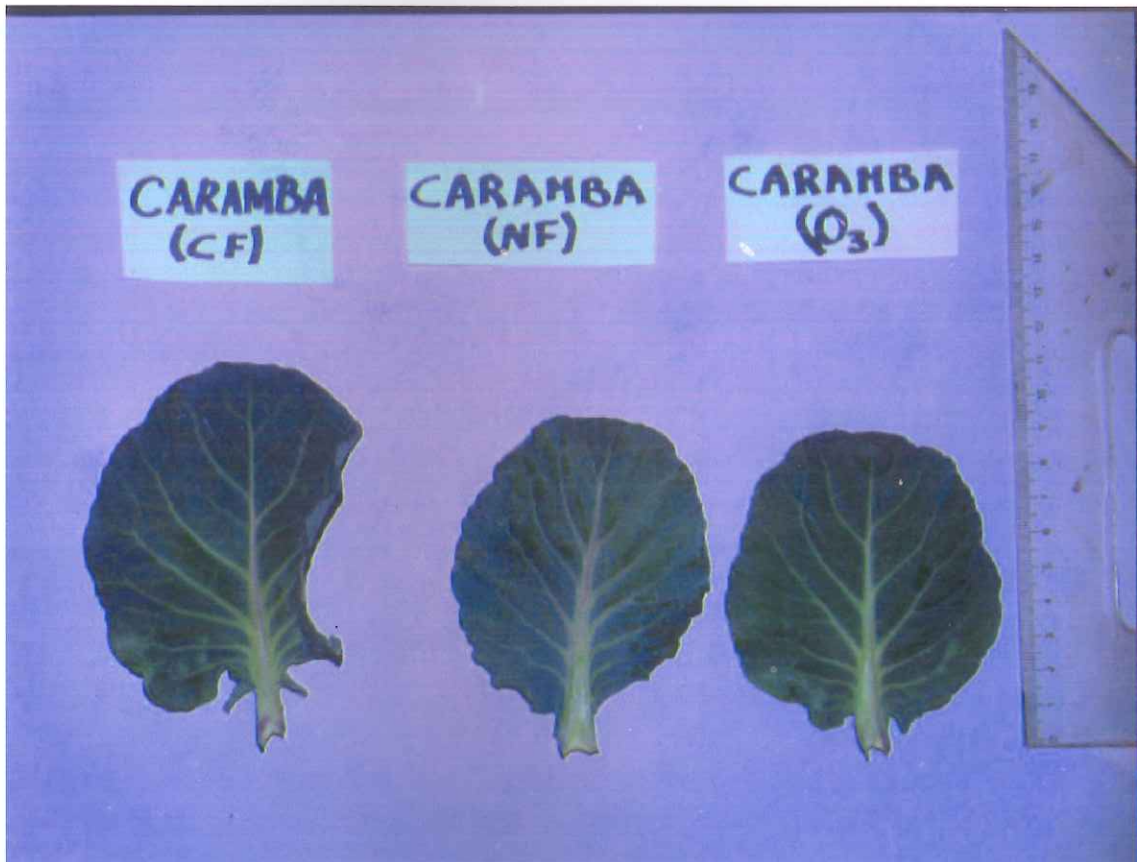


Foto 2. Hojas de col var. Caramba crecidas en cámara CF, NF y NF+O₃. Se observa en menor tamaño en la hoja NF pero sin síntomas.

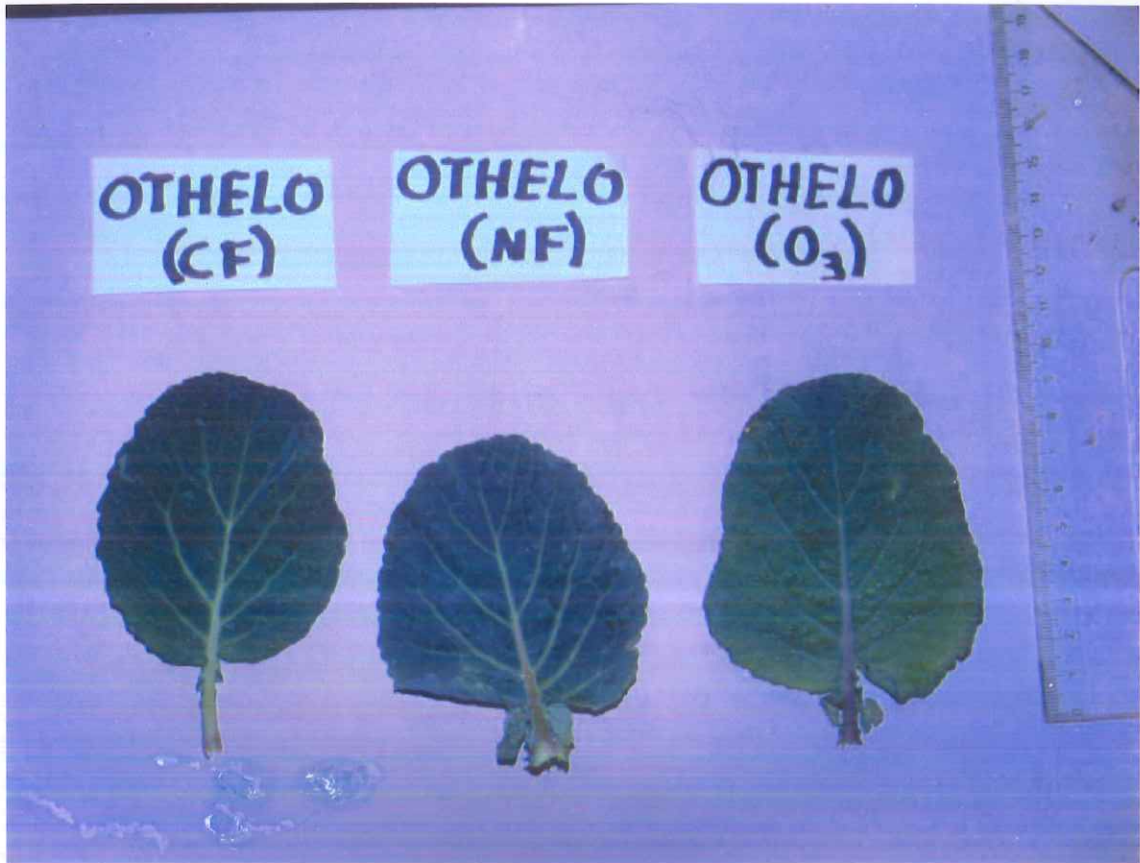


Foto 3. Hojas de col var. Othelo crecidas en cámara CF, NF y NF+O₃.

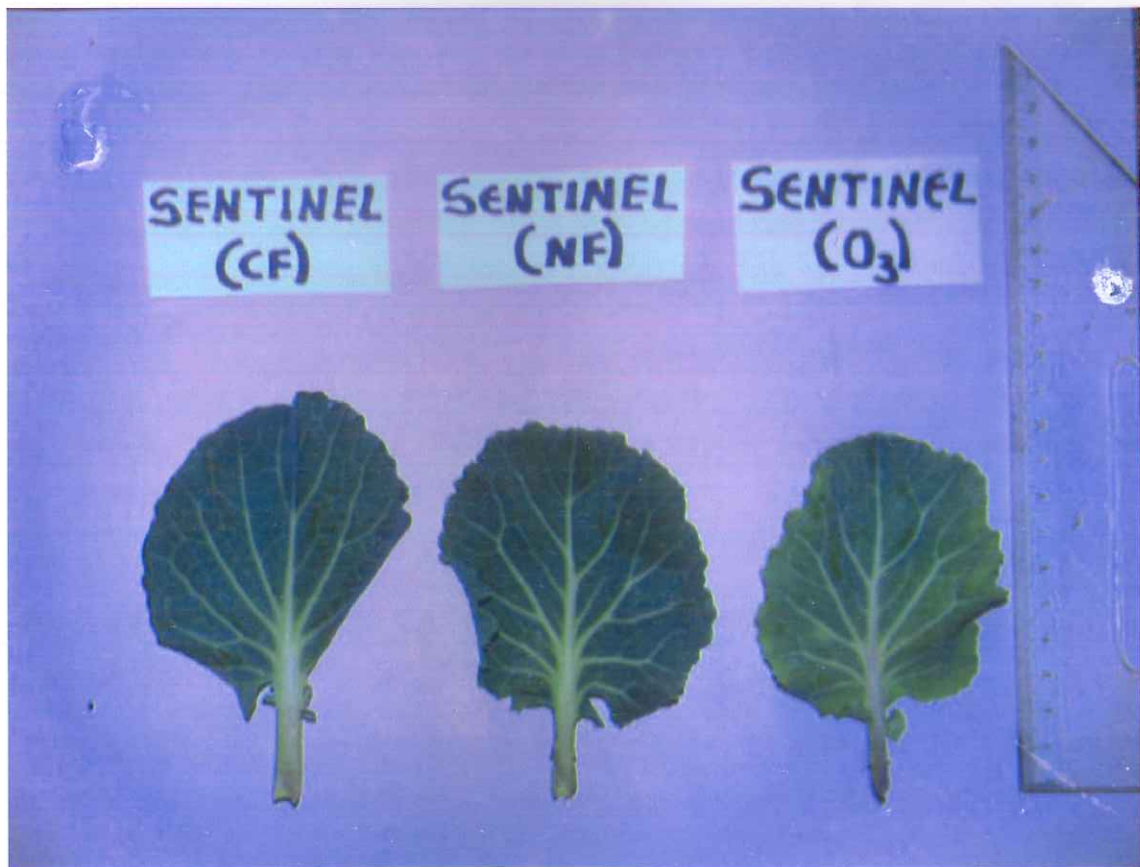


Foto 4. Hojas de col var. Sentinel crecidas en cámara CF, NF y NF+O₃.

10. CONCLUSIONES

10.1. En el cultivo de la Patata: cv. Obelix

El ozono ambiental induce alteraciones celulares medidas como:

- Disminución de los valores del flujo no-cíclico de electrones en el PSII (ϕ_{PSII}) y de los centros de reacción abiertos del PSII (q_P), y un aumento de los procesos de de-excitación por la emisión de calor (NPQ).
- El desarrollo del daño oxidativo fue reflejado por el aumento de los niveles en la peroxidación de lípidos y en la disminución del pool de AsA y de las actividades de las enzimas antioxidantes.

10.2. En el cultivo del Tomate: cv. Tiny Tim

Los efectos de la adición de benomilo en presencia de concentraciones del ozono ambiental en plantas de tomate Tiny Tim, indican que:

- Benomilo previene el daño inducido por ozono en plantas crecidas en cámaras NF-, obteniéndose para todas las medidas realizadas valores similares a los obtenidos en cámaras CF.
- En el tratamiento NF-, el incremento de NPQ redujo el rendimiento cuántico fotosintético del PSII, y la fracción de los centros abiertos del PSII (q_P) y aumento de los niveles de la peroxidación de lípidos.

10.3. En el cultivo de Lechuga: cv. Candele R7

Las altas concentraciones de ozono favorecen el incremento de las especies tóxicas de oxígeno que afectan la permeabilidad de

las membranas y los procesos dependientes de ella, desarrollándose:

- Un mayor estrés oxidativo en el aparato fotosintético que disminuye la fotosíntesis neta, la cual fue relacionada con la disminución del transporte no-cíclico de electrones fotosintéticos y una menor capacidad para desarrollar los procesos fotoprotectores del PSII (NPQ).
- Se observó un incremento del contenido de MDA y una disminución de AsA y de la actividad de la enzima antioxidante AP.

10.4. En el cultivo de Espinacas: cv. Avanti y Clermont

Los cambios inducidos por las altas concentraciones de ozono afectaron a la fotosíntesis neta, en las dos variedades en estudio por la:

- Modificación de los parámetros obtenidos en las medidas del intercambio gaseoso y de la fluorescencia modulada de la clorofila *a*.
- Se observó una ligera disminución del contenido de AsA y un aumento del contenido de MDA.

10.5. En el cultivo de la Sandía: cv. Reina de Corazones

Las mayores concentraciones de ozono y las altas dosis de nitrógeno (3X) afectaron el crecimiento y desarrollo de las plantas de sandía, afectando a la fotosíntesis por la:

- Disminución del rendimiento cuántico actual (ϕ_{PSII}), y de la fracción de los centros abiertos del PSII (q_P), y un aumento de la disipación de la energía no radiativa (NPQ).
- Mayor daño oxidativo reflejado por el aumento de la fotoinhibición y la peroxidación de lípidos, disminuyendo la producción.

10.6. En el cultivo de Lechuga cv.: Valladolid, Del Prat, Odra, y Maravilla Verde

Tanto las concentraciones del ozono invernal y las fumigaciones con ozono sobre las plántulas de lechuga por un periodo de 30 días limitan la actividad fotosintética en todas las variedades estudiadas por la:

- Disminución de la eficiencia cuántica del transporte no-cíclico de electrones y la capacidad de reoxidar la Q_A , y un aumento del desarrollo de la atenuación no-fotoquímica.
- Incremento de la peroxidación de lípidos y disminución del crecimiento de la longitud de las raíces.

10.7. En el cultivo de la Col cv.: Caramba, Sentinel y Othelo

Tanto el ozono ambiental como las fumigaciones con ozono por un periodo de 30 días sobre las plántulas de coles disminuyen la fotosíntesis:

- Por los resultados de los análisis de la fluorescencia modulada de la clorofila a , cuyos parámetros suministran evidencias del efecto del estrés oxidativo inducido por el ozono sobre el transporte de electrones fotosintético.
- Aumento de la peroxidación de lípidos de membrana y conductividad de solutos repercutiendo en mayor medida sobre las variedades Caramba y Sentinel, siendo menos sensible la variedad Othelo.

11. BIBLIOGRAFIA

Adams, M. B., Kelly, J. M., and Edwards, N. T. 1988. Growth of *Pinus taeda* L. seedlings varies with family and ozone exposure level. *Water, Air and Soil Pollution* 38: 137-150.

Adams, G. T., and Perkins, T. D. 1993. Assessing cold tolerance in *Picea* using chlorophyll fluorescence. *Environ. Exp. Bot.* 33: 377-382.

Agrawal., M. Nandi., P. K., and Rao, D. N. 1985. Responses of *Vicia faba* plants to ozone pollution. *Indian Journal of Environmental health* 27 (4): 318-329.

Alscher, R. G., Hess, J. L. 1993. Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, Fl.

Allen, R. D. 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 107: 1047-1054.

Amundson, R. G., Kohut, R. J., Schoettle, A. W., Raba, R. M., and Reich, P. B. 1987. Correlative reductions in whole plant photosynthesis and yield of winter wheat caused by ozone. *Phytopathology* 77: 75-79.

Anderson, J. W., Foyer, C. H., Walker, D. A. 1983a. Light-dependent reduction of dehydroascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplast. *Planta* 158: 442-450.

Anderson, J. W., Foyer, C. H., Walker, D. A. 1983b. Light-dependent reduction of hydrogen peroxide by intact spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 724: 69-74.

Anderson, J. M., Chow, W. S. and Öquist, G. 1993. Dynamic of photosystem II: Photoinhibition as a protective acclimation strategy. In photosynthetic responses to the environment, H. Y. Yamamoto and C. M. Smiths, eds. *American Society of Plant Physiologists*.

Anderson, J. M., Park, Y Il., Chow, W. S. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum* 100: 214-223.

Aono, M., Saji, H., Fujiyama, K., Sugita, M., Kondo, N., Tanaka, K. 1995. Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana Tabacum*. *Plant Physiol.* 107: 645-48.

Arrigoni, O. 1994. Ascorbate sistem in plant development. *J. Bioener. Biomem.* 26: 407-419.

Aro, E. M., McCafferi, S., and Anderson, J. M. 1993a. Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.* 103: 835-843.

Aro, E. M., Virgin, I. Andersson, B. 1993. Photoinhibition of photosystem II: Inactivation, protein damage and turnover. *Bioch. Biophys Acta* 1143: 113-134.

Asada, K., Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle D.J., Osmond, C.B., Arntzen, C.J. (Eds), *Photoinhibition: Topics in photosynthesis, IX.* Elsevier, Amsterdam pp. 227-287.

Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235-241.

Asada, k. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In "Cause of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants". (Eds. C. H. Foyer and P. M. Mullineaux). CRC Press, Boca Raton, London, pp. 77-104. ISBN0-84935-443-9.

Asada, K. 1997. The role of ascorbate peroxidase and monodehydroascorbate reductase en H_2O_2 scavenging in plants. In: Scandalios, J.G. (Ed.). *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidants defenses.* Plainview, New York, Cold Spring Harbor Lab. pp. 715-735.

Ashmore, M. R., Bell, J. N. B., and Reile, C.L. 1978. A survey of ozone levels in the british Isles using indicator plants. *Nature UK* 276 (5690): 813-815.

Backer, N. R., and Horton, P. 1987. Chlorophyll fluorescence quenching during photoinhibition. In *topics in Photosynthesis* (D. J.

Kyle, C. B. Osmond and C. J. Arntzen, eds). Vol. 9, pp 145-168. Elsevier, Amsterdam. ISBN 0-444-80890-6.

Baker, N. R., Nie, G. Y., Tomasevic, M. 1994. Responses of photosynthetic light-use efficiency and chloroplast development on exposure of leaves to ozone. In: Alscher, R.G., Wellburn, A.R. (eds.): Plant Responses to the Gaseous Environment. Chapman and Hall, London, pp. 219-238. ISBN 0-412-58170-1.

Balachandran, S., Hurry, V. M., Kelley, S. E., Osmond, C.B., Robinson, S. A., Rohozinsky, J., Seaton, G. G. R., and Sims, D.A. 1997. Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 100: 203-213.

Balaguer, E. 1999. Predicción a corto plazo de las concentraciones de ozono troposférico en la zona de Carcaixent (Valencia) utilizando modelos ARMA. Universitat de Valencia. Facultat de Físiques. Trabajo de Investigación del Programa de Doctorado "Contaminación ambiental" (734-20F).

Bannister, J. V., Bannister, W. H., Rotilio, G. 1987. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC. Crit. Rev. Biochem.* 22: 111-180.

Barnes, R. 1972. Effects of chronic exposure to ozone on soluble sugar and ascorbic acid contents of pine seedlings. *Can. J. Bot.* 50: 215-219.

Barnes, J. D., Pfirmann, T. 1992. The influence of CO₂ and O₃, singly and in combination, on gas exchange, growth and nutrient status of radish (*Raphanus sativus* L.). *New Phytol* 121: 403-412.

Batini, P., Ederli, L., Pasqualini, S., Antonielli, M., and Valenti, V. 1995. Effects of ethylenediurea and ozone in detoxificant ascorbic-ascorbate peroxidase system in tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 33: 717-723.

Beck, E., Burkert, A., Hofmann, M. 1983. Uptake of L-ascorbate by intact chloroplasts. *Plant Physiol.* 73: 41-45.

Becker, K., Saurer, M., Egger, A., and Fuhrer, J. 1989. Sensitivity of white clover to ambient ozone in Switzerland. *New Phytol* 112: 235-243.

Beckerson, D. W., Hofstra, G., 1980. Effects of sulphur dioxide and ozone single or in combination on membrane permeability. *Can. J. Bot.* 58: 451-457.

Bennett, J. P., and Oshima, R. J. 1976. Carrot injury and yield response to ozone. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101 (6): 638-639.

Bennett, J. P., and Runeckles, V. C. 1977 a. Effects of low levels of ozone on growth of crimson clover and annual ryegrass. *Crop Sci.* 17: 443-445.

Bennett, J. P., Oshima, R. J., and Lippert, L. F. 1979. Effects of ozone in injury and dry matter partitioning in pepper plants. *Environ. Exp. Bot.* 19: 33-39.

Beyer, W. F., Fridovich, I. 1987. Assaying of superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry.* 161: 559-566.

Bilger, W., Björkman, O. 1991. Temperature dependence of violaxanthin deepoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Hedera canariensis* and *Malva parviflora* L. *Planta* 184: 226-234.

Bilger, W., Schreiber, U., and Bock, M. 1995. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia* 102: 425-432.

Björkman, O., Powles, S. B. 1984. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta* 161: 490-504.

Björkman, O., Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristic at 77K among vascular Plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.

Björkman, O., and Demmig-Adams, B. 1995. Regulation of photosynthetic light energy capture, conversion, and dissipation in

leaves of higher plants. en: E. D. Schulze. & M. M. Caldwell (Eds.). *Ecophysiology of Photosynthesis*, pp. 17-47. Berlin: Springer-Verlag.

Blum, U. and Heck, W. W. 1980. Effects of acute ozone exposures on snap bean at various stages of its life cycle. *Environ. Exp. Bot.* **20**: 73-85.

Bolhár-Nordenkamp, H. R., and Lechner, E. 1988. Winter stress and chlorophyll fluorescence in Norway spruce. En: H.K. Lichtenthaler (Ed.). *Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing*, pp. 173-180. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Bolhár-Nordenkamp, H. R., and Lechner, E. G. 1988a. Temperature and light dependent modifications of chlorophyll fluorescence kinetics in spruce needles during winter. *Photosynth. Res.* **18**: 287-298.

Bolhár-Nordenkamp, H. R., and Lechner, E. G. 1988b. Winter stress and chlorophyll fluorescence in Norway spruce (*Pycea abies* L., Karst.). In Lichtenthaler, H. K. (ed.). *Applications of Chlorophyll Fluorescence*, pp. 173-180. Kluwer Academic. Ordrecht. ISBN 90-247-3787-7.

Bowler, C., Montagu, M., Van Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular* **43**: 83-116.

Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D. 1994. Superoxide dismutase in plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **13**: 199-218.

Bratt, C. E., Arvidson, P. O., Carlsson, M., Akerlund, H. E. 1995. Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* **45**: 169-75.

Brewer, R. F., Miller, C. J. and Olson. R. E. 1961. Influence of N-P-K fertilization on incidence and severity of oxidant injury to mangels and spinach. *Soli Sci.* **92**: 298-301.

Briantais, J. M. 1994. Light harvesting chl a-b complex requirement for regulation of PSII photochemistry by NPQ. *Photosynthesis Research* 40: 287-294.

Brunschon-Harti, S., Fangmeier, A. Jager, H. P. 1995. Effects of ethylenediurea and ozone on the oxidative systems in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Environmental pollution* 90: 95-103.

Burkey, K. O., Wei, C., Eason, G., Ghosh, P., and Fenner, G. P. 2000. Antioxidant metabolite levels in ozone-sensitive and tolerant genotypes of snap bean. *Physiologia Plantarum* 110: 195-200.

Cakmak, I., and Marschner, H. 1992. Magnesium deficiency and high-light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol* 98: 1222-1227.

Calatayud, A., Deltoro, V.I., Abadía, A. J., Barreno, E. 1999. Effects of ascorbate feeding on chlorophyll fluorescence and xanthophyll cycle components in lichens *Parmelia quercina* (Willd.) Vainio exposed to atmospheric pollutants. *Physiol. Plant.* 105: 679-684.

Calatayud, A., Deltoro, V. A., Alexandre, E., Barreno, E. 2000. Acclimation potential to high irradiance of two cultivars of watermelon. *Biol. Plant.* 43: 387-391.

Calatayud, A., Barreno, E. 2000. Foliar spraying with zineb increases fruit productivity and alleviate oxidative stress in two tomato cultivars. *Photosynthetica* 38: 149-154.

Calatayud, A., Alvarado, J. W., and Barreno, E. 2001. Changes in chlorophyll a fluorescence, lipid peroxidation, and detoxificant system in potato plants grown under filtered and non-filtered air in open-top chambers. *Photosyntética* (in press).

Carnahan, J. E., Jenner, E. L., Wat, E. K. W. 1978. Prevention of ozone injury to plants by a new protectant chemical. *Phytopatology* 68: 1225-1229.

Castillo, F. J., Penel, C. L., and Greppin, H. 1984. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album*: involvement of Ca²⁺. *Plant Physiol.* 74: 846-851.

Castillo, F. J., and Greppin, H. 1986. Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Physiol. Plant* **68**: 201-208.

Castillo, F. J., Miller, P. R., and Greppin, H. 1987. Extracellular biochemical markers of oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia* **43**: 111-115.

Castillo, F. J., and Greppin, H. 1988. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* leaves after ozone exposure. *Environ. Exp. Bot.* **28**: 232-238.

Chameides, W. L. 1989. The chemistry of ozone deposition to plant leaves: the role of ascorbic acid. *Environ. Sci. Technol.* **23**: 595-600.

Chameides, W. L., Kasibhata, P. J., Yienger, J., Levy, H. 1994. Growth of continental-scale metro-agro-plexes, regional ozone pollution, and world food production. *Science* **264**: 74-77.

Chamnongpol, S., Willekwns, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. 1996. Transgenic tobacco with a reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant. J.* **10**: 491-503.

Chang, C. W., and Heggstad, H. E. 1974: Effects of ozone on photosystem II in *Spinacia oleracea* chloroplasts. *Phytochemistry* **13**: 871-873.

Chappelka, A. H., and Chevone, B. I. 1986. White ash seedling growth response to ozone and simulated acid rain. *Can. J. For. Res.* **16**: 786-790.

Chapin, F. S., III, Shaver, G. R. and Kedrowski, R. A. 1986. Environmental controls over carbon, nitrogen and phosphorus fractions in *Eriophorum vaginatum* in Alaskan tussock tundra. *Journal of Ecology* **74**: 167-195.

Chimiklis, P. E., and heath, R. L. 1975. Ozone-induced loss of intracellular ion from *Chlorella sorokiniana*. *Plant physiol.* **56**: 723-727.

Ciampi, S., Castagna, A., Ranieri, A., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G.F. 1997. CO₂ assimilation, xanthophyll cycle pigments and PSII efficiency in pumpkin plants as affected by ozone fumigation. *Physiologia Plantarum* 101: 881-889.

Cleland, R. E., Melis, A., Neale, P. J. 1986. Mechanism of photoinhibition: Photochemical reaction center inactivation in photosystem II chloroplast. *Photosynthesis Research* 9: 79-88.

Conklin, P. L., Williams, E. H., Last, R. L. 1996. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 9970-9974.

Conklin, P. L., Pallanca, J., Last, R. L., Smirnoff, N. 1997. L-ascorbic acid metabolism in the ascorbate deficient *Arabidopsis* mutant *vtcl*. *Plant Physiol.* 115. 1277-85.

Cooley, D. R., and Manning, W. F. 1987. The impact of ozone on assimilate partitioning in plants: a review. *Environmental Pollution* 47: 95-113.

Córdova-Pedregosa, M. C., González-Reyes, J. A., Cañadillas, M. S., Navas, P., and Córdova, F. 1996. Role of apoplastic and cell wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. *Plant Physiol.* 112: 1119-1125.

Coulson, C., and Heath, R. L. 1974. Inhibition of the photosynthetic capacity isolated chloroplasts by ozone. *Plant Physiol.* 53: 32-38.

Creissen, G. P., Edwards, E. A., Mullineaux, P. M. 1994. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. In: Foyer, C.H., Mullineaux, P.M (Eds.), Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. *CRC Press, Boca Raton, FL*. Pp. 343-364.

Critchley, C. 1988. The molecular mechanism of photoinhibition. Facts and fiction. *Aust. J. Plant Physiol.* 15: 27-41.

Curtis, C. R., and Howell, R. K. 1971. Increase in peroxidase isoenzyme activity in bean leaves exposed to low doses of ozone. *Phytopathology*, 61, 1306-1307.

Dangl, J. L., Dietrich, R. A., and Volchberg, M. S. 1996. Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.

Dann, M. S., and Pell, E. J. 1989. Decline in activity and quantity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and net photosynthesis in ozone-treated foliage. *Plant Physiology* 91: 427-432.

Darral, N. M. 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant Cell Environ.* 12: 1-30.

Decleire, M., DeCat, W., deTemmerman, L., and Baeten, H. 1984. Changes of peroxidase, catalase, and superoxide dismutase activities in ozone-fumigated spinach leaves. *J. Plant. Physiol.* 116: 147-152.

De Gara, L., Paciolla, C., De Tullio, M. C., Motto, M., and Arrigoni, O. 2000. Ascorbate-dependent hydrogen peroxide detoxification and ascorbate regeneration during germination of a highly productive maize hybrid: Evidence of a improved detoxification mechanism against reactive. *Physiologia Plantarum* 109: 7-10.

De Vos, N. E., Pell, E. J., Cole, R. H., Hill, Jr. R. R., 1983. Laboratory versus field response of potato genotypes to oxidant stress. *Plant Dis.* 67: 173-176.

DeEll, J., Toivonen, P. 1999. Chlorophyll fluorescence as a indicator of physiological changes in cold-stored broccoli after transfer to room temperature. *J. Food Sci.* 64: 501-503.

Deltoro, V.I., Gimeno, C., Calatayud, A., Barreno, E., 1999. Effects of SO₂ fumigations on photosynthetic CO₂ gas exchange, chlorophyll fluorescence emission and antioxidant enzymes in the lichens *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea*. *Physiologia Plantarum* 105: 648-654.

Demmig, B., Winter, G., Krüger, A., and Czygan, F. C. 1987. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol.* 84: 218-224.

Demmig-Adams, B., Adams, W. K., Krüger, A., Czygan, F. C. 1988. Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium olander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.* 87: 17-24.

Demmig-Adams, B. and Adams, W. W. III. 1992. Carotenoid composition in sun and shade leaves of plant with different life forms. *Plant Cell Environ.* 15: 411-420.

Demmig-Adams, B. and Adams, W. W. III. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high stress. *Annu. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.

Demmig-Adams, B. and Adams, W. W. III. 1993. The xanthophyll cycle, protein turnover, and the high light tolerance of sun-acclimated leaves. *Plant Physiology* 103: 1413-1420.

Demmig-Adams, B., Adams, III W.W., Logan, B.A., Verhoeven, A.S., 1995. Xanthophyll cycle-dependent energy dissipation and flexible PSII efficiency in plants acclimated to light stress. *Aus. J. Plant Physiol.* 22: 249-261.

Demmig-Adams, B., Adams, III W.W., Barker, D. H., Logan, B.A., Bowling, D. R., Verhoeven, A. S. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.* 98: 253-264.

Demmig-Adams, B. 1998. Survey of thermal energy dissipation and pigment composition in sun and shade leaves. *Plant Cell Physiology* 39: 474-482.

Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., Thorpe, T. A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Bot.* 32: 93-101.

Dijak, M., Ormrod, P. P. 1982. Some physiological and anatomical characteristics associated with differential ozone sensitivity among pea cultivars. *Env. Exp. Bot.* 22: 395-402.

Dominy, P. J., and Heath, R. L. 1985. Inhibition of the K⁺ stimulates ATPase of the plasmalemma of pinto bean leaves by ozone. *Plant Physiol.* 77: 43-45.

Dorillard, M. J., Paulin, A., Massot, J. C. 1987. Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals and carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiologia Plantarum* 71: 197-202.

Düring, P. 1998. Photochemical and non-photochemical responses of glasshouse-grown grape to combined light and water stress. *Vitis*. 37: 1-4.

Eastman, P. A. K., and Camm, E. L. 1995. Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: Changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence. *Tree Physiology* 15: 229-235.

Eckert, H. J., Geiken, B., Bernarding, J., Napiwotzki, A., Eichler, H. J., Renger, G., G. 1991. Two sites of photoinhibition of the electron transfer in oxygen evolving and Tris-treated PS II membrane fragments from spinach. *Photosynth. Res.* 27: 97-108.

Ederli, E., Pasqualini, S., Batini, P. and Antonielli, M. 1997. Photoinhibition and oxidative stress: Effects of xanthophyll cycle, scavenger enzymes and abscisic acid content in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology* 151: 422-428.

Edwards, E. A., Rawsthorne, S., Mullineaux, P. M. 1990. Sub-cellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* 180: 278-284.

Elstner, E. F., Osswald, W., Youngman, R. J. 1985. Basic mechanism of pigment bleaching and loss of structural resistance in spruce (*Picea abies*) Needles advances in phytomedical diagnostics. *Experientia* 41: 591-597.

Elstner, E. F., Wagner, G.A., Schutz, W. 1988. Activated oxygen plants in relation to stress situations. In: Randall, D.D., Blevins, D.G., Campbell, W.H. (eds.), Columbia Press, University of Missouri. *Current Topics Plant Biochemistry and Physiology* 7: 159-187.

Farage, P. K., Long, S. P., Lechner, E. G., Baker, N. R., 1991. The sequence of change within the photosynthetic apparatus of wheat following short-term exposure to ozone. *Plant Physiol.* **95**: 529-535.

Farage, P. K. and Long, S. P. 1999. The effects of O₃ fumigation during leaf development on photosynthesis of wheat and pea: An in vivo analysis. *Photosynth. Res.* **59**: 1-7.

Feder, W. A., and Campbell, F. J. 1968. "Influence of low levels of ozone flowering of carnations". *Phytopathology* **58** (7): 1038-1039.

Ferrar, P. J., Osmond, C. B. 1986. Nitrogen supply as a factor influencing photoinhibition and photosynthetic acclimation after transfer of shade-grown *Solanum dulcamara* to bright light, *Planta* **168**: 563-570.

Figuerola, M. E., Fernández-Baco, L., Luque, T., Davy, A. J. 1997. Chlorophyll fluorescence, stress and survival in populations of Mediterranean grassland species. *J. Vegest. Sci.* **8**: 881-888.

Finckh, B. F., and Kunert, K. J. 1985. Vitamins C y E: an antioxidative system against herbicide-induced lipid peroxidation in higher plants. *J. Agric. Food Chem.* **33**: 574-577.

Fork, D. C., Satoh, K. 1986. The control by state transitions of the distribution of excitation energy in photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 351-361.

Forti, G., Ehrenheim, A. M. 1993. The role of ascorbic acid in photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta* **1183**: 408-412.

Foyer, C. H. and Halliwell, B. 1976. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**: 21-25.

Foyer, C. H., Furbank, R., Harbinson, J., Horton, P. 1990. The mechanisms contributing to photosynthetic electron transport by carbon assimilation in leaves. *Photosynthesis Research* **25**: 83-100.

Foyer, C. H., Lelandais, M., Galap, C., Kunert, K. J. 1991. Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular

glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.* **97**: 863-872.

Foyer, C. H. 1992a. ascorbic acid. In R. G. Alscher, J. L. Hess, in higher plants, CRC Press Inc. In press.

Foyer, C. H., and Lelandais, M. 1993. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. *Photosynthetic Responses to the environment* (HY Yamamoto & CM Smith eds). American Society of plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA.

Foyer, C. H. 1993. In antioxidants in higher plants (Alscher, R. G., and Hess, J. L., Eds.), pp 31-58, CRC Press, Boca Raton, FL.

Foyer, C. H., Mullineaux, P. M. 1994. Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. (C. H. Foyer and P. M. Mullineaux ed). *CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida*.

Foyer, C. H., Noctor, G., Lelandais, M., Lescure, J. C., Boutin, J. P., Horton, P. 1994a. Short-term effects of nitrate, nitrite and ammonium assimilation on chlorophyll *a* fluorescence, thylakoid protein phosphorylation, CO₂ assimilation and amino acid biosynthesis in maize. *Planta* **192**: 171-178.

Foyer, C. H., Lescure, J. C., Lefebvre, C., Morot-Gaudry, J. F., Vicentz, M., Vaucheret, H. 1994b. Adaptations of photosynthetic electron transport, carbon assimilation and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to changes in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* **104**: 171-178.

Foyer, C. H., Lelandais, M., Kunert, K. J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* **92**: 696-717.

Foyer, C. H., Sourian, N., Perret, S., Lelandais, M., Kunert, K. J., Provust, C., Jouanin, L. 1995. Overexpression of glutathion reductase but not glutathion synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiol.* **109**: 1047-1057.

Foyer, C.H. and Lelandais, M. 1996. A comparison of the relative rates of transport of ascorbate and glucose across the thylakoid, chloroplast and plasmalemma membranes of pea leaf mesophyll cells. *Journal of Plant Physiology* **97**: 863-872.

Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., and scott, I. M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.

Foyer, C.H. 1997. Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis. In: Scandalios, J. G. (ed) *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, pp 587-621. ISBN0-87969-502-1.

Fridovich, I. 1986. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-11.

Fuhrer, J., Grandjean Grimm, A., Ischannen, W., and Shariat-Madari, H. 1992. The response of spring wheath (*Triticum aestivum* L.) to ozone at higher elevations. II. Changes in yield, yield components and grain quality in response to ozone flux. *New Phytol* 121: 211-219.

Gamon, J. A., Pearcy, R. W. 1989. Leaf movement stress avoidance and Photosynthesis in *Vitis californica*. *Oecologia* 79: 475-181.

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

Gillham, D. J., Dodge, A. D. 1987. Chloroplast superoxide and hydrogen peroxide scavenging systems from pea leaves: Seasonal changes. *Planta Sci.* 50: 105-109.

Gilmore, A. M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiologia Plantarum* 99: 197-209.

Gimeno, B. S., Salleras, J. M., Bermejo, V., Ochoa, M. J. Y Tarruel, A. 1989. Efectos del ozono sobre plantas de sandía en el Delta del Ebro. 1: Sintomatología (II). *Phytoma España* 12: 18-28.

Gimeno, B. S., Bermejo, V., Reinert, R. A., Zheng, y., Barnes, J. D., 1999. Adverse effects of ambient ozone on watermelon yield and physiology at rural site in eastern Spain. *New Phytol.* **144**: 245-260.

Govindjee, Van de Ven, M., Cao, J., Royer, C., Gratton, E. 1993. Multifrequency cross-correlation phase fluorometry of chlorophyll *a* fluorescence in thylakoid and PSII-enriched membranes. *Photochem. Photobiol.* **58**: 438-445.

Gray, G. R., Boese S. R., and Huner, N. P. A. 1994. A comparison of low temperature growth vs low temperature shifts to induce resistence to photoinhibition in spinach (*Spinacea oleracea*). *Physiol. Plant.* **90**: 560-566.

Gray, G. R., Savitch, L. V., Ivanov, A. G., Huner, N. P. A. 1996. Photosystem II excitation pressure and devolpment of resistance to photoinhibition, II. Adjustment of photosynthetic capacity in winter wheat and winter rye. *Plant Physiology* **110**: 61-71.

Greenberg, J. T., Dempe, B. 1986. Glutathione in *Escherichia coli* is dispensable for resistance to H₂O₂ and gamma radiation. *Journal of Bacteriology* **168**: 1026-9-

Greer, D. H., Berry, J. A., Björkman, O. 1986. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light and temperature, and requeriment for chloroplast-protein synthesis during recovery. *Planta* **168**: 253-260.

Grill, D., and Esterbauer, H. 1973. Cystein and Glutathion in gesunden and SO₂-geschädigten Fichtennadeln. *European Journal of Forest Phatology* **3**: 65-71.

Grill, D., Esterbauer, H., and Hellig, K. 1982. Further studies on the effects of SO₂-pollution on the sulphhydril-systems of plants. *Phytopathologische Zeitschrift* **104**: 264-271.

Grill, E., Winnacker, E. L., Zenk, M. H. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **84**: 439-43.

Grill, E., Loffler, S. Winncker, E. L., Zenk M. H. 1989. Phytochelatins, the heavy metal binding peptides of plants, are

synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6838-42.

Groden, D., Beck, E. 1979. H_2O_2 destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplast. *Biochem. Biophys. Acta.* 546: 426-435.

Guidi, L., Panicucci, A., Lorenzini, G., Soldatini, G. F. 1993. Ozone induced changes in chlorophyll fluorescence Kinetics and CO_2 assimilation in *Vicia faba*. *Journal Of Plant Physiology* 141: 545-550.

Guidi, L., Nali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G., Soldatini, G.F. 1997. The use of chlorophyll fluorescence and leaf gas exchange as methods for studying the different responses to ozone of two bean cultivars. *Journal of Experimental Botany.* 48: 173-179.

Guidi, L., Bongi, G., Ciompi, S., Soldatini, G.F., 1999. In *Vicia faba* leaves photoinhibition from ozone fumigation in light precedes a decrease in quantum yield of functional PSII centres. *J. Plant Physiol.* 154: 167-172.

Guidi, L., Tonini, M., Soldatini, F. G. 2000. Effects of high light and ozone fumigation on photosynthesis in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 717-725.

Guri, A. 1983. Variation in glutathione and ascorbic acid content among selected cultivars of *Phaseolus vulgaris* prior to and after exposure to ozone. *Can. J. Plant Sci.* 63: 733-737.

Gutteridge, J. M. C., and Halliwell, B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* 15: 129-135.

Guzy, M. R., and Heath, R. L. 1993. Responses to ozone of varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytol* 124: 617-625.

Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H., Brent, R. 1993. Cdk2, a human G1 and S phase protein phosphate that associates with Cdk2. *Cell* 75: 791-803.

Hager, A. 1969. Lichtbedingte pH-Erniedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin/Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung. *Planta* 89: 224-243.

Haitz, M., and Lichtenthaler, H. K. 1988. The measurement of R_{fd} values as plant vitality indices with the portable field chlorophyll fluorometer and the PAM-fluorometer. In Lichtenthaler, H. K. (ed.). Applications of Chlorophyll Fluorescence, pp. 249-254. Kluwer Academic, Dordrecht. ISBN 90-247-3787-7.

Halliwell, B. 1982. Ascorbic acid and the illuminated chloroplast. *Am. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser.* 200: 263-274.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1985. Free radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell, B. 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplast. *Chem. Phys. Lipids* 44: 327-340.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. 1989. Free radicals in biology and medicine, 2nd Ed., Oxford University Press, Oxford.

Hausladen, A., Madamanch, N. R., Fellows, S., Alscher, R. G., Amundson, R. G. 1990. Seasonal changes in antioxidants in red spruce as affected by ozone. *New Phytol* 115: 447-58.

Hausladen, D. J., Alscher, R. G. 1994a. Purification and characterization of glutathion reductase isozymes specific for the state of cold hardiness of red spruce. *Plant Physiol.* 105: 207-213.

Havaux, M., Ernez, M. and Lannoye, R. 1988. Tolerance of poplar (*Populus sp.*) to environmental stress. I. Comparative study of poplar clones using the in vivo chlorophyll fluorescence method. *Acta (Ecologica/Ecologia Plantarum)* 9: 161-172.

Heagle, A. S., Body, D. E., Heck, W. W., 1973. An open-top chamber to assess the impact of air pollution on plants. *J. Environ. Quality.* 2: 365-368.

Heath R. L., and Parker, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archiv. Biochem. Biophys.* **125**: 189-198.

Heath, R. L. 1979. Breakdown of ozone and formation of hydrogen peroxide in aqueous solutions of amine buffers exposed to ozone. *Toxic Lett* **22**: 25-37.

Heath, R. L. 1980. Initial events in injury to plants by air pollutants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 395-431.

Heath. R. L. 1987a. The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Rec. Adv. Phytochem.* **21**: 29-54.

Heath, R. L. 1988. Biochemical mechanism of pollutant stress. Assessment of crop loss from air pollutants (eds., Heck, W. W., Taylor, O. C., Tingey, D. T.). *Elsevier Applied*, NY 259-286.

Heath, R. L. 1994. Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynth. Res.* **39**: 439-451.

Heath, R. L., and Taylor, G. E. 1997. Physiological processes and plant responses to ozone exposure in: Sandermanm, H., Wellburn, A. S., Hath, R. L. (Eds). *Ozone and forest decline: A comparison of controlled chamber and field experiments*, Ecol. Studies. Springer Verlag, Berlin **127**: 317-368.

Heck, W. W., Adams, R. M., Cure, W. W., Heagle, A. S., Heggstad, H. E., Kohut, R. J., Kress, L. W., Rawlings, J. O., and Taylor, O. C. 1983. A reassessment of crop losses from ozone. *Environmental Science Technology* **17**: 573A-618A.

Heck, W. W., Taylor, O. C., Tingey, D. T. 1988. Assessment of Crop Loss from Air Pollution. *Elsevier Applied science*, London (ed.).

Herrero-Martinez, J. M., Simó, E., Deltoro, V.I., Calatayud, A., Barreno, E., Ramis, G. 2000. Simultaneous determination of L-ascorbic acid, glutathion and their oxidized forms in ozone-exposed vascular plants by capillar zone electrophoresis. *Environ. Sci. Thecno.* **34**:1331-1336.

Hewitt, G. N., Kok, G. L., Fall, R. 1990. Hydroperoxides in plants exposed to ozone mediate air pollution damage to alkene emitters. *Nature* 344: 56-58.

Hill, A. C., Littlefield, N. 1969. Ozone. Effect on apparent photosynthesis rate of transpiration and stomatal closure in plants. *Environmental Science Technology*. 3: 52-55.

Hippeli, S., and Elstner, E. F. 1996. Mechanism of oxygen activation during plant stress: biochemical effects of air pollutants. *Journal Of Plant Physiology* 148: 249-257.

Hogsett, W. E., Tingey, D. T., and Holman, S. R. 1985. A programmable exposure control system for determination of the affect of pollutant exposure regimes on plant growth. *Atmos. Environ.* 19: 1135-1145.

Horton, P., Ruban, A. V., Rees, D., Pascal, A., Noctor, G., Young, A. J. 1991. Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHCII chlorophyll-protein complex. *FEBS Letters* 292: 1-4.

Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R. G. 1994. Regulation of light harvesting in green plants. Indication by non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 106: 415-420.

Horton, P., Ruban, A. V., and Walters, R. G. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.

Hossain, M., Asada, K. 1985. Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dicleotide enzyme. *J. Biol. Chem.* 260: 12920-26.

Ilik, P., Naus, J., Cikánek, D., and Novotny, R. 1995. Chlorophyll fluorescence changes at high temperatures induced by linear heating of greening barley leaves. *Photosynthesis Research* 44. 271-275.

Jhonsson, B., and Dahlkvist, A. 1980. Spinach damaged by ozone. *Växtskyddsntiser* 44: 44-48. *Review Of Plant Pathology. Abstract* 96: 429-441.

Kangasjärvi, J., Talvine, J., Utriainen, M., and Karjalainen, R. 1994. Plant defense system induced by ozone. *Plant Cell Environ.* 17: 783-794.

Kärenlampi, L., and Skärby, L. 1996. Critical levels for ozono in Europe: Testing and finalizing the concepts. UN-ECE Workshop Report. University of Knopio, Knopio. ISBN951-780-653-1.

Kasana, M. S- 1991. Sensibility of three legume crops to O₃ as influenced by different stages of growth and development. *Environ. Pollut.* 69: 131-149.

Kendrich, J. B. Jr., Darley, E. F., Middleton, J. T., 1962. Chemotherapy for oxidant and ozone induced plant damage. *Journal Air Water Pollution.* 6: 391-402.

Kenyon, W. H., and Duke, S. O. 1985. Effects of acifluefen on endogenous antioxidants and protective enzyme in cucumber (*Cucumis sativus L.*) cotyledons. *Plant Physiol.* 79: 862-866.

Knox, J. P., and Dodge., A. D. 1985. Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24: 889-896.

Kok, B. 1956. On the inhibition of phothosynthesis by intense light. *Biochem. Biophys. Acta* 16: 234-244.

Koch, J. R., Scherzer, A. J., Eshita, S. M., Davis, K. R. 1998. Ozone sensitivity in hybrid poplar is correlated with alack of defense-gene activation. *Plant Physiology* 118: 1243-1252.

Krause, G. H., 1988. Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanism. *Physiologia Plantarum.* 74: 566-574.

Krause, G. H., and Weiss, E. 1988. The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence. An introduction. En: H. K. Lichtenthaler (Ed.). Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing, pp. 3-12. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Krause, G. H., and Weiss, E. 1991. Chlorophyll fluorecence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 42: 313-349.

Krause, G. H. 1994. Photoinhibition induced by low temperatures. In: Baker, N.R., Bowyer, J.R. (ed.): *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanism to the Field.* Bios Scientific Publishers, Oxford. Pp. 331-348.

Krupa, S., and Kickert, R. N. 1987. An analysis of numerical models of air pollutant exposure and vegetation response. *Environ. Pollut.* 44: 127-158.

Krupa, S., Grünhage, L., Jäger, H. J., Nosal, M., Manning, Q. J., Legge, A. H., Hanewald, K. 1995. Ambient ozone and adverse crops response: a unified view of cause and effect. *Environmental Pollution* 87: 119-126.

Kunert, K. J., and Ederer, M. 1985. Leaf aging and lipid peroxidation: the role of the oxidants vitamins C and E. *Physiol. Plant.* 65: 85-88.

Kunert, K. J., Homrighausen, C, Böhme, H., and Böger, P. 1985. Oxyfluorfen and lipid peroxidation: protein damage as a phytotoxic consequence. *Weed Sci.* 33:766-770.

Kunert, K. J., and Foyer, C. 1993. Thiol/disulfide exchange in plants. In: DeKok, L. J., Stulen, I., Rennenberg, H., Brunold, C. H., Rauser, W. E., eds. *Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants.* The Hague: *SPB Academic Publishing*, pp 139-151.

Kyle, D. J., Ohad, I. and Arntzen, C. J. 1984. Membrane protein damage and repair: selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4070-4074.

Lacan, D., and Baccou, J. C. 1998. High levels of antioxidant enzymes correlate with delayed senescence in non-etted muskmelon fruits. *Planta* 204:899-903.

Laing, W. A., Greer, D. H., and Schnell, T. A. 1995. Photoinhibition of photosynthesis causes a reduction in the vegetative growth rates of dwarf bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 22: 511-520.

Lang, M., Lichtenthaler, H. K., Sowinska, M., Heisel, F., and Miehé, J. A. 1996. Fluorescence imaging of water and temperature stress in plant leaves. *Journal Of Plant Physiology* 148: 613-621.

Law, M. Y., Charles, S. A., Halliwell, B. 1988. Glutathion and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracia*) chloroplast. The effect of hydrogen peroxide and paraquat. *Biochem. J.* 210: 899-903.

Larcher, W., Wagner, J., and Lütz, C. 1997. The effect of heat on photosynthesis, dark respiration and cellular ultrastructure of the arctic-alpine psychrophyte *Ranunculus glacialis*. *Photosynthetica* 34: 219-232.

Lazarow, P. B., and Fijiki, Y. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1: 489-530.

Lee, E. H., Jersey, J. A., Gifford, C., Bennett, J. H. 1984. Differential ozone tolerance in soybean and snap beans: analysis of ascorbic acid in O₃-resistant cultivars by high performance liquid chromatography. *Environmental and Experimental Botany.* 24: 331-341.

Lefohn, A. S. 1992. Surface level ozone exposure and their effects on vegetation. Lewis Publishers, Chelsea.

Legassicke, B. C., and Ormrod, D. P. 1981. Suppression of ozone-injure on tomatoes by ethylene diurea in controlled environments and in the field. *Horticulture Science.* 16: 183-184.

Lehnherr, B., Grangjean, F., Machler, F., and Fuhrer, J. 1987. The effect of ozone in ambient air on ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. Activity decrease photosynthesis and grain yield in wheat. *J. Plant Physiol.* 130. 189-200.

Leone, I. A., Brennan, E. and Daines, R. H. 1966. Effect of nitrogen nutrition on the response of tobacco to ozone in the atmosphere. *J. Air Pollut. Contr. Assoc.* 16: 191-196.

Leung, H. W., Vang, M. J., and Mavis, R. D. 1981. The cooperative interaction between Vitamin E and Vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids *Biochimica et Biophysica Acta* 664: 266-272.

Leverenz, J. W., Falk, S., Pilstrom, C. M., and Samuelsson, G. 1990. The effects of photoinhibition on the photosynthetic. Light response curve of green plant cells (*Chlamydomonas reinhardtii*). *Planta* 182: 161. 168.

Lichtenthaler, H. K., and Buschmann, C., 1987. Chlorophyll fluorescence spectra of green bean leaves. *Journal Plant Physiology*. 129: 137-147.

Lichtenthaler, H. K., and Rinderle, U. 1988a. The role of chlorophyll fluorescence in the detection of stress conditions in plants. *CRC. Crit. Rev. Anal. Chem.* 19 (Suppl.1) 29-85.

Lichtenthaler, H. K., and Rinderle, U. 1988b. Chlorophyll fluorescence spectra as induced by blue light and red laser light. In: *Proceed. 4 th Internat. Colloq. On Spectral signatures of objects in remote sensing, Aussois 1988*, pp. 251-254. ESA Publications Divisions, Noordwijk.

Lichtenthaler, H. K. 1990. Applications of chlorophyll fluorescence in stress physiology and remote sensing. En: M. D. Steven & J. A. Clark (Eds.). *Applications of remote sensing in agriculture*, pp. 287-305. London: Butterworths.

Lichtenthaler, H. K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.

Lichtenthaler, H. K., and Miede, J.A. 1997. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2: 316-320.

Liso, R., De Gara, L., Tommasi, F., Arrigoni, O. 1985. Ascorbic acid requirement for increased peroxidase activity during potato tuber slice aging. *FEBS Lett.* 187: 141-45.

Long, S. P., Humpries, S., and Falkowski, P. G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 633-662.

Lorenzini, G., and Pannattoni, A. 1986. Atmospheric ozone levels in Tuscany (Central Italy) as monitores with indicator plants. 511-517 in *environmental Quality and Ecosystem Stability* vol 3. Bar-Illav Univ. Ramat-Gan Israel.

Lorenzini, G., Nali, C., Panucucci, A., 1994. Surface ozone in Pisa (Italy): a six-year study. *Atmos. Environ.* **28**: 3155-3164.

Ludlow, M. M. 1987. Light stress and high temperature. Photoinhibition (D. J. Kyle C. B. Osmond and C. J. Arntzen eds). *Elsevier, amsterdam*.

Luwe, M., Takahama, U., Heber, U. 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea L.*) leaves. *Plant Physiology* **101**: 969-976.

Luwe, M., 1996. Antioxidant in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica L.*) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air. *Plant Cell Environ.* **19**: 321-328.

Lyons, T., Plöchl, M., Turcsanyi, E., Barnes, J. D. 1999. Extracellular antioxidant: a protective screen against? In: Agrawal, S.B., Agrawal, M. (Eds.). Environmental pollution and plant responses. CRC/Lewis Publishers, Boca Raton. Pp. 183-201.

Mächler, F., Wasescha, M. R., Krieg, F., Obertli, J. J. 1996. Damage by ozone and protection by ascorbic acid in barley leaves. *Journal Of Plant Physiology* **148**: 469-473.

Maccarrone, M., Veldink, G. A., and Vliegenthart, J. F. G. 1992. Thermal injury and ozone stress soybean lipoxygenases expression. *FEBS Lett.* **309**: 225-230.

Mackay, C. E., Senaratna, T., McKersie, B. D., and Fletcher, R. A. 1987. Ozone induced injury to cellular membranes in *Triticum aestivum L.* and protection by the triazole S-3307. *Plant cell Physiol.* **28**: 1271-1278.

Macpherson, A. N., Telfer, A., Barber, J. and Truscott, T. G. 1993. Direct detection of singlet oxygen from isolated photosystem II reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**: 301-309.

Makino, A., Mae, T. and Ohira, K. 1984. Relationship between nitrogen and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in rice leaves

from emergence through senescence. *Plant and Cell Physiology* 25: 429-437.

Manning, W. J., and Valdaro, P. M., 1973. Suppression of oxidant air pollution injury on bean plants by systemic fungicides under field conditions. *Phytopathology* 63: 201, (Abstract).

Manning, W. J., Feder, W. A., Vardaro, P. M. 1974. Suppression of oxidant injury by benomyl: effects on yields of bean cultivars in the field. *Journal Environmental Quality*. 3: 1-3.

Manning, W. J., and Krupa, S. V. 1992. Experimental methodology for studying the effects of ozone on crops and trees. In: Lefohn, A.S. (Ed.). Surface level ozone exposure and their effects on vegetation. *Lewis Publishers, Chelsea*. Pp. 93-155.

Mapson, L. W. 1970. In the biochemistry of fruits and their products, Vol. 1 (Food Science and Tecnology, a series of Monographs) (Hulme, A. C., Ed.), pp. 369-384, Academic Press, London.

Marangoni, A. G., Duplessis, P.M., Lencki, R, W., Yada, R. Y. 1996a. Low temperature stress indices transient oscillations in sucrose metabolism in *Solanum tuberosum*. *Biophysical Chemistry* 61 (2-3): 177-184.

Marrs, K. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 127-158.

Matters, G. J., Scandalios, J. G. 1986. Effect of free radical generating herbicide paraquat on the expresion of the superoxide dismutase (SOD) genes in maize. *Biochim Biophys. Acta* 882: 29-38.

Mattos, E. A., Herzog, B., Lüttge, U. 1991. Chlorophyll fluorescence during CAM-phase in *Clusia minor* L. under drought stress. *J. Exp. Bot.* 50: 253-261.

Matyssek, R., Keller, T., Koike, T. 1993. Branch growth and leaf gas exchange of *Populus tremula* exposed to low ozone concentrations throughout two growing seasons. *Environmental Pollution* 79: 1-7.

Maurer, S., Matyssek, R., Günthardt-Goer, M. S., Landolt, W., Einig, W. 1997. Nutrition and the ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) 1. Responses at the leaf level. *Trees-Structure and Function* 12: 1-10.

Maxwell, C., Griffiths, H., and Young, A. J. 1994. Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Functional Ecology* 8: 746-754.

Maxwell, D. P., Falk, S. Trick, C. G. Huner, N. P. A. 1994. Growth at low temperature mimics high-light acclimation in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology* 105: 535-543.

May, M. J., Hammond-Kosack, K. E., Jones, D. J. 1996. Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* 110: 1367-79.

McKersie., B. D, Beversdorf, W. D., Hucl, P. 1982a. The relationship between ozone insensitivity, lipid-soluble antioxidants, and superoxide dismutase in *Phaseolus vulgaris*. *Can. J. Bot.* 60: 2686-2691.

McMichael, A. C., Harris, M., Camlin, M. S. 1989. Application of chlorophyll fluorescence kinetics in the study of varietal reaction to stress. *Plant Variet. Sedes.* 2: 45-51.

Mehlhorn, H., Senfert, G., Schmidt, A., and Kunert, K. I. 1986. Effect of SO₂ and O₃ on production of antioxidants in conifers. *Plant Physiol.* 82: 336-338.

Mehlhorn, H., and Wellburn, A. R. 1987. Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature* 327: 417-418.

Mehlhorn, H., O'Shea, J. M., Wellburn, A. R. 1990. Electron spin resonance evidence for deformation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiology Plantarum.* 79: 377-383.

Miller, J. E. 1987. Effects of ozone and sulfur dioxide stress on growth and carbon allocation in plants. *Rec. Adv. Phytochem.* 21: 55-100.

Miller, J. E. 1988. Effects on photosynthesis, carbon allocation, and plant growth associated with air pollutant stress. In: Heck, W. W., Taylor, O. C., Tingey, D. T. (ed.): *Assessment of Crop Loss from Air Pollutants*. Pp. 287-314. *Elsevier Applied Science, London*.

Mohammed, G. H., Binder, W. D., and Gillies, S. L. 1995. Chlorophyll fluorescence: a review of its practical forestry applications and instrumentation. *Scandinavian Journal of Forest Research* 10: 383-410.

Moldau, H., Sober, J., Sober, A. 1993. Impact of acute exposure on CO₂ uptake by two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynthetica*. 28: 133-141.

Moyer, J. W., Cole, H. Jr., Lacasse, N. L., 1974. Suppression of naturally occurring oxidant injury on azalea plants by drench or foliar spray treatment with bezimidazole or oxanthiin compounds. *Plant Disease Rept.* 58: 41-44.

Mulchi, C. L., Slaughter, M., Saleem, E. H., Lee, R., Pausch, and Rowland, R. 1992. Growth and physiological characteristic of soybean in open top chambers in response to ozone and increased atmospheric CO₂. *Agric. Ecosystems Env.* 38: 107-118.

Nali, C., Guidi, L., Filippi, F., Soldatini, G. F., Lorenzini, G. 1998. Photosynthesis of two poplar clones contrasting in O₃ sensitivity. *Trees* 12: 196-200.

Nakano, Y., and Asada, K. 1980. Spinach chloroplast scavenge hydrogen peroxide upon illumination. *Plant Cell Physiol.* 21: 1295-1307.

Nakano, Y., and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell environ.* 22: 867-880.

Navas, P., Gómez-Díaz, C. 1995. Ascorbate free radical and its role in growth control. *Protoplasma* 184: 8-13.

Nemoto, S., Otsuka, M., Arakawa, N. 1996. Inhibitory effect of ascorbate on cell growth: relation to catalase activity. *J. Nutr. Sci. Vitaminol* 43: 77-85.

Neubauer, C., and Yamamoto, H. Y. 1994. Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynthesis Research* 39: 137-144.

Neuner, G. Buchner, O. 1999. Assessment of foliar frost damage: a comparison of in vivo chlorophyll fluorescence with other viability tests. *J. Appl. Bot. Angew. Bot.* 73: 50-54.

Nie, G. Y., Tomasevic, M., Baker, N. R. 1993. Effects of ozone on the photosynthetic apparatus and leaf proteins during leaf development in wheat. *Plant Cell Environ.* 16: 643-651.

Nie, G. Y., Long, S. P., Webber, A. 1993. The effect of nitrogen supply on down-regulation of photosynthesis in spring wheat grown in an elevated CO₂ concentration. *Plant Physiology* 102: 138.

Navas, P., Villalva, J. M., Córdova, F. 1994. Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197: 1-13.

Neubauer, C., Yamamoto, H. Y. 1994. Membrane barriers and Mehler-peroxidase reaction limit ascorbate available for violaxanthin de-epoxidase activity in intact chloroplasts. *Photosynthesis Research* 39: 137-144.

Noctoc, G., and Foyer, C. H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol- Bio.* 49: 249-279.

Nouchi, I. 1993. Changes in antioxidant levels and activities of related enzymes in rice leaves exposed to ozone. *Soil Sci Plant Nutr.* 39: 309-320.

Ögren, E., Sjöström, M. 1990. Estimation of the effect of photoinhibition on the carbon gain in leaves of a willow canopy. *Planta* 181: 560-567.

Ögren, E., and Rosenqvist E. 1992. On the significance of photoinhibition in the field and its generality among species. *Photosynthesis. Research.* 33: 63-71.

Ollerenshaw, J. H., Lyons, T., Barnes, J. D. 1999. Impacts of ozone on the growth and yield of field-grown winter oilseed rape. *Environ. Pollut.* 104: 53-59.

Öquist, G., Greer, D. H., Ögren, E. 1987. Light stress at low temperature. In D. J. Kyle, C. B. Osmond, C. J. Arntzen, eds, Photoinhibition. Elsevier, New York, Elsevier, New York, pp 67-87.

Öquist, G., Chow, W. S., Anderson, J. M. 1992. Photoinhibition represents a mechanism for long-term regulation of photosystem II. *Planta* 186: 450-460.

Ormrod, D. P., Adedipe, N. O. and Hofstra, G. 1973. Ozone effects on growth of radish plants as influenced by nitrogen and phosphorus nutrition and by temperature. *Plant Soil.* 39: 437-439.

Ormrod, D. P., Beckerson, D. W., 1986. Polyamines. *Horticultural Science* 21: 1070-1071.

Oshima, R. J., Taylor, O. C., Braegelmann, P. K., and Baldwin, D. W. 1975. Effects of ozone on the yield and plant biomass of a commercial variety of tomato. *J. Environ. Qual.* 8: 474-479.

Osmond, C. B., Ramus, J., Levavasseur, G., Franklin, L. A., and Henley, W. J. 1993. Fluorescence quenching during photosynthesis and photoinhibition of *Ulva rotundata* Blid. *Planta* 190: 91-106.

Osmond, C. B. 1994. What in photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants, in: Baker N. R., & Bowyer, J. R. (eds.), Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanism to the Field, *BiosScientific Publishers, Oxford* pp 1-24.

Paliyath, G., Droillard, M. J. 1992. The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiology and Biochemistry* 30: 789-812.

Papageorgiou, G., 1975. Chlorophyll fluorescence: an intrinsic probe of photosynthesis. In: Govindjee (Ed.), Bioenergetics of

photosynthesis-cell biology a series of monographs. Academic Press, London pp. 319-371.

Park, Y. I., Chow, W. S., Anderson, J. M., 1995. The quantum yield of photoinactivation of photosystem II in pea leaves is greater at low than at high photon exposure. *Plant Cell Physiol.* **36**: 1163-1167.

Park, Y. I., Chow, W. S., Anderson, J. M., Hurry, V. M. 1996. Differential susceptibility of photosystem II to light-acclimated pea leaves depends on the capacity for photochemical and non-radiative dissipation of ligh. *Plant Science.* **115**: 137-149.

Peleg, M. 1976. The chemistry of ozone in the treatment of water. *Water Research*, **10**: 361-5.

Pell, E. J., Weissberger, W. C., and Speroni, J. J. 1980. Impact of ozone on quantity and quality of greenhouse-grown potato plants. *Environmental Science and Technology* **14** (5): 568-571.

Pell, E. J. and Pearson, N. S. 1983. Ozone-induced reduction in quantity of 1,5-ribulose biphosphate-carboxilase in alfalfa foliage. *Plant Physiology* **73**: 185-187.

Pell, E. J., Winner, W. E, Vinten-Johansen, C., Mooney, H. A. 1990. Response of radish to multiple stresses. I. Physiological and growth responses to changes in ozone and nitrogen. *New Phytologist* **115**: 439-446.

Pell, E. J., Eckhard, N., and Eniyedi, A. J. 1992. Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxilase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytol.* **120**: 397-405.

Pell, E. J., Eckhard, N., and Glick, R. E. 1994. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynth. Res.* **39**: 453-462.

Pell, E. J., Schlaghaufer, C. D. and Arteca, R. N. 1997. Ozone-induced oxidative stress: Mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plant.* **100**: 264-273.

Peters, J. L., Castillo, F. J., and Heath, R. L. 1989. Alteration of extracellular enzymes in pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. *Plant Physiol.* 89: 159-164.

Petolino, J. F., Mulchi, C. L., and Aycock, Jr. M. K. 1983. Leaf injury and peroxidase activity in ozone-stressed tobacco cultivars and hybrids. *Crop Sci.*, 23: 1102-1106.

Pfündel, E., Bilger, W., 1994. Regulation of a possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* 42: 89-109.

Pinto, M. E., Mudd, J. B., and Barley-Serres, J. 1995. Ozone induced alterations in the accumulation of newly synthesized proteins in leaves of maize. *Plant Physiol.* 35: 777-785.

Plazek, A., Rapacz, M., and Skoczowski, A. 2000. Effects of ozone fumigation on photosynthesis and membrane permeability in leaves of spring barley, meadow fescue, and winter rape. *Photosynthetica* 38 (3): 409-413.

Pleijel, H., Norberg, P. A., Selldén, G., Skärby, L. 1999. Tropospheric ozone decreases biomass production in radish plants (*Raphanus sativus*) grown in rural south-west Sweden. *Environmental Pollution.* 106: 143-147.

Porcuna, J. L., Gimeno, B., Sanz, M^a. J., Ocon, C. Jiménez, A. 1999. La contaminación de ozono troposférico de los cultivos en el litopral Mediterráneo. *Boletín Vida Sana* 3 48-53.

Powles, S. B. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 15-44.

Prasil, O., Adir, N., Ohad, I. 1992. Mechanism of photoinhibition and recovery processes. In J. Barber, ed, Topics an Photosynthesis, Vol. 11. Elsevier, Amsterdam, *The Netherlands*, pp 293-348.

Pratt, G. C., and Krupa, S. V. 1981. Soy-bean cultivar Hodgson response to ozone. *Phytopathology* 71: 1129-1132.

Prezelin, B.B., Samuelsson, G., and Matlich, H. A. 1986. Photosystem II photoinhibition and altered kinetics of photosynthesis during nutrient-dependent high-light photoadaptation in *Gonyaulax polyedra*. *Mar. Biol.* 93: 1-12.

Price, A., Lucas, P. W., Lea, P.J. 1990. Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: a leaf section approach. *J. Exp. Bot.* 41: 1309-1317.

Pujadas, M., Terés, J., y Gimeno, B. S. 1997. La experiencia española en el diseño de sistemas experimentales para el estudio de efectos producidos por contaminantes gaseosos sobre especies vegetales. *Bol. San. Veg. Plagas* 23: 39-55.

Pye, J. M. 1988. Impact of ozone on the growth and yield of trees: A review. *J. Environ. Qual.* 17: 347-360.

Ranieri, A., Schenone, G., Lencioni, L. and Soldatini, G. F. 1994. Detoxificant enzymes in pumpkin grown in polluted ambient air. *J. Environ. Qual.* 23: 360-364.

Ranieri, A., D'Urso, G., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G. F. 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum.* 97: 381-387.

Ranieri, A., Tognini, M., Tozzi, C., Barbato, R. and Soldatini, G. F. 1997. Changes in the thylakoid protein pattern in sunflower plants as a result of ozone fumigation. *J. Plant Physiol.* 151: 227-234.

Ranieri, A., Serini, R., Castagno, A., Nali, C., Baldan, B., Lorenzini, G. and Soldatini, G. I. 2000. Differential sensitivity to ozone in two poplar clones. Analysis of thylakoid pigment-protein complexes. *Physiologia Plantarum* 110: 181-188.

Rao, M. V., 1992. Cellular detoxifying mechanism determine the age dependent injury in tropical trees exposed to SO₂. *J. Plant Physiol.* 140: 733-740.

Rao, M. V., Gopinadhan, P., Ormrod, D. P. 1996. Ultraviolet-B and ozone induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 110: 126-136.

Rao, M. V., Koch, J. R., Davis, K. R. 2000. Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Mol. Biol.* 44: 346-358.

Rautenkranz, A. A. F., Mäxchler, L. L. F., Martinoiä, E., Oertli, J. 1994. Transport of ascorbate and dehydroascorbate across protoplast and vacuole membrane isolated from barley (*Hordeum vulgare* L. cv Farbel) leaves. *Plant Physiology* 106: 187-193.

Reich, R. 1983. Effects of low concentration of ozone on net photosynthesis, dark respiration, and chlorophyll contents in ageing hybrid poplar leaves. *Plant Physiology* 73: 291:296.

Reichenauer, T. G., Goodman, B. A., Kosteckı, P., Soja, G. 1998. Ozone sensitivity in *Triticum durum* and *T. Aestivum* with respect to leaf injury, photosynthetic activity and free radical content. *Physiol Plant.* 104: 681-686.

Reiling, K., and Davison, A. W. 1994. Effects of exposure to ozone at different stages in the development of *Plantago major* L. on chlorophyll fluorescence and gas exchange. *New Phytologist.* 128: 509-514.

Reinert, R. A., and Spurr, H. W. Jr., 1972. Differential effects of fungicides on ozone injury and brown spot disease of tobacco. *Journal Environmental Quality.* 1: 450-452.

Renaud, J. P., Allard, G. Mauffete. Y. 1997. Effects of ozone on yield, growth, and root concentrations of two alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. *Environ. Pollut.* 95: 273-281.

Rennenberg, H. 1995. In aminoacids and their derivatives in higher plants (Wallsgrave, R. M., Ed.) pp. 155.171, Cambridge University Press, UK.

Ribas, A., Filella, I., Gimeno, B. S., Peñuelas, J. 1998. Evaluation of tobacco cultivars as bioindicators of phytotoxic levels of ozone in Catalunya. *Water, Air Soil Pollut.* 94: 53-60.

Rinderle, U., and Lichtenthaler, H. K. 1988. The chlorophyll fluorescence ratio F690/F735 as a possible stress indicator. En: H. K. Lichtenthaler (Ed.). Applications of chlorophyll fluorescence in photosynthesis research, stress physiology, hydrobiology and remote sensing, pp. 189-196. Dordrecht: *Kluwer Academic Publishers.*

Rintamäki, E., Salo, R., and Aro, E. M. 1995. Regulation of D1-protein degradation during photoinhibition of photosystem II in vivo:

Phosphorylation of the D1 protein in various plant groups. *Planta* 195: 379-386.

Robinson, D. C., and Wellburn, A. R. 1983. Light-induced changes in the quenching of 9-aminoacridine fluorescence by photosynthetic membranes due to atmospheric pollutants and their products. *Environ. Pollut. (Ser. A)* 32: 109-120.

Rowland, A. J., Borland, A. M., and Lea, P. J. 1988. Changes in amino-acids, amines and proteins in response to air pollutants. In: *Air Pollution and Plant Metabolism* (Ed, by S. Schulte-Hostede, N.M. Darral, W. Blank & A. L. Wellburn), pp. 189-221. *Elsevier Applied Science, London*.

Ruban, A. V., Young, A. J., and Horton, P. 1993. Induction of non-photochemical energy dissipation and absorbance changes in leaves. *Plant Physiol.* 102: 741-750.

Russo, T., Zambrano, N., Espósito, F., Ammendola, R., Cimino, F., Fiscella, M., Jackman, J., O'Connor, M., Anderson, C. W., and Apella, E. 1995. A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 270: 29386-29391.

Sakaki, T., Kondo, N., and Sugahara, K. 1983. Breakdown of photosynthetic pigments and lipid in spinach leaves with ozone fumigation: role of active oxygen. *Physiol. Plant* 59: 28-34.

Sandermann, H. 1996. Ozone and plant health. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 347-366.

Sandroni, S., Bacci, P., Boffa, G., Pellegrini, U., Ventura, A. 1994. Tropospheric ozone in the pre-alpine and alpine regions. In *Proceeding of the European Symposium: Physicochemical Behaviour of Atmospheric Pollutant*, Varese, Italy, October 18-22, 1993. Edited by G. Angeletti and G. Restelli, Rep EUR15609/1 EN. Eur. Comm. Luxemburg.

Sanz, M. J., Millán, M. M. 1998. The dynamic of aged air masses and ozone in the western Mediterranean: relevance to forest ecosystem. *Chemosphere.* 36: 1089-1098.

Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. *Plant Physiology* **101**: 205-212.

Schreiber, U., Vidaver, W., Runekles, V. C., and Rosen, P. 1978. Chlorophyll fluorescence assay for ozone injury in intact plants. *Plant Physiol.* **61**: 80-84.

Schreiber, U., Schliwa, U., Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* **10**:51-62.

Schreiber, U., and Bilger, W. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. *Progress in Botany* **54**: 151-173.

Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a non-destructive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecological Studies* **100**: 49-70.

Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. En: E. D. Schulze & M. M. Cadwell (Eds.). *Ecophysiology of photosynthesis*, pp. 49-75. Berlin: Springer.

Schreiber, U., Kühl, M., Klimant, I., and Reising, H. 1996. Measurement of chlorophyll fluorescence within leaves using a modified PAM fluorometer with a fiber-optic microprobe. *Photosynthesis research* **47**: 103-109.

Schmieden, U., and Wild, A. 1995. The contribution of ozone to forest decline. *Physiol. Plant* **94**: 371-378.

Schmidt, A., and Kunert, K. J. 1986. Lipid peroxidation in higher plants. The role of glutathione reductase. *Plant Physiol.* **82**: 700-702.

Seaton, G. G. R., and Walker, D. A. 1990. Chlorophyll fluorescence as a measure of photosynthetic carbon assimilation. *Proc. R. Soc. Lond. B* **242**: 29-35.

Seeman, J. R., Sharkey, T. O., Wang, J. L., Osmond, C. B. 1987. Environmental effects on photosynthesis, nitrogen-use efficiency,

and metabolite pools in leaves of sun and shade plants. *Plant Physiol.* 84: 796-802.

Seinfeld, J. H. 1989. Urban air pollution: State of the Science. *Science* 243: 745-752.

Sen Gupta, A., Alscher, R. G., and McCune, D. 1991. Response of photosynthesis and cellular antioxidants to ozone in *Populus* leaves. *Plant Physiol.* 96: 650-655.

Sen Gupta, A., Heinen, J. L., Holaday, A. S., Burko, J. J., Allen, R. D. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants overexpresses chloroplastic Cu, Zn and superoxide dismutase. *Proceeding national Academy of Sciences* 90: 1629-1637.

Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Van Montagu, M., Inzé, D. 1996. Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation on synchronised tobacco 3Y-2cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4868-72.

Sillman, S. 1998. The relation between ozone, NO_x and hydrocarbons in urban and polluted rural environments. *Atm. Environ.* 33: 1821-1845.

Skogen, D., Chaturvedi, R., Weidemann, F., and Nilsen, f. 1986. Photoinhibition of photosynthesis. Effect of light quality and quality on recovery from photoinhibition in *Lemna gibba*. *J. Plant Physiol.* 126: 195-205.

Smith, I. K., Kendall, A. C., Keys, A. J., Turner, J. C., Lea, P. J. 1983. Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science Letters* 37: 29-33.

Smith, I. K., Kendall, A. C., Keys, A. J. Turner, J. C., Lea, P. J. 1984. Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci. Lett.* 37: 29-33.

Smith, T. A. 1985. Polyamines. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 36: 117-143.

Soldatini, G. F., Lorenzini, G., Filippi, F., Nali, C., Guidi, L. 1998 a. Photosynthesis of two poplar clones under long-term exposure to ozone. *Physiol. Plant.* 104: 707-712.

Soja, G., Pfeifer, U., and Soja, A. M. 1998. Photosynthetic parameters as early indicators of ozone injury in apple leaves. *Physiol. Plant.* 104: 639-645.

Somersalo, S., Krause, G. H. 1990. Reversible photoinhibition of unhardened and cold-acclimated spinach leaves at chilling temperatures. *Planta.* 180: 181-87.

Sonoike, K. 1998. Various aspects of inhibition of photosynthesis under light/chilling stress: "photoinhibition at chilling temperatures" versus "chilling damage in the light". *Journal of Plant Research* 111: 121-129.

Sonoike, K. 1999. The different roles of chilling temperatures in the photoinhibition of photosystem I and photosystem II. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 48: 136-141.

Stow, T. K., Allen, H. L., Kress, L. W. 1992. Ozone impacts on seasonal foliage dynamics of young loblolly pine. *Forest Science* 38. 102-119.

Stockwell, W. R., Kramm, G., Scheel, H. E., Mohnen, V. A., Seilev, W., 1997. Ozone formation, destruction and exposure in Europe and the United State. In: Sandermann, H., Wellburn, A.R., Heath, R.R., (Eds.), Ozone and forest decline: A comparison of controlled chamber and field experiments. Springer-Verlag, Berlin, *Ecology Studies* 127: 1-38.

Sugiharto, B., Miyata, K., Nakamoto, H., Sasakawa, H., Sugiyama, T. 1990. Regulation of expression of carbon-assimilating enzymes by nitrogen in maize leaf. *Plant Physiol.* 92: 963-969.

Sutton, R., and Ting, I. P. 1977. Evidence for repair of ozone induced membrane injury: alteration in sugar uptake. *Atmos. Environ.* 11: 273-275.

Tanaka, K., Suda, T., Kondo, N., Sugahara, K. 1985. O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell and Physiology* 26: 1425-1431.

Takahama, U., Veljovic-Ionanovic, S., Heber, U. 1992. Effects of the air pollutant SO₂ on leaves. Inhibition of sulphite oxidation in the apoplast by ascorbate and apoplastic peroxidase by sulfite. *Plant Physiology* 100: 261-266.

Takahama, U., and Oniki, T. 1992. Regulation of peroxidase oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 33: 379-387.

Takahama, U. 1993. Redox state of ascorbic acid in the apoplast of stems of *Kalanchoë daigremontiana*. *Physiologia Plantarum* 89: 791-798.

Takahama, U., and Oniki, T. 1994. The association of ascorbate and ascorbate oxidase in the apoplast with IAA-enhanced elongation of epicotyls from *Vigna angularis*. *Plant and Cell Physiology* 35: 257-266.

Tanaka, K., Otsubo, T., Kondo, N. 1982. Participation of hydrogen peroxide in the inactivation of Calvin-cycle SH enzymes in SO₂-fumigated spinach leaves. *Plant Cell Physiology* 23: 1009-1018.

Tanaka, K., Suda, Y., Kondo, N., Sugahara, K. 1985. O₃ tolerance and the ascorbate-dependent H₂O₂ decomposing system in chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 26: 1425-1431.

Tanaka, K., Saji, H., and Kondo, N. 1988. Immunological properties of spinach glutathione reductase and inductive biosynthesis of the enzymes with ozone. *Plant Cell Physiol.* 26: 637-642.

Tandy, N. E., Di Giulio, R. T. and Richardson, C. J. 1989. Assay Of electrophoresis of superoxide dismutase from red spruce (*Picea rubens* Sarg.), loblolly pine (*Pinus taeda* L.), and scotch (*Pinus sylvestris* L.): *Plant Physiology* 90: 742-748.

Tarashima, I., Evans, J. R. 1988. Effects of light and nitrogen nutrition on the organization of the photosynthetic apparatus in spinach. *Plant Cell Physiol.* 29: 143-155.

Taylor, G. S., 1970. Tobacco protected against fleck by benomyl and other fungicides . *Phytopathology.* 60: 578 (Abstr.).

Telfer, A., Bishop, S. M., Phillips, D. and Barber, J. 1994. Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. *J. Biol. Chem.* 269: 13244-13253.

Temple, P. J., Riechers, G. H., Miller, P. R. 1993. Growth response of ponderosa pine to long-term exposure to ozone, wet and dry acidic deposition, and drought. *Canadian Journal of Forest Research* 23: 59-66.

Thiele, A., Schirwitz, K., Winter, K. Krause, G. H. 1996. Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. *Plant Science* 115: 237-250.

Ting, I. P., and Sutton, R. 1975. Repair of ozone induced alterations in membrane permeability. *Plant Physiol.* 56: S-5.

Tingey, D. T., Wilhour, R. G., and Standley, C. 1976. The effect of chronic ozone exposures on the metabolite content of ponderosa pine seedlings. *Forest Sci.* 22: 234-241.

Tingey, D. T., and Taylor, G. R. Jr. 1982. Variation in plant response to ozone: A: conceptual model of physiological events. In *Effects of Gaseous an Pollution in Agriculture and Horticulture* (Ed., Unsworth, M. H. And Ormrod, D. P.). *Butterworth Scientific, London.*, 113-138.

Tingey, D. T., and Anderson, C. P. 1991. The physiological basis of differential plant sensitivity to changes in atmospheric quality. In: Taylor, G. E. Jr., Pitelka, L. F., Clegg, M. T. (ed.): *Ecological Genetic and Air Pollution*. Pp. 209-235. Springer-Verlag, New York.

Tjoelker, M. G., and Luxmoore, R. J. 1991. Soil nitrogen and chronic ozone stress influence physiology, growth and nutrient status of *Pinus taeda* L. and *Liriodendron tulipifera* L. seedlings. *New Phytologist.* 119: 69-81.

Tjoelker, M. G., Volin, J. C., Oleksyn, J., and Rich, P. B. 1993. Light environment alters response to ozone stress in seedlings of *Acer saccharum* Marsh, and hybrid *Populus* L. I. In situ net photosynthesis, dark respiration and growth. *New Phytologist* 124: 627-636.

Thompson, J. E., Brown, J. H., Paliyath, G., Todd, J. F., Yao, K. 1991. Membrane phospholipid catabolism primes the production of activated oxygen in senescing tissues. In: Pell, E., Steffen, K., eds. *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Rockville, MD: ASPP, 57-66.

Tolbert, N. E. 1981. Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 133-57.

Tommasi, F., De Gala, L., Liso, R., and Arrigoni, O. 1987. Presenza di ascorbico perossidasi nel regno vegetale. *Boll. Soc. Yt. Biol. Sper.*, 63: 779-785.

Turcsányi, E., Lyons, T., Plöchl, M., Barnes, J., 2000. Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defense against ozone? Testing the concept using broad bean (*Vicia faba* L.). *J. Exp. Bot.* 51: 901-910.

Tyystjärvi, E., Ali-Yrkkö, K., Kettunen, R., and Aro, E. M. 1992. Slow degradation of the D1 protein is related to the susceptibility of low-light-grown pumpkin plants to photoinhibition. *Plant Physiology* 100: 1310-1317.

U.S-EPA. 1996. Air quality criteria for ozone and related photochemical oxidant. Environmental protection agency, office of research and development, vol II EPA/600/P-93/004bF, Research triangle park.

van Wijk, K. J., and van Hasselt, P. R. 1993. Kinetic resolution of different recovery phases of photoinhibited photosystem II in cold-acclimated and non-acclimated spinach leaves. *Physiol Plant.* 87: 187-198.

Valladares, F., Percy, R. W. 1997. Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant Cell and Environmental* 20: 25-36.

Vas, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E. M., and Anderson, B. 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced Q_A -species

promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1408-1412.

Velissariou, D., Davison, A. W., Barnes, J. D., Pfirrmann, T., Holevas, C. D. 1992. Effects of air pollution on *Pinus halepensis* Mill.: pollution levels in Attica, Grece. *Atmos. Environ.* **26**: 373-380.

Verhoeven, A. S., Demmig-Adams, B., Adams, W. W. 1997. Enhanced employment of xanthophyll cycle and thermal energy dissipation in spinach exposed to high light and N-stress. *Plant Physiol* **113**: 817-824.

Versino, M. 1997. Introduction and objective. BEMA- A European Commission projet on Biogenic Emission in the Mediterranean Area. (Special issue). *Atmos. Environ.* **31** SI: 1-3.

Volin, J. C., Tjoelker, M. G., Oleksyn, J., and Reich, P. B. 1993. Light environment alters response to ozone stress in seedlings of *Acer saccharum* Marsh, and hybrid populus L. II. Diagnostic gas exchange and leaf chemistry. *Phytol* **124**: 637-646.

Wada, H., Koshiva, T., Matsui, and Satô, T. 1998. Involvement of peroxidase in diferential sensitivity to λ -radiation in seedlings two *Nicotiana* species. *Plant Science* **132**: 109-119.

Walters, R. G., and Horton, P. 1991. Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynthesis Research* **27**: 121-133.

Walters, R. G., and Horton, P. 1993. Theoretical assessment of alternative mechanisms for non-phothchemical of PSII fluorescence in barley leaves. *Photosynthesis Research* **36**: 119-139.

Wellburn, F. A. M., Wellburn, A. R. 1994. Atmospheric ozone of effects carbohydrate allocation and winter hardiness of *Pinus halepensis* (Mill.). *J. Exp. Bot.* **45**: 607-614.

Wellburn, F. A. M., Wellburn, A. R. 1996. Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences between ozone-fumigated and control treatments in several ozone-sensitive and ozone tolerant plant selections. *Plant Cell Environ.* **19**: 754-760.

White, A. J., and Critchley, C. 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research* 59: 63-72.

Whyfield, C. P., Davison, A. W., and Ashenden, T. W. 1998. The effects of nutrient limitation on the response of *plantago major* to ozone. *New Phytol* 140: 219-320.

Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Scharaude, M., Langebartels, C. Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W. 1997. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C₃ plants. *EMBO J.* 16: 4806-4816.

Winner, W. E., and Athinson, C. J. 1986. Absorption of air pollutants by plants and consequences for growth. *Trends in Ecology & Evolution* 1: 15-18.

Winston, G. W. 1990. Physicochemical basis for free radical formation in cells: production and defense. In: Alscher, R.G., Cumming, J.R. (Eds.), *Stress Response in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms.* Wiley Liss, New York. Pp. 58-86.

Wolf, G.S., Garner, A., Dean, R.T. 1986. Free radical, lipid and protein degradation. *Biochemistry Science* 11: 27-31.

Yoshida, M., Nouchi, Y., Toyama, S. 1994. Studies on the role of active oxygen in ozone injury to plant cells. I. Generation of active oxygen in rice protoplast exposed to ozone. *Plant Sci.* 95: 197-205.