

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA FOTOSINTÉTICA EN CLONES DE
EUCALYPTUS FRENTE A CAMBIOS EN AMBIENTES LUMÍNICOS

por

Sebastián PIAZZA

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2021

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. Dr. Omar Borsani

Lic. Biol. Dr. Gastón Quero

Lic. Biol. Mag. Esteban Casaretto

Ing. Agr. Matías Nión

Fecha: 8 de octubre de 2021

Autor:

Sebastián Piazza

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Lic. Biol. Dr. Gastón Quero por guiarme, por su motivación constante y su disposición a lo largo de todo el trabajo.

Al Ing. Agr. Dr. Omar Borsani por permitirme la realización de esta tesis y por ser una fuente de apoyo constante.

A los docentes y colaboradores del Departamento de Bioquímica y Fisiología Vegetal por prestarme los instrumentos para realizar las mediciones.

A la Empresa Forestal Lumin S.A. por brindar el material vegetal y darme la posibilidad de llevar a cabo este trabajo.

A mi familia por el apoyo brindado durante toda la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	VI
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
A. OBJETIVOS.....	1
1. <u>Objetivo general</u>	1
2. <u>Objetivos específicos</u>	2
II. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
A. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO <i>Eucalyptus</i>	3
B. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA LUZ.....	4
C. PERCEPCIÓN POR LAS PLANTAS DEL AMBIENTE LUMÍNICO...	6
1. <u>Generalidades</u>	6
2. <u>Percepción por fitocromos</u>	7
3. <u>Captación de energía por pigmentos</u>	8
D. FOTOSÍNTESIS.....	9
1. <u>Generalidades en plantas</u>	9
2. <u>Proceso fotofísico</u>	9
3. <u>Proceso fotoquímico</u>	10
4. <u>Proceso bioquímico</u>	11
5. <u>Fotoinhibición</u>	11
E. FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS.....	13
1. <u>Generalidades</u>	13
2. <u>Técnicas de medición</u>	13
3. <u>Partición de energía</u>	15
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	16
A. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	16
B. TRATAMIENTOS DE LUZ.....	17
C. PARÁMETROS DE RENDIMIENTO CUÁNTICO.....	18
D. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	19
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	21
A. DESCRIPCIÓN DE LAS FIRMAS DE FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DE LA ENERGÍA DE EXCITACIÓN.....	21
B. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS DE PARTICIÓN DE ENERGÍA.....	23

C. EFECTO DE LAS FUENTES DE VARIACIÓN SOBRE LA PARTICIÓN DE ENERGÍA DEL PSII.....	25
1. <u>Interacción entre el ambiente lumínico de desarrollo de la hoja y la intensidad de excitación del PSII</u>	26
2. <u>Efecto del ambiente lumínico de desarrollo de la hoja sobre la partición de energía del PSII en los distintos genotipos de <i>Eucalyptus grandis</i></u>	30
D. PROPUESTAS.....	32
V. <u>CONCLUSIONES</u>	33
VI. <u>RESUMEN</u>	34
VII. <u>SUMMARY</u>	35
VIII. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	36
IX. <u>ANEXOS</u>	41

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Página
1. Representación del espectro en forma de ondas electromagnéticas.....	5
2. Representación del espectro de luz visible, diferenciado según su longitud de onda.....	6
3. Ejemplo de firma de fluorescencia para análisis de quenching y de relajación con fluorómetro PAM.....	14
4. Ambiente lumínico: densidad de flujo de fotones y calidad espectral. Y fotos de la distribución de los plantines en invernáculo y cámaras de crecimiento.....	17
5. Firmas de fluorescencia para análisis de quenching y de relajación en cuatro niveles de luz actínica.....	21
6. Correlaciones entre los parámetros y subparámetros de partición de energía.....	22
7. Correlación entre los parámetros Φ_{PSII} y Φ_{qp} en función de la interacción ambiente lumínico-luz de excitación del PSII.....	25
8. Correlación entre los parámetros Φ_{NPQ} y $\Phi_{NPQFast}$ en función de la interacción ambiente lumínico-luz de excitación del PSII.....	27
9. Correlación entre los parámetros Φ_{qp} y $\Phi_{NPQFast}$ en función de la interacción ambiente lumínico-luz de excitación del PSII.....	28
10. Grafos de correlación entre subparámetros de partición de energía para cada genotipo según ambiente lumínico.....	29

I. INTRODUCCIÓN

La producción forestal ha experimentado un incremento casi constante en Uruguay a partir de la implementación de la segunda ley forestal en 1987, lo que promovió la inversión en implantación de montes forestales mediante la aplicación de diferentes estímulos como por ejemplo subsidios y exoneraciones impositivas en suelos identificados como de “prioridad forestal”. De un total de 186 mil hectáreas forestadas en el 1990 se llegó a las 1.150.000 hectáreas en 2016 (Arbeletch y Martine, 2018). En el año 2018 la producción forestal registró un valor de exportaciones de 2156 millones de dólares con respecto a los 1968 millones de dólares registrados por la exportación de carnes (vacuna, ovina y otras, MGAP. OPYPA, 2019), lo que da una pauta clara de la creciente relevancia del sector dentro de la producción agropecuaria.

La forestación se caracteriza por presentar un ciclo de producción extenso en el tiempo, dónde, una plantación para producir madera de calidad o madera sólida puede durar hasta 30 años mientras que la producción de madera para pulpa a partir del género *Eucalyptus*, tiene un promedio de duración de 10 años (FAO, 2004). Esta particularidad se traduce en que la toma de decisiones al comienzo del ciclo termina siendo condicionante del desarrollo de la producción. Esto se expresa de manera especial en las decisiones vinculadas con la densidad de plantación a campo, y/o con la densidad de plantines en vivero.

Una mayor densidad de plantación afecta directamente, entre otras cosas, el sombreado al que el árbol va a estar expuesto durante toda su vida productiva. Por lo tanto, conocer la respuesta diferencial de clones de *Eucalyptus* a distintas longitudes de onda e intensidades lumínicas es una información útil para la plantación comercial a nivel productivo. A su vez, crea la posibilidad de desarrollar una metodología que permita identificar diferencias a partir de variables fotosintéticas en estadios tempranos de desarrollo de los plantines a nivel de vivero. Para evaluar esta respuesta es necesario caracterizar la eficiencia fotosintética y observar posibles cambios en los sistemas de captación de luz y transformación en energía en plantas desarrolladas en diferentes ambientes lumínicos.

A. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Analizar la respuesta de la actividad fotosintética en hojas de *Eucalyptus grandis* a diferentes niveles de flujo lumínico.

2. Objetivos específicos

- a) Identificar los niveles de irradiancia que permitan diferenciar a nivel fotosintético dos clones de *Eucalyptus grandis*.
- b) Analizar la respuesta de estos clones a la radiación cambiante.
- c) Caracterizar los procesos de partición de energía en el fotosistema II (PSII) de dos clones de *Eucalyptus grandis* en respuesta a la irradiancia.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

A. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Eucalyptus*

Eucalyptus constituye un complejo género de plantas con follaje persistente localizado en la botánica sistémica dentro de la familia de las Mirtáceas, subfamilia Leptospermoideas. Cuenta con especies subarborescentes, arbustivas y arbóreas con alturas de 30cm, un par de metros, a más de 100m (Brussa, 1994). Es un extraordinario género con especies adaptadas a una gran diversidad de hábitats, desde el nivel del mar hasta los 2300m de altura (Granados-Sánchez y López, 2007). Es originario de Australia y Tasmania aunque está ampliamente introducido en numerosos países, sobre todo en aquellos con clima mediterráneo, subtropical y tropical (Fernández y Silva, 2016). Este género tiene gran potencial comercial por presentar diversas características valiosas como por ejemplo su fácil capacidad de propagación, rápido crecimiento y su capacidad de prosperar en suelos degradados y climas secos (Ritter, 2014).

El género *Eucalyptus* tiene la particularidad de presentar polimorfismo foliar marcado en la mayoría de sus especies. Luego de la germinación y aparición de los cotiledones, con el desarrollo primario del tallo se observan los primeros pares de hojas de pequeño tamaño; con el crecimiento de la plántula surgen otras de mayores dimensiones las que son conocidas como “hojas juveniles”, que luego son suplantadas por las “hojas adultas”, en una transición abrupta o gradual, apareciendo en este caso “hojas intermedias” (Brussa, 1994). Las hojas adultas generalmente presentan disposición alterna, colgando verticalmente, pecioladas, lineales a ovadas, pero con mayor frecuencia lanceoladas. La mayoría de las veces las hojas adultas son del mismo color en ambos lados, pero muchas especies tienen hojas adultas que son decoloradas y más claras en la parte abaxial (Ritter, 2014). Las especies arbóreas dentro de este género muestran un crecimiento continuo en el cual se dificulta la definición de anillos de crecimiento en su fuste principal. Además como característica distintiva del género, el enraizamiento está muy desarrollado, donde ciertas especies tienen tan amplio su sistema radicular que acapara el agua de los horizontes superiores. Esto sumado a que las hojas se descomponen muy lentamente generando un mantillo abundante, dificulta el crecimiento de las plantas en el sotobosque (Granados-Sánchez y López, 2007).

Existen aproximadamente 600 especies dentro del género *Eucalyptus* donde las más utilizadas en Uruguay son: *Eucalyptus grandis*, *E. dunii* y *E. globulus*. Precisamente en Uruguay, el principal destino de estas especies es la

producción de madera con destino de pulpa celulósica, en su amplia mayoría, y aserrado (MGAP. DIEA, 2019).

B. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE LA LUZ

La luz generalmente se define como la radiación electromagnética que puede ser percibida por el ojo humano. Sin embargo, la luz contiene un espectro más amplio de radiación que no puede ser percibida por el ojo (Nobel, 2009). Aproximadamente un 40% de la radiación electromagnética solar que llega a la Tierra se define como radiación luminosa (Azcón-Bieto y Talón, 2008). De esta radiación luminosa aquella que alcanza la superficie terrestre se conoce como radiación directa, mientras que la radiación alterada por la atmósfera (cielo y nubes) se conoce como radiación difusa (Kume, 2019).

En términos generales se puede decir que el espectro electromagnético está constituido por ondas de distintas longitudes, como las ondas de radio y televisión y los rayos gamma (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las regiones del espectro de mayor interés en biología son la ultra-violeta (UV), la visible y la infrarroja (IR). Dentro del espectro de radiación visible (400-750 nm) la región que se encuentra entre las longitudes de onda de 400 a 700 nm se conoce como radiación fotosintéticamente activa (PAR) ya que es esta región del espectro la que es capaz de producir actividad fotosintética (Kume, 2019). La radiación UV, tiene longitudes de onda entre 10-400 nm, es decir menores a PAR. A su vez, la radiación UV se divide según Bjorn (2015) en UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) y UV-C (<280 nm). Se sabe que la radiación UV-B induce daño en el ADN (los organismos terrestres están protegidos de la radiación UV por el ozono atmosférico, Kume, 2019). Por otro lado, la radiación infrarroja (IR) tiene longitudes de onda mayores que PAR, por encima de los 750 nm hasta los 1000 nm (Nobel, 2009). El rango de longitud de onda que se encuentra inmediatamente por encima del PAR y por debajo del IR es conocido como rojo lejano y corresponde a 700-750 nm dentro del espectro (Bjorn, 2015).

Las ondas electromagnéticas son radiaciones y, por tanto, se transmiten de manera cuántica en unidades discretas. La luz, al ser una radiación electromagnética, está compuesta por dichos paquetes elementales de energía denominados fotones (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Cada fotón de luz tiene una energía propia, que corresponde a su longitud de onda específica y que puede ser calculada a partir de la ecuación de Planck, según la expresión:

$$E = h \cdot c \cdot \lambda^{-1}$$

Donde, E es la energía del fotón o partícula cuántica de radiación, h una constante (constante de Planck, de valor $h = 6.62 \times 10^{-34} \text{ J s}$) y $c \cdot \lambda^{-1}$ es la frecuencia de la radiación que corresponde a la velocidad de dicha radiación ($c = 2.99 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$), la cual es constante debido a que la velocidad de todas las radiaciones electromagnéticas es la misma, dividida la longitud de onda (λ). A partir de la ecuación de Planck se deduce que la energía de un fotón es inversamente proporcional a su longitud de onda (Campbell y Norman 1998, Azcón-Bieto y Talón 2008, Nobel 2009).

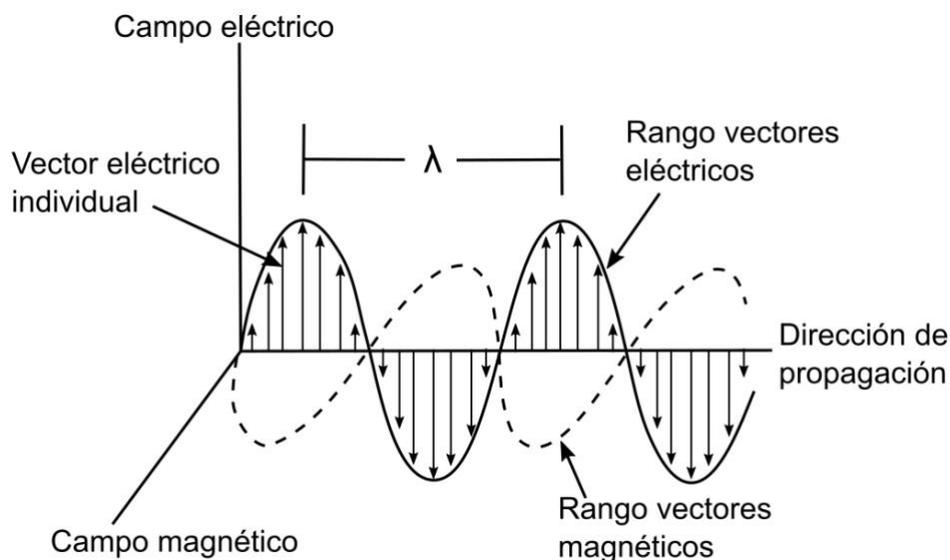


Figura 1. Representación del espectro en forma de ondas electromagnéticas

Fuente: adaptado de Nobel (2009).

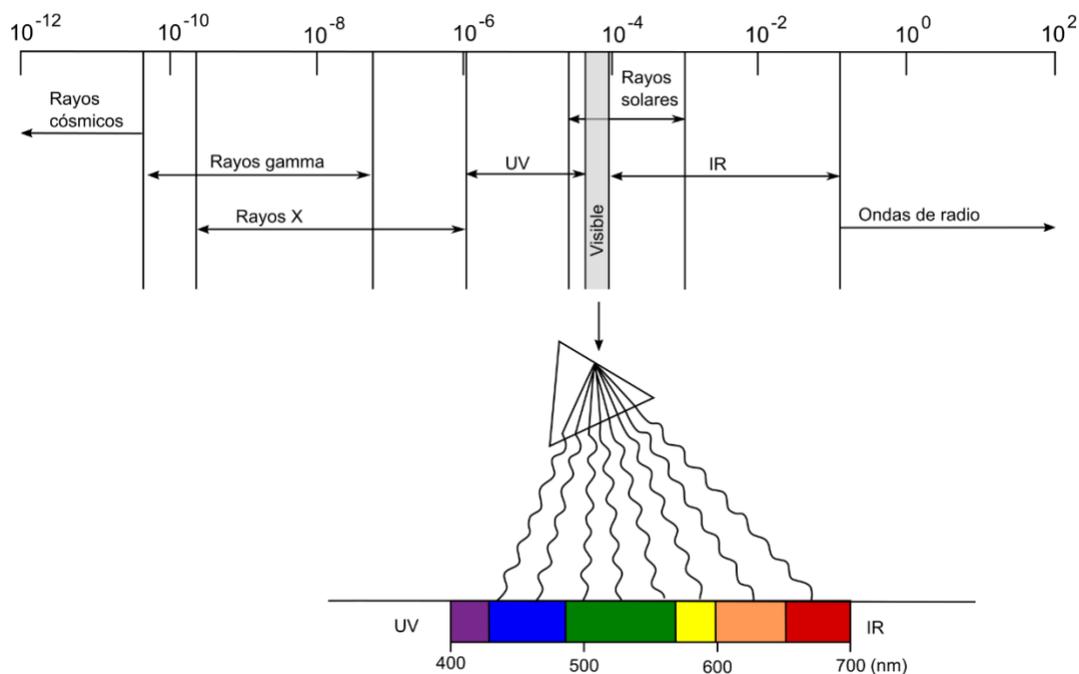


Figura 2. Representación del espectro de luz visible, diferenciado según su longitud de onda

Fuente: extraído de Azcón-Bieto y Talón (2008).

C. PERCEPCIÓN POR LAS PLANTAS DEL AMBIENTE LUMÍNICO

1. Generalidades

La luz es una fuente de información, de calor y de energía (fotosíntesis) para las plantas, y por tanto genera cambios morfológicos y fisiológicos que afectan su crecimiento y desarrollo. La intensidad de luz (flujo lumínico), la composición espectral, el ángulo incidente y el fotoperíodo son aspectos del ambiente lumínico que son percibidos y procesados por las plantas (Bustos-Salazar, 2009).

Las plantas son capaces de responder a los diferentes estímulos lumínicos y tener un monitoreo de su entorno, mediante moléculas o complejos moleculares llamados fotorreceptores, los cuales tienen la capacidad de activarse por fotones de determinadas longitudes de onda (Meisel et al., 2011). Existen distintas familias de fotorreceptores, los fitocromos son fotorreceptores de luz roja (600-700 nm) y roja lejana (700-750 nm). Por otro lado, como reconocen Azcón-

Bieto y Talón (2008), los criptocromos y las fototropinas son fotorreceptores de luz azul (400-500 nm) y UV-A (315-400 nm). En este sentido, la luz es un factor ambiental crítico para el crecimiento y desarrollo de las plantas, los niveles de intensidad lumínica (densidad de flujo de fotones, PPF) así como las longitudes de onda que definen la calidad espectral de la luz, afectan directamente los procesos de conversión de energía en las células vegetales (Nobel 2009, Quero et al. 2018).

2. Percepción por fitocromos

El crecimiento y desarrollo de las plantas está influenciado de manera reversible por la relación existente en el ambiente lumínico entre la proporción de luz roja (600-700 nm) respecto de la luz roja lejano (700-750 nm). La relación rojo/rojo lejano puede variar con los niveles de flujo lumínico de radiación incidente y/o dentro del ambiente lumínico que se genera en la canopia (Meisel et al., 2011). En las hojas que están expuestas a la luz directa la relación rojo/rojo lejano que perciben los fitocromos es alta. Sin embargo, las hojas que están en los estratos inferiores de la canopia perciben un ambiente lumínico en el cual la relación rojo/rojo lejano es mas baja debido a que la luz es interceptada por la parte superior de la canopia. Esta misma situación se da en los ambientes de bajo flujo lumínico o de sombra. Por otro lado, durante el día estas proporciones varían permitiendo a las plantas adecuar su crecimiento y funcionamiento fotosintético (Bustos-Salazar, 2009).

Entre los parámetros morfológicos de las plantas, que experimentan variación ante cambios en la relación rojo/rojo lejano del ambiente lumínico se puede mencionar, cambios en el área foliar específica, incremento en largos de entrenudo, incremento del ángulo de las hojas, número de capas de parénquima empalizada (Bustos-Salazar, 2009).

En el caso particular de las especies arbóreas, existen hojas que pueden adecuar su forma según el ambiente lumínico en el cual se desarrollan. Es así que se pueden diferenciar hojas de sol y hojas de sombra dentro de un mismo individuo (Bustos-Salazar, 2009). Las hojas desarrolladas en ambientes de bajo flujo lumínico son generalmente más delgadas, con menos tejido conductor, de mayor tamaño, con más cantidad de espacios intercelulares, una baja relación parénquima en empalizada/parénquima esponjoso, y un menor número de estomas por unidad de superficie. Estas adaptaciones le permiten a este tipo de hojas un mayor aprovechamiento de la luz difusa.

Además de estos cambios morfológicos las hojas desarrolladas a la sombra muestran un aumento en la concentración de pigmentos. Las hojas

desarrolladas en ambientes de alto flujo lumínico son generalmente hojas más pequeñas, más gruesas y coriáceas, presentando una mayor cantidad de tejido conductor y un mayor número de estomas por unidad de superficie (Bustos-Salazar 2009, Kume 2017).

3. Captación de energía por pigmentos

La luz es la fuente de energía que impulsa el proceso de fotosíntesis. En las plantas vasculares el proceso de fotosíntesis se da en las hojas, particularmente dentro de los cloroplastos. En dichos organelos la unidad fotosensible es el fotosistema (PS), capaz de absorber la energía de la luz, transmitirla y convertirla en energía química (estable y acumulable). El fotosistema está constituido por un centro de reacción (RC), en donde se canaliza la energía de excitación, y por un complejo antena (LHC) que es el encargado de absorber los fotones de la luz incidente y de transmitir esta energía hacia el centro de reacción (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Tanto el RC como el LHC poseen pigmentos, clorofilas (Chl. a, Chl. b) o carotenoides, que absorben parte de la radiación lumínica incidente (Kume et al., 2016). Los espectros de absorción de luz por parte de estos pigmentos y su distribución dentro de la hoja determinan la proporción de luz incidente que efectivamente es absorbida. Esto a su vez se vincula con la forma y la estructura anatómica de la hoja (Kume, 2019).

Las longitudes de onda mayores a los 700 nm o menores a los 400 nm rara vez son absorbidas por las clorofilas, y por tanto no pueden usarse para la fotosíntesis. Por otra parte, las clorofilas no absorben los fotones de manera uniforme a través de todo el espectro PAR (Kume et al., 2016). Las hojas absorben perfectamente las longitudes de onda correspondientes a los intervalos de la luz azul (400-450 nm) y luz roja (600-700 nm) de dicho espectro, mientras que el intervalo definido para la luz verde (500-550 nm) se absorbe menos. Aproximadamente la mitad de esa radiación no absorbida se refleja, lo que lleva a la apariencia verde de las hojas (Kume, 2017). No obstante, existen estudios de espectro de absorbancia donde se ha demostrado que las plantas terrestres absorben una fracción sustancial de luz verde. Mientras que la luz roja o azul es absorbida preferentemente por los cloroplastos en la parte superior de la hoja, cuando la densidad de flujo de fotones es alta, la energía de estas longitudes de onda tiende a ser disipada en forma de calor por los cloroplastos superiores y la luz verde es la que impulsa la fotosíntesis en los cloroplastos inferiores que no están saturados de luz (Terashima et al., 2009).

D. FOTOSÍNTESIS

1. Generalidades en plantas

La fotosíntesis es un proceso biológico mediante el cual la energía del sol es capturada y almacenada por una serie de eventos que convierten la energía pura de la luz en la energía libre necesaria para la vida. Este proceso proporciona todo el alimento y la mayoría de los recursos energéticos. Se podría definir entonces a la fotosíntesis como el proceso en el que un organismo captura y almacena la energía de la luz, la cual se utiliza para impulsar todos aquellos procesos celulares que requieren de esta energía (Blankenship, 2014). En plantas, algas y en algunos tipos de bacterias fotosintéticas este proceso conlleva la liberación de oxígeno molecular y la utilización de dióxido de carbono atmosférico para la síntesis de compuestos orgánicos. A este proceso se le denomina fotosíntesis oxigénica (Pérez-Urria, 2009).

La fotosíntesis se divide en cuatro fases, una primera fase de absorción de luz y energía mediante el LHC, que a su vez se define como proceso fotofísico. Una segunda fase, llamada fase de transferencia primaria de electrones a los RC, que junto con una tercera fase, en la cual se produce la estabilización de la energía por procesos secundarios, conforman el proceso fotoquímico. Y por último, una fase de síntesis y exportación de productos estables que se engloba bajo el nombre de proceso bioquímico (Blankenship, 2014).

2. Proceso fotofísico

La fotosíntesis comienza con la absorción de fotones. Durante esta fase de absorción de luz y energía mediante LHC no se realiza ningún proceso químico. En esta etapa se produce la transferencia de energía que involucra la migración de electrones en estado excitado de una molécula a la otra. Se trata de un proceso puramente fotofísico que depende de un acoplamiento energético de los pigmentos del LHC. Además, estos sistemas de antena generalmente incorporan un mecanismo en el que los pigmentos que se encuentran en la periferia del LHC absorben en longitudes de onda menores y, por lo tanto, energías de excitación mayores que las del RC. Por lo que, la energía de excitación se transfiere de los pigmentos de mayor a los de menor energía, es decir desde la periferia del LHC hacia el RC (Blankenship, 2014).

3. Proceso fotoquímico

Para que la energía absorbida por el LHC pueda ser utilizada en el proceso fotosintético debe ser almacenada. Esto sucede durante el proceso fotoquímico de la fotosíntesis, que como se mencionó anteriormente abarca las fases de transferencia primaria de electrones hacia los RC, y la estabilización de esta energía por procesos secundarios (Blankenship, 2014). El almacenamiento de energía tiene lugar cuando conjuntamente con la transferencia de electrones (e^-) se produce un movimiento de protones (H^+) a través de la membrana tilacoidal. Este movimiento de protones genera como resultado una diferencia en el gradiente electroquímico entre ambos lados de la membrana. Este gradiente se conoce como fuerza protón motriz y es usada en síntesis de ATP (Buchanan et al., 2015).

Las membranas tilacoidales contienen complejos proteicos que interactúan entre sí facilitando el transporte de electrones a través de dicha membrana. Los complejos proteicos incluidos en la membrana del tilacoide son: fotosistemas II y I (PSII y PSI), citocromo b_6f y ATP_sintasa (Azcón-Bieto y Talón 2008, Buchanan et al. 2015).

Los LHCs de los PSII y PSI absorben diferentes longitudes de onda de excitación (680 y 700 nm respectivamente). La energía transferida por los LHCs de cada fotosistema genera la pérdida de un e^- por cada uno de los centros de reacción. En el caso del PSII el e^- transferido por su RC, es transportado vía quinonas y citocromos al PSI donde se da una segunda transferencia de electrones a partir de la absorción de luz, que eventualmente termina en la reducción de un aceptor de electrones intermediario como el $NADP^+$ para formar $NADPH_2$ mediante la acción de la enzima ferredoxina-NADP reductasa (Blankenship 2014, Buchanan et al. 2015). El e^- transferido por el RCII es reemplazado por un e^- proveniente de la electrólisis del agua, con la producción simultánea de oxígeno libre y protones (Kume, 2019).

Los productos del proceso fotoquímico de la fotosíntesis son ATP y NADPH, ambos son compuestos de alta energía y se los define como de estabilidad intermedia ya que no son adecuados para el almacenamiento a largo plazo, como puede ser el almacenamiento en la semilla o fruto. Por esto es necesario convertir esta energía en una forma más estable, por ejemplo azúcares por medio de la fijación de CO_2 (Blankenship, 2014).

4. Proceso bioquímico

El proceso bioquímico de la fotosíntesis consiste en una vía enzimática de varios pasos que convierte al CO_2 y al agua en carbohidratos. Este ciclo de reducción del carbono se conoce como ciclo de Calvin-Benson y a diferencia de los procesos fotoquímicos se da en el estroma del cloroplasto. El ciclo de Calvin-Benson consiste en 13 pasos divididos dentro de 3 fases: carboxilación, reducción y regeneración. En plantas C_3 , la fijación de CO_2 es catalizada por 13 enzimas, siendo la ribulosa -1, 5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) la primera de ellas involucrada en la fijación de CO_2 a carbohidratos. La enzima rubisco es la proteína soluble mas abundante en el cloroplasto (Buchanan et al., 2015).

La primera fase del ciclo de Calvin-Benson es la de carboxilación, en la cual se producen dos compuestos de tres carbonos, 3-fosfoglicerato (3PGA) por cada molécula de CO_2 fijada mediante la carboxilación de RuBP (por acción de la enzima rubisco). A continuación se da la fase de reducción donde la molécula 3PGA es convertida en gliceraldehído-3-fosfato (GAP), en esta fase se consume ATP y NADPH (generados durante el proceso fotoquímico). La última y mas grande cadena de reacciones regenera la RuBP, en este proceso se consume una molécula de ATP adicional en la conversión de la ribulosa 5-fosfato a RuBP (Azcón-Bieto y Talón 2008, Buchanan et al. 2015).

5. Fotoinhibición

Como se mencionó en los párrafos anteriores las plantas utilizan la energía lumínica para impulsar los procesos fotosintéticos. Sin embargo, el exceso de energía absorbida puede ser perjudicial para estos organismos. Específicamente, a nivel de los fotosistemas el daño por exceso de luz se conoce como fotoinhibición y disminuye la actividad de todo el proceso de fotosíntesis. Cuando la fotoinhibición es muy severa puede causar una disminución del crecimiento e incluso la muerte de la planta (Zavafer et al. 2015, Kume et al. 2016).

Las plantas presentan diferentes mecanismos para contrarrestar las consecuencias negativas del exceso de energía. Estos mecanismos pueden ser adaptaciones morfológicas como movimientos de los cloroplastos, o adaptaciones bioquímicas, como la activación del ciclo de las xantofilas o ciclo VAZ (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las características espectrales de la radiación solar incidente tienen un efecto biofísico significativo en la adaptación de los cloroplastos y la estructura de la hoja para prevenir el exceso de absorción de energía (Kume, 2017).

A nivel de cloroplastos existen mecanismos para controlar la absorción de luz a través de su desplazamiento y deformación. Estos movimientos son muy importantes en condiciones de alta intensidad, donde se busca evitar la fotoinhibición. En ambientes lumínicos de alta irradiancia se desarrollan cloroplastos con baja concentración de clorofila y tilacoides poco desarrollados (Kume, 2017).

A nivel de los fotosistemas, el PSII es más susceptible al fotodaño que el PSI. Esto se debe a que el PSII realiza un mayor trabajo energético ya que tiene que ser capaz de oxidar el agua y reducir una feofitina (primer intermediario portador de electrones). Por lo tanto, el PSII posee varios mecanismos de desacoplamiento y desactivación para una eficiente disipación de energía que minimizan el posible fotodaño. Sumado a estos mecanismos de fotoprotección el PSII cuenta con sistemas de reparación, que cuando fallan o no son suficientes para resistir la intensidad de la energía lumínica incidente, la planta es expuesta al proceso de fotoinhibición. Cuando la tasa de fotodaño supera la tasa de reparación se habla de fotoinhibición neta (Azcón-Bieto y Talón, 2008). La fotoinhibición neta es directamente proporcional a la intensidad de luz y se ha demostrado que está asociada en gran medida con la radiación PAR (Takashi et al. 2010, Zavafer et al. 2015).

Dentro del PSII es el RC el que tiene mayores posibilidades de sufrir procesos fotoinhibitorios. Durante estos procesos la proteína D1, componente estructural clave del RC del PSII, es expuesta a una enzima proteasa que la desacopla del RC. La proteína D1, actúa como fusible y a pesar de constituir solo el 1% del contenido de proteína del cloroplasto tiene una tasa de renovación similar a la de Rubisco que constituye aproximadamente el 50% de la proteína total del mismo (Pallardy, 2008).

Por otra parte, los pigmentos denominados carotenoides, cumplen una función muy importante en la protección de los fotosistemas regulando mecanismos de disipación de energía. Aquellos carotenoides que poseen un grupo oxigenado en su estructura se conocen como xantófilas mientras que aquellos que carecen del mismo, son denominados carotenos. El ciclo de las xantófilas, modula el mecanismo de disipación térmica de la energía captada por la clorofila que no es utilizada en el proceso de fotosíntesis. El ciclo de las xantófilas consiste en la conversión del pigmento violaxantina (V) a zeaxantina (Z), pasando por el intermediario anteroxantina. Cuando el pH en el lumen del tilacoide es bajo, debido a la transferencia de electrones, la Z se une junto con un H^+ al LHCII, causando cambios en su estructura, esto lleva a la captura de energía y su posterior disipación en forma de calor. Cuando el exceso de energía desaparece el proceso se revierte (Ort 2001, Koldobika et al. 2005, Allorent et al. 2018).

Los procesos fotoinhibitorios que ocurren en el PSII pueden ser medidos a través de la emisión de fluorescencia por parte de las clorofilas que conforman el LHCII. A partir de estos parámetros se puede inferir el destino de la energía que llega al PSII, distinguiendo así mecanismos de fotoinhibición de aquellos de fotoprotección (Quero et al., 2020).

E. FLUORESCENCIA DE LAS CLOROFILAS

1. Generalidades

En la etapa fotoquímica de la fotosíntesis, el destino de la energía incidente se puede estudiar a partir de la emisión de fluorescencia de clorofilas en el PSII (Quero et al., 2018). Una vez que la energía de la luz es absorbida por los fotosistemas esta puede ser transferida como energía de excitación para el proceso fotoquímico, disipada en forma de calor o reemitida en forma de fluorescencia. Esta distribución de la energía en los tres procesos ocurre simultáneamente, de forma tal que el incremento en la eficiencia de uno de ellos, resultará en la disminución de los otros dos. Es por esto que a través de la medición de la fluorescencia de la clorofila se puede conocer la partición de energía que llega al PSII (González et al. 2008, Quero et al. 2018).

2. Técnica de medición

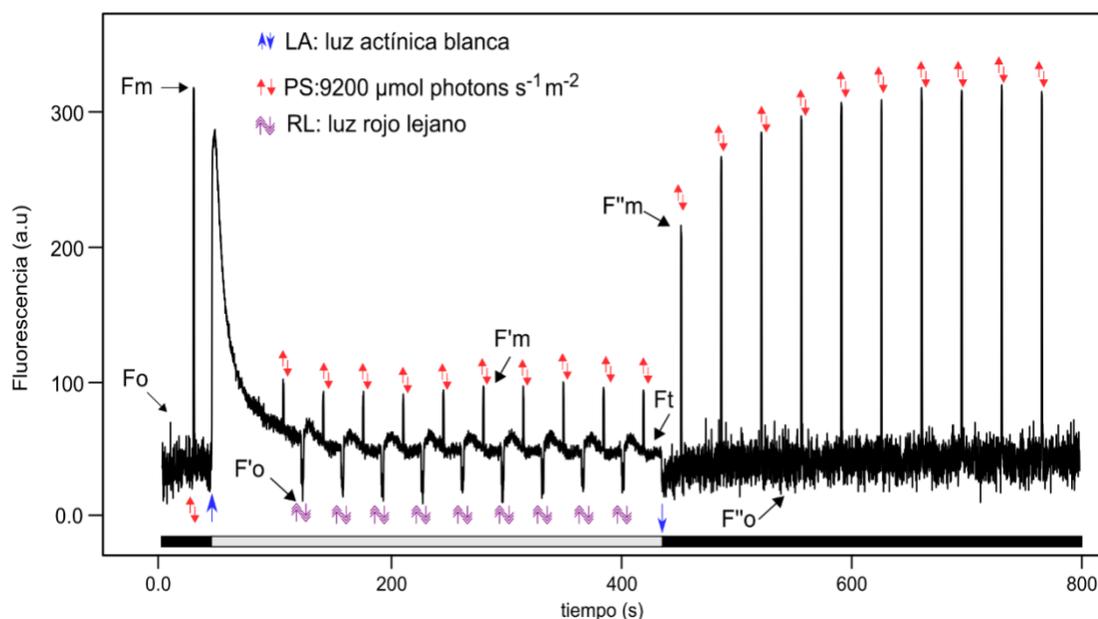
La emisión de clorofila se puede determinar usando la técnica de pulso de amplitud modulada (PAM). La técnica PAM mide la extinción de la energía durante la desexcitación de las clorofilas de PSII, tanto en la oscuridad como en la luz, de forma simple y no destructiva. Este método permite la medición de distintas intensidades de fluorescencia y además genera una firma donde se distinguen diferentes valores de puntos específicos (Quero et al., 2018).

Esta técnica está compuesta por dos tipos de análisis, un primer análisis denominado de extinción o “quenching” y un segundo conocido como de relajación. Previamente al análisis de extinción se aclimatan las plantas a la oscuridad y se definen varios puntos, el primero es la la intensidad de fluorescencia bajo estas condiciones de oscuridad y se conoce como F_0 , su valor refleja la fluorescencia basal (Baker 2008, Kasajima et al. 2009). Una vez alcanzada la fluorescencia basal se prosigue a aplicar un pulso de luz saturante que define el punto F_m , como de fluorescencia máxima. Bajo luz actínica, se da un aumento en la desexcitación no fotoquímica que se conoce como “quenching no fotoquímico”. Además, el PSII cambia de un estado de apertura a uno parcialmente cerrado lo que significa que algunos de los RC de PSII no pueden utilizar energía de excitación (Baker 2008, Kasajima et al. 2009).

Comenzando con el análisis de extinción, se aplican picos de luz actínica saturante y se obtienen valores de fluorescencia máxima relativa que se identifican como F'_m y reflejan el valor de fluorescencia máxima en cada pico de luz saturante. Por su parte, F'_o refleja el valor de fluorescencia inmediatamente después de que se apaga la luz actínica, mientras que F_t define la fluorescencia en estados adaptados a la luz para el tiempo t (Baker 2008, Kasajima et al. 2009).

Por otro lado, el análisis de relajación consiste en apagar la luz actínica y aplicar nuevos ciclos de luz saturante. En este caso se obtienen nuevas medidas de fluorescencia máxima y se identifican como F''_m , mientras que los mínimos se registran como F''_o (Baker 2008, Kasajima et al. 2009).

En resumen, la metodología antes descrita que se conoce como pulso de saturación, puede usarse para estimar el rendimiento cuántico del PSII en una hoja adaptada a la luz (análisis de extinción) o durante el proceso de relajación del PSII que ocurre en la oscuridad después de un período de luz (análisis de relajación, Quero et al., 2018).



La barra de la parte inferior indica si la luz actínica se encuentra apagada (barra negra) o encendida (barra gris). La barra gris se corresponde con el análisis de quenching y la segunda

barra negra con el análisis de relajación. Flechas hacia arriba y abajo indican encendido y apagado de luz actínica (AL), pulsos saturantes (SP) y rojo lejano (FR).

Figura 3. Ejemplo de firma de fluorescencia para análisis de quenching y de relajación con fluorómetro PAM

Fuente: adaptado de Quero et al. (2018).

3. Partición de la energía en el PSII

El análisis de partición de energía revela el destino de la luz incidente al PSII diferenciando los procesos fotoquímicos de los procesos de fotoprotección y fotoinhibición (Zivcak et al. 2015, 2018). El estudio de la fluorescencia de clorofilas permite cuantificar dichos procesos. La estrategia de combinar un análisis de extinción de fluorescencia con un análisis de relajación posterior define nueve parámetros de partición de energía.

A partir del análisis de extinción se pueden determinar los rendimientos cuánticos del PSII (Φ_{PSII}), de la disipación de energía no basal (Φ_{NPQ}) y de la disipación de energía basal (Φ_{NO}). El Φ_{PSII} está directamente relacionado con la tasa de transferencia de electrones hacia los procesos bioquímicos. El Φ_{PSII} queda definido por el rendimiento cuántico debido a la proporción de centros abiertos del PSII (Φ_{qp} , Maxwell y Johnson 2000, Lazár 2015) y por el rendimiento potencial de dichos centros de reacción (Φ_{qs} , Demming- Adams et al. 1996, Kato et al. 2003). El Φ_{NPQ} refleja el rendimiento cuántico de la extinción no fotoquímica asociado a procesos no constitutivos; y Φ_{NO} refleja el rendimiento cuántico de los procesos de disipación no fotoquímicos constitutivos o basales (Quero et al., 2018). El Φ_{NO} queda definido por la energía disipada en forma de calor por los centros inactivos del PSII ($\Phi_{NO, basal}$, Hikosaka, 2004) y por la disipación térmica basal del PSII adaptado a la luz ($\Phi_{NO, PSII}$).

Por otro lado, el análisis de relajación permite que el parámetro Φ_{NPQ} sea descompuesto en dos parámetros: el rendimiento cuántico no fotoquímico de relajación rápida ($\Phi_{NPQfast}$) y el rendimiento cuántico no fotoquímico de relajación lenta ($\Phi_{NPQslow}$). El $\Phi_{NPQfast}$ está relacionado con la disipación de energía regulada en el PSII, mientras que $\Phi_{NPQslow}$ está relacionado con el daño del PSII causado por fotoinhibición (Kasajima et al. 2009, Quero et al. 2018).

Un aspecto muy importante a tener en cuenta en el estudio de la partición de energía mediante la cuantificación del rendimiento cuántico, es que la suma de los rendimientos es igual a 1, esto permite comparar de manera directa el destino de la energía que llega al PSII (Quero et al., 2018).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

El ensayo se instaló el 28 de octubre de 2020 con 24 plantas con 2 meses de edad, generadas mediante esquejes, de dos diferentes clones de *Eucalyptus grandis* (HHK1C3 y HHK2C5). Estas fueron aleatoriamente distribuidas en la disposición que se observa en la figura 4. El ensayo se realizó en el invernáculo y en la cámara de crecimiento del departamento de biología vegetal de Facultad de Agronomía donde se utilizaron 12 plantas por clon, brindadas por la empresa forestal Lumin. Las plantas se colocaron en macetas creadas a partir de tubos (15 L de capacidad) con una rejilla en su base para filtrar el agua de riego. El sustrato en este caso consta de una mezcla de arena y tierra en una proporción de 1:1.

El riego se realizó con una frecuencia de 3 a 4 veces a la semana para mantener condiciones hídricas óptimas. Pasados aproximadamente 20 días (17 de noviembre del 2020) se comienzan las mediciones de los parámetros fotosintéticos, para ese entonces los plantines promediaban una edad de 3 meses con una altura de 35 cm promedio.

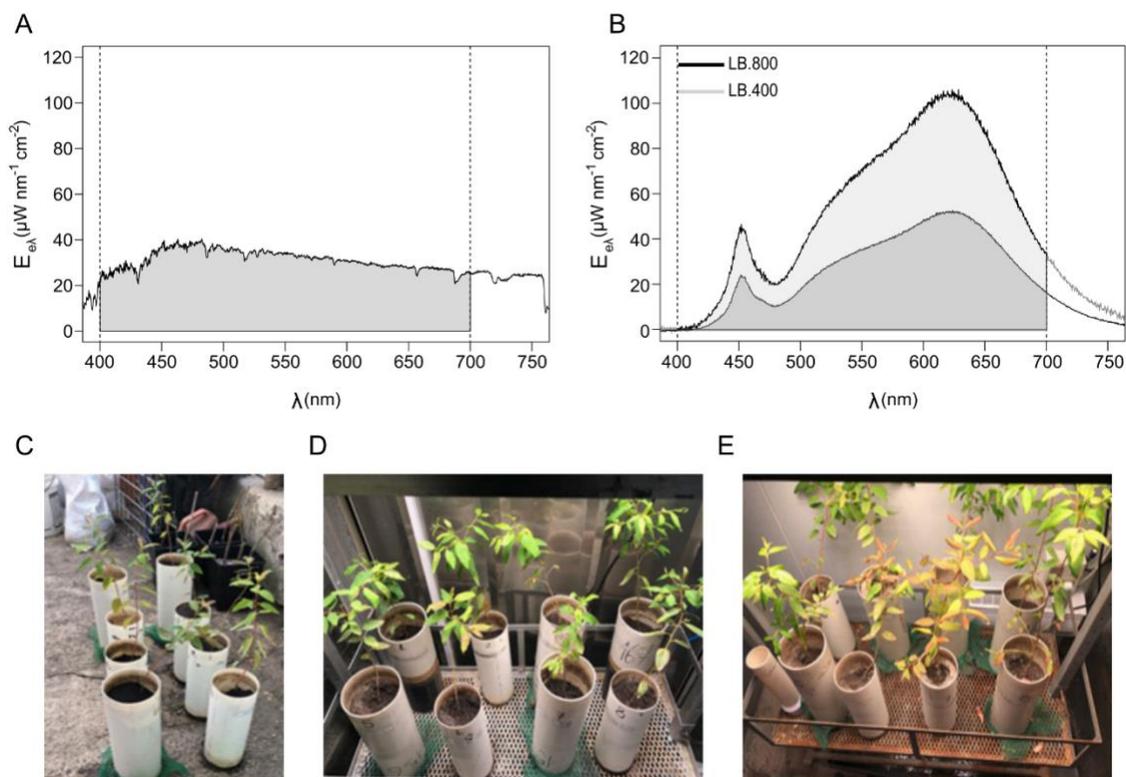
Las plantas se crecieron en un ambiente con 25 °C, 50-60% de HR y un ciclo 12/12 horas de oscuridad/luz.

B. TRATAMIENTO DE LUZ

Se establecieron tres ambientes lumínicos diferentes, el ambiente 1 (invernáculo) está definido por la luz natural del invernáculo. El ambiente 2 (LB.400) está definido por la calidad espectral entre 400-700 nm con el mismo flujo lumínico del invernáculo ($400 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Y el ambiente 3 (LB. 800), definido por la misma calidad espectral que los ambientes 1 y 2 pero con un flujo lumínico de $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los ambientes lumínicos LB. 400 y LB. 800 se generaron en las cámaras de crecimiento cuyo sistema de iluminación está basado en lámparas de fuente LED.

Todas las plantas crecieron en condiciones de invernáculo durante tres meses, luego de ese período las plantas (de los ambientes LB. 400 y LB. 800) fueron trasladadas a los diferentes ambientes lumínicos en los cuales se desarrolló la hoja donde se realizaron las mediciones de partición de energía.

El espectro y la intensidad de los diferentes tratamientos de luz se midieron utilizando un espectrorradiómetro (espectrómetro USB2000 +, Ocean optics, Duiven, Países Bajos) que se calibró frente a una fuente de luz estándar suministrada por el equipo. El sensor del espectrorradiómetro se ubicó donde estaba la hoja más cercana a los 30 cm del centro de la fuente de luz.



A) Flujo de energía espectral del ambiente invernáculo. B) Flujo de energía espectral de los ambientes lumínicos LB. 800 y LB. 400 emitidos por un sistema de luz, basado en una fuente de luces LED. C) Distribución de los clones HHK1C3 y HHK2C5 en el invernáculo. D) y E) Distribución de los clones en cámaras de crecimiento.

Figura 4. Ambiente lumínico: densidad de flujo de fotones y calidad espectral. Y fotos de la distribución de los plantines en invernáculo y cámaras de crecimiento

C. PÁRAMETROS DE RENDIMIENTO CUÁNTICO

Para cuantificar la partición de energía en el PSII a través de los parámetros de rendimiento cuántico, se utilizó un fluorómetro de pulso de amplitud modulada (FMS1, Hansatech, King's Lynn, UK). Para la estimación de los parámetros se definieron cuatro niveles de luz actínica para la excitación del PSII: 200, 400, 850 y 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Los parámetros de rendimiento cuántico se definieron de la siguiente manera:

$$\phi_{PSII} = \frac{F_m' - F_t}{F_m'} = \underbrace{\left(\frac{F_m' - F_t}{F_m' - F_0'} \right)}_{q_p} \underbrace{\left(\frac{F_m' - F_0'}{F_m'} \right)}_{q_s}$$

$$\phi_{NO} = \frac{F_t}{F_m} = \frac{F_t - F_0' + F_0'}{F_m} = \underbrace{\frac{F_t - F_0'}{F_m}}_{\phi_{NOpsII}} + \underbrace{\frac{F_0'}{F_m}}_{\phi_{NObasal}}$$

$$\begin{aligned} \phi_{NPQ} &= \frac{F_t}{F_m'} \left(\frac{F_m - F_m'}{F_m} \right) = F_t \left(\frac{F_m}{F_m' F_m} - \frac{F_m'}{F_m' F_m} \right) = F_t \left(\frac{1}{F_m'} - \frac{1}{F_m} \right) \\ &= F_t \left(\frac{1}{F_m'} - \underbrace{\frac{1}{F_m''} + \frac{1}{F_m''}}_{=0} - \frac{1}{F_m} \right) = F_t \underbrace{\left(\frac{1}{F_m'} - \frac{1}{F_m''} \right)}_{\phi_{NPQfast}} + F_t \underbrace{\left(\frac{1}{F_m''} - \frac{1}{F_m} \right)}_{\phi_{NPQslow}} = \phi_{NPQfast} + \phi_{NPQslow} \end{aligned}$$

Las mediciones se realizaron en hojas completamente expandidas desarrolladas en el ambiente de crecimiento dentro del cual se realizó la medición. Cada hoja fue evaluada en los cuatro niveles de luz actínica. La fluorescencia fue medida en las mismas condiciones en las que se desarrollaron las plantas sin período de adaptación a oscuridad. Las hojas seleccionadas se encontraban en buen estado sanitario y sin síntomas de ataque de posibles patógenos.

D. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El experimento fue instalado bajo un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento. El tratamiento queda definido por la interacción entre los niveles del factor genotipo (HHK1C3 y HHK2C5), los niveles del factor ambiente lumínico (invernáculo, LB. 400 y LB. 800) y los niveles de luz actínica (200, 400, 850 y 1700 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Para el análisis estadístico se usó un modelo lineal general con arreglo factorial. Luego de la verificación de los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk test) y homogeneidad de varianza (Levene test) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para establecer si hubo efecto significativo de alguno de los factores

(anexo 2). El análisis estadístico se realizó con el software libre R (R Core Team, 2017).

El modelo lineal general fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + AL_i + LA_j + G_k + (AL * LA)_{ij} + (AL * G)_{ik} + (LA * G)_{jk} + (AL * LA * G)_{ijk} + error_{ijk}$$

Donde,

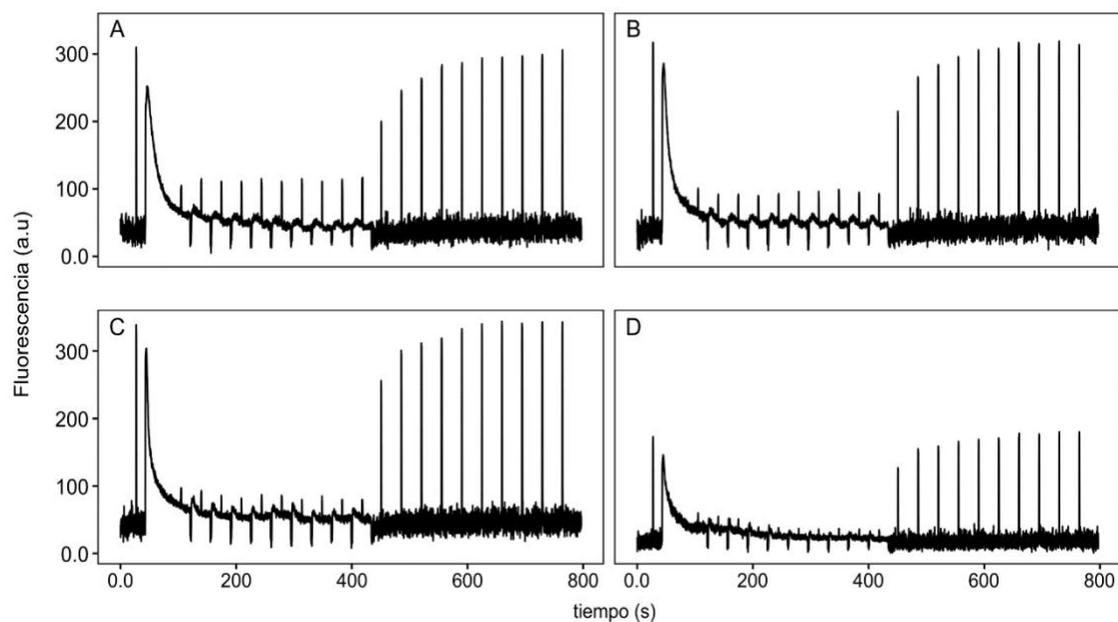
AL_i es el efecto del i-ésimo ambiente lumínico (invernáculo, intensidad media e intensidad alta). LA_j es el efecto del j-ésimo nivel de actínica (200, 403, 850 y 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$). G_k es el efecto del k-ésimo nivel de genotipo (HHK1C3, HHK2C5, $AL * LA$)_{ij} es la interacción entre el i-ésimo nivel de AL y el j-ésimo nivel de LA ($AL * G$)_{ik} es la interacción entre el i-ésimo nivel de AL y el k-ésimo nivel de G ($LA * G$)_{jk} es la interacción entre el j-ésimo nivel de LA y el k-ésimo nivel de G ($AL * LA * G$)_{ijk} es la interacción entre el i-ésimo nivel de AL, el j-ésimo nivel de LA y el k-ésimo nivel de G $error_{ijk}$ es el error asociado a cada unidad experimental.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. DESCRIPCIÓN DE LAS FIRMAS DE FLUORESCENCIA EN FUNCIÓN DE LA ENERGÍA DE EXCITACIÓN

A continuación se presentan los resultados de las firmas de fluorescencia para los cuatro niveles de luz actínica utilizados para la excitación del PSII (figura 5). Como se observa en la figura 5, cuando aumenta la intensidad de la energía de excitación a un valor de $1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, el valor de F_m disminuye respecto al valor obtenido con las otras energías de excitación (200 , 400 y $850 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Además, en la figura 5 se puede observar que a medida que la energía de excitación aumenta, la energía que se destina a la fase fotoquímica es cada vez menor. Esto, se observa porque a medida que aumenta la intensidad de la luz actínica la diferencia entre F'_m y F_t disminuye. La disminución de la energía destinada a los procesos fotoquímicos a medida que aumenta la energía de excitación del PSII, es el comportamiento esperado para el funcionamiento del aparato fotosintético (Kasajima et al., 2009). Particularmente en el caso de *Eucalyptus* esto fue reportado por Nión (2018) en donde se describe este mismo comportamiento frente a diferentes intensidades de luz de excitación (255 , 778 y $2800 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Este trabajo junto con el de Nión (2018) son los primeros reportes sobre el comportamiento de la partición de energía, en función del incremento de la luz de excitación del PSII en *Eucalyptus*.

Es importante destacar que las hojas desarrolladas en el ambiente LB. 800 cuando fueron excitadas con una luz actínica de $1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, presentaron un nivel de daño en el PSII que no permitió su inclusión en los análisis. En todas las hojas evaluadas bajo estas condiciones se observaron firmas de fluorescencia que no se corresponden con el trazo normal de respuesta (anexo 1).



A) Actínica $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ B) Actínica $400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ C) Actínica $850 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ D) Actínica $1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 5. Firmas de fluorescencia para análisis de quenching y de relajación en cuatro niveles de luz actínica

B. CORRELACIONES ENTRE LOS PARÁMETROS DE PARTICIÓN DE ENERGÍA

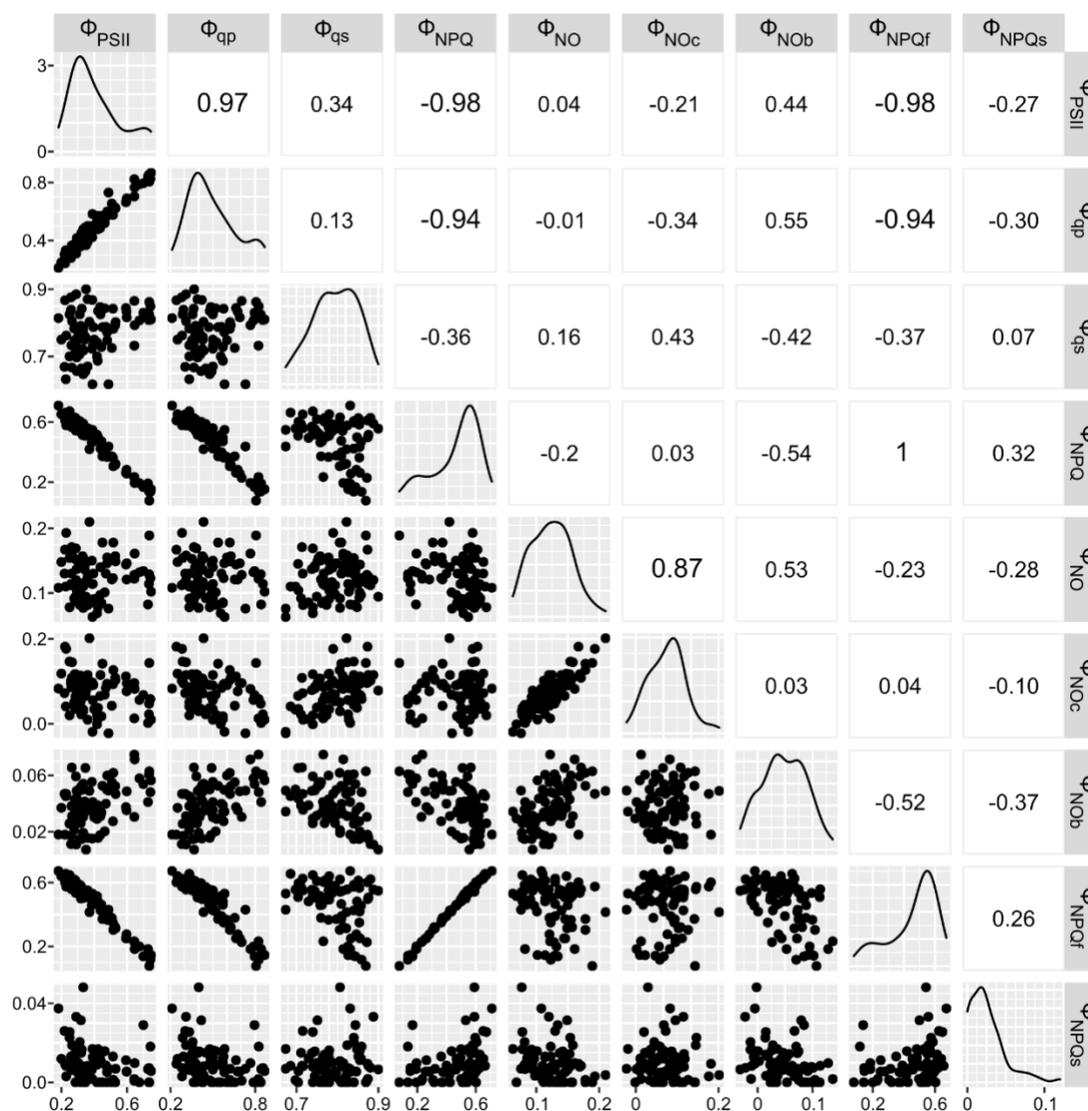


Fig 6. Correlaciones entre los parámetros y subparámetros de partición de energía del PSII

En la figura 6 se muestran las correlaciones existentes entre los parámetros de partición de energía obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia. Las fórmulas para obtener los parámetros de partición de energía se pueden ver en la sección III. C.

Cuando se analizaron los parámetros de partición de energía principales (Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} y Φ_{NO}) se observó que existe una correlación negativa ($R^2 = -0,98$) entre el Φ_{PSII} y el Φ_{NPQ} , esto significa que a menores valores de rendimiento cuántico del PSII hay mayores valores de disipación no basal de energía. Esto coincide con lo reportado por Nión (2018) para una luz actínica de $778 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ donde se observó que frente a una mayor intensidad de energía de excitación los valores para el parámetro de disipación no basal de energía (Φ_{NPQ}) se incrementaron de manera significativa, mientras que el porcentaje de energía destinada a los procesos fotoquímicos disminuyó un 50%.

Según los resultados obtenidos la disipación basal de energía no está correlacionada ni con el proceso fotoquímico (Φ_{PSII} vs Φ_{NO} , muestran un $R^2 = 0,04$) ni con los procesos disipatorios no basales (Φ_{NPQ} vs Φ_{NO} , muestran un $R^2 = -0,2$).

Del gráfico se desprende que el parámetro Φ_{PSII} tiene una alta correlación positiva con el subparámetro Φ_{qp} ($R^2 = 0,97$) y no así con Φ_{qs} . Esta correlación significa que el rendimiento cuántico del PSII está determinado por el grado de apertura del centro de reacción, representado por el Φ_{qp} . Es decir, a medida que el centro de reacción se encuentre más abierto, el rendimiento cuántico será mayor, por el contrario si el centro de reacción se cierra el rendimiento cuántico disminuye. Es importante notar que el Φ_{PSII} no depende del rendimiento potencial del fotosistema representado por el Φ_{qs} .

Cuando se analizan los rendimientos cuánticos de los procesos disipatorios no basales se observa que existe una alta correlación positiva entre el parámetro Φ_{NPQ} y el subparámetro $\Phi_{NPQFast}$ ($R^2 = 1$), no así entre Φ_{NPQ} y $\Phi_{NPQSlow}$ ($R^2 = 0,32$). Tampoco se observó una correlación significativa entre $\Phi_{NPQFast}$ y $\Phi_{NPQSlow}$ ($R^2 = 0,26$). A partir de estos resultados, se puede inferir que el $\Phi_{NPQSlow}$ no contribuye a los procesos disipatorios, es decir la energía excedente en el PSII (energía no usada en el proceso fotoquímico) se disipa casi exclusivamente de manera regulada, no observándose daño por fotoinhibición para los genotipos y ambientes presentados. Según lo observado por Kasajima et al. (2009), en *Arabidopsis thaliana*, los rendimientos cuánticos de ambos componentes de la excitación no fotoquímica ($\Phi_{NPQFast}$ y $\Phi_{NPQSlow}$) aumentan a medida que se incrementa la intensidad de la luz incidente. Por otra parte, Kasajima et al. (2009) observaron que a $1500 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ el $\Phi_{NPQFast}$ fue la vía predominante para la disipación térmica es decir que en *Arabidopsis thaliana* sometida a altos niveles de intensidad lumínica de excitación, la disipación de energía se da de manera regulada, al igual que en la mayoría de los plantines de *E. grandis* evaluados en este trabajo en todos los niveles de

excitación. Este resultado permite visualizar la relevancia de los mecanismos de fotoprotección en las hojas de los plantines de Eucalyptus.

Este mecanismo de fotoprotección depende en cierta medida del ambiente lumínico de desarrollo. En ambientes lumínicos de radiación media (invernáculo y LB. 400) los mecanismos de fotoprotección funcionan para todos los niveles de luz actínica evaluados (200, 400, 850 y 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Sin embargo, en ambientes lumínicos de alta intensidad (LB. 800) a 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se daña completamente el fotosistema, evidenciando la falta de un mecanismo de fotoprotección.

Debido a que el parámetro Φ_{NPQ} está determinado por el subparámetro Φ_{NPQFast} , es esperable que exista una alta correlación negativa ($R^2 = -0,98$) entre este parámetro y el rendimiento cuántico del PSII. Así como se establece una alta correlación negativa ($R^2 = -0,94$) entre el subparámetro Φ_{qp} , quien define al Φ_{PSII} , con el Φ_{NPQ} . Siguiendo con la misma lógica, en el gráfico se observa como existe una alta correlación negativa ($R^2 = -0,94$) entre los subparámetros Φ_{NPQFast} y Φ_{qp} . Esto significa que a medida que se cierran los centros de reacción, la energía excedente se disipa de manera regulada.

Por su parte, el parámetro que refleja el rendimiento cuántico de los procesos de disipación no fotoquímicos constitutivos o basales (Φ_{NO}), está determinado por su subparámetro Φ_{NO} . PSII debido a que existe un alto valor de correlación positiva ($R^2 = 0,87$) entre ambos. Esto significa que la disipación basal del PSII está determinada por la disipación térmica del PSII adaptado a la luz. Esto podría estar relacionado con la composición del complejo antena del PSII. Si bien, no se realizaron experimentos en este trabajo para probar este punto, los resultados de Mehta et al. (2010) en *Triticum aestivum* sugieren que la heterogeneidad del PSII está asociada a la adaptación de las plantas ante condiciones de estrés ambiental.

Sin embargo, ninguno de los parámetros que definen la disipación basal (Φ_{NO}) mostró correlación con los otros procesos de partición de energía (Φ_{PSII} , Φ_{NPQ}).

C. EFECTO DE LAS FUENTES DE VARIACIÓN SOBRE LA PARTICIÓN DE ENERGÍA DEL PSII

Una vez realizado el estudio de las correlaciones entre los parámetros de partición de energía se procedió a realizar un análisis de varianza (ANOVA) para establecer los efectos de las fuentes de variación del experimento.

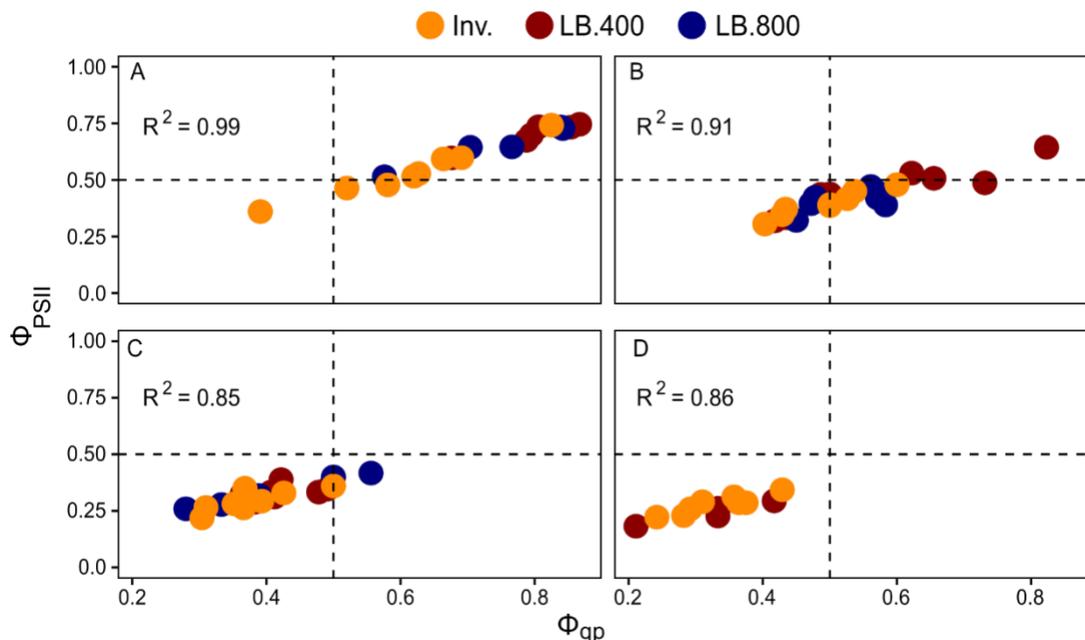
Para los parámetros de partición de energía que cuantifican el rendimiento cuántico de los procesos fotoquímicos (Φ_{PSII} y Φ_{qp}) se pudo establecer que tanto el ambiente lumínico (AL) como el tratamiento de luz actínica (LA) tuvieron un efecto significativo ($Pvalue < 0,05$), sin embargo no se observó un efecto significativo del genotipo (G) sobre estas variables. Por otro lado, el ANOVA indicó que los parámetros Φ_{PSII} y Φ_{qp} fueron afectados significativamente por la interacción entre el ambiente lumínico de desarrollo y la luz actínica de excitación del PSII (AL*LA) y la interacción entre el ambiente lumínico de desarrollo y el genotipo (AL*G). Las tablas de ANOVA completas pueden verse en el anexo 2.

Para los parámetros de partición de energía que cuantifican la disipación térmica de la energía de manera no basal (Φ_{NPQ} y $\Phi_{NPQFast}$) se pudo establecer que tanto la luz actínica (LA) como las interacciones AL*LA y AL*G tuvieron un efecto significativo. Las tablas de ANOVA completas pueden verse en el anexo 2.

1. Interacción entre el ambiente lumínico de desarrollo de la hoja y la intensidad de excitación del PSII

Analizando la correlación Φ_{PSII} vs Φ_{qp} , en virtud de la interacción AL*LA se puede observar que a medida que aumenta la intensidad de la luz actínica se reduce la dispersión de los valores de correlación entre el Φ_{PSII} y el Φ_{qp} observándose la mayor dispersión a menores intensidades de luz actínica (figura 7).

Para una luz actínica de $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, se registraron valores de Φ_{qp} y Φ_{PSII} por encima del 50%, excepto en el invernáculo (Inv) donde la distribución fue más dispersa y se observan valores menores al 50% (figura 7A).



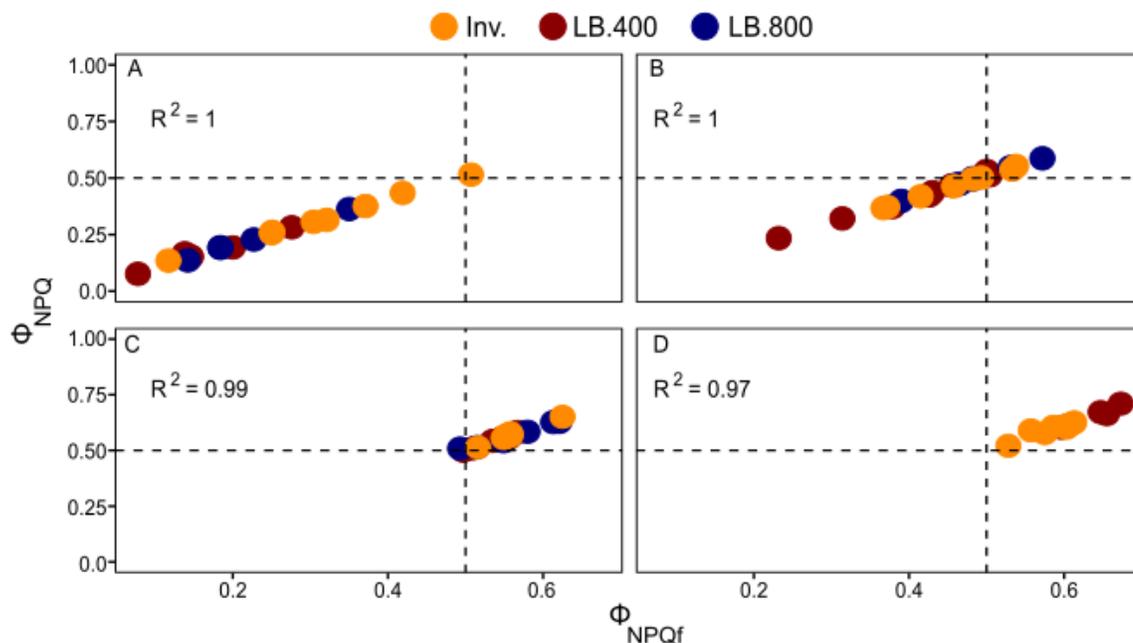
A) Actínica 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ B) Actínica 400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ C) Actínica 850 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ D) Actínica 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 7. Correlación entre los parámetros Φ_{PSII} y Φ_{qp} en función de la interacción ambiente lumínico-luz de excitación del PSII

En el caso de una luz actínica de 400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la mayoría de los valores de Φ_{qp} caen por debajo del 60% y los valores de Φ_{PSII} son menores al 50%. La excepción fueron las hojas crecidas en el ambiente lumínico LB.800 que presentan valores superiores a estos. Para una luz actínica de 850 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la mayoría de los valores de Φ_{qp} caen al 50% o menos, al igual que lo hace el Φ_{PSII} . Por último, para una luz actínica de 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, todos los valores de Φ_{qp} y Φ_{PSII} se encuentran por debajo del 50%. Es importante recordar que las plantas crecidas en el ambiente LB. 800 y cuantificadas con una luz actínica de 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no se incluyeron en el análisis debido al alto nivel de daño del PSII.

Analizando la correlación entre Φ_{NPQ} y Φ_{NPQFast} en virtud de la interacción AL*LA, se puede observar que a medida que aumenta la intensidad de la luz actínica se reduce la dispersión de los valores de correlación entre el Φ_{NPQ} y Φ_{NPQFast} observándose la mayor dispersión entre ambientes lumínicos de desarrollo a menores intensidades de luz actínica (figura 8). Este comportamiento es similar al observado para la relación Φ_{PSII} y Φ_{qp} analizadas bajo esta interacción.

Para una luz actínica de $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, se registraron valores de Φ_{NPQ} y Φ_{NPQFast} por debajo del 50% excepto en el invernáculo (Inv) donde la distribución fue más dispersa y se observan valores cercanos al 50%.



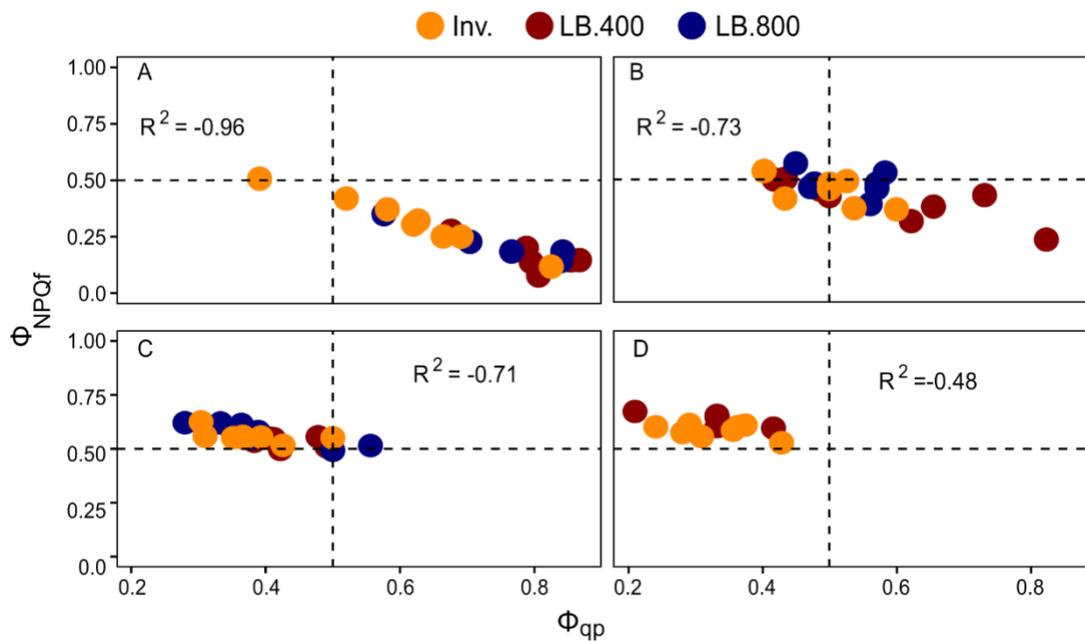
A) Actínica $200 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ B) Actínica $400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ C) Actínica $850 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ D) Actínica $1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Figura 8. Correlación entre los parámetros Φ_{NPQ} y Φ_{NPQFast} en función de la interacción ambiente lumínico-luz de excitación del PSII

En el caso de una luz actínica de $400 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, se registraron valores de Φ_{NPQ} y Φ_{NPQFast} que superan el 50%. Para una luz actínica de $850 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la mayoría de los valores de Φ_{NPQFast} superan el 50%, al igual que lo hace el Φ_{NPQ} . Por último, para una luz actínica de $1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ todos los valores registrados se encuentran por encima del 50% para ambos parámetros Φ_{NPQFast} y Φ_{NPQ} .

A partir de los análisis de correlación se pudo establecer que la energía destinada a la fase fotoquímica está regulada por el grado de apertura de los centros de reacción (Φ_{qp}) y que la energía disipada en forma de calor se hace de manera regulada (Φ_{NPQFast}). Establecido que estos subparámetros definen la partición de energía en el PSII se procedió a analizar la correlación existente entre estos en función de la interacción AL*LA (figura 9). En el gráfico se observa que a medida que aumenta la intensidad de la luz actínica se reduce la dispersión de los valores de correlación entre el Φ_{NPQFast} y el Φ_{qp} observándose la mayor

dispersión en ambientes lumínicos de desarrollo con bajos niveles de radiación evaluados a menores intensidades de luz actínica.



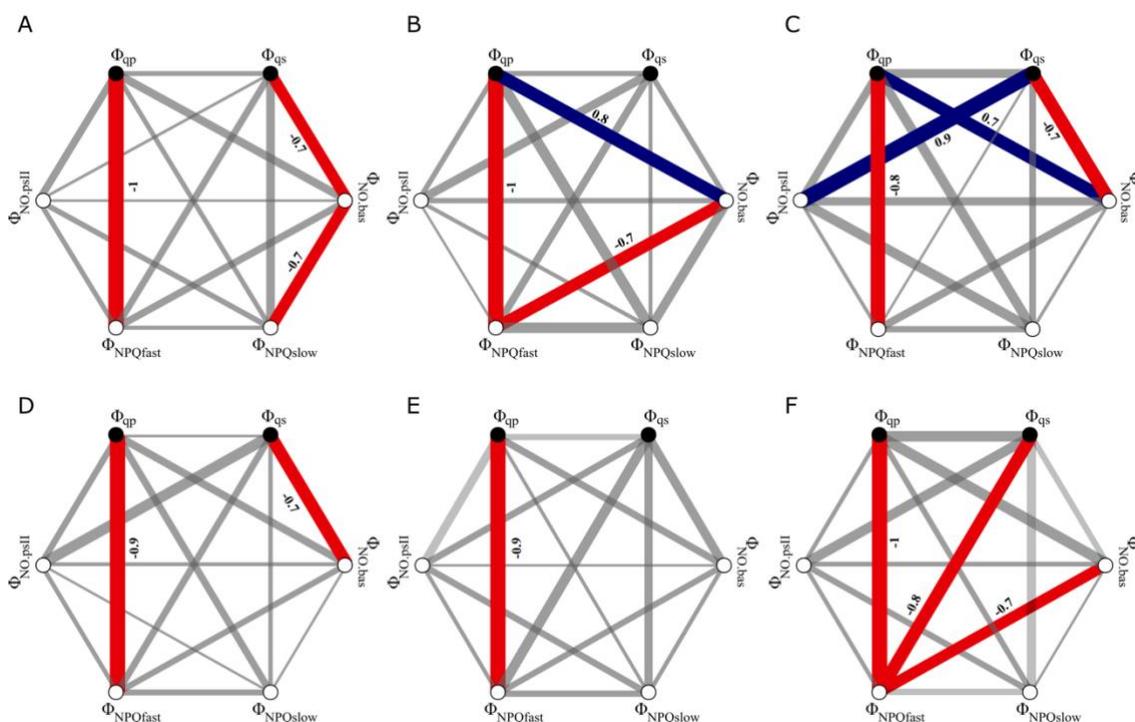
A) Actínica 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ B) Actínica 400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ C) Actínica 850 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ D) Actínica 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Figura 9. Correlación entre los parámetros Φ_{NPQFast} y Φ_{qp} en función de la interacción ambiente lumínico-luz de excitación del PSII

Para una luz actínica de 200 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se registraron valores de Φ_{qp} por encima del 50% y valores Φ_{NPQFast} por debajo del 50% excepto en el invernáculo (Inv) donde la distribución fue más dispersa y se observan valores menores al 50% para Φ_{qp} . En el caso de una luz actínica de 400 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, se registraron valores para Φ_{qp} y Φ_{NPQFast} por encima del 50%. Además, para este nivel de intensidad de luz actínica el ambiente lumínico LB. 400 fue el que mostró mayor dispersión con valores hasta por encima del 80% para Φ_{qp} . Para una luz actínica de 850 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la mayoría de los valores de Φ_{NPQFast} superan el 50%. Por el contrario, el parámetro Φ_{qp} registra la mayoría de los valores por debajo del 50%. Por último, para una luz actínica de 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ todos los valores registrados se encuentran por encima del 50% para el parámetro Φ_{NPQFast} y por debajo del 50% para el parámetro Φ_{qp} .

2. Efecto del ambiente lumínico de desarrollo de la hoja sobre la partición de energía del PSII en los distintos genotipos de *Eucalyptus grandis*

A partir de la identificación de la interacción AL*G como significativa se procedió a analizar la relación entre los distintos parámetros que definen la partición de energía en el PSII, según los distintos genotipos (figura 10). Como se observa en la figura 10, los procesos de partición de energía en cada ambiente lumínico dependen del genotipo de *Eucalyptus grandis*. Lo que muestra las diferentes estrategias de estos genotipos frente al ambiente lumínico.



En la fila superior (A, B y C) se muestran los grafos correspondientes a HHK1C3 en invernáculo, LB. 400 y LB. 800 respectivamente. En la fila inferior (D, E y F) se muestran los grafos correspondientes a HHK2C5 en invernáculo, LB. 400 y LB. 800 respectivamente.

Figura 10. Grafos de correlación entre subparámetros de partición de energía para cada genotipo según ambiente lumínico

Como se observa en la figura 10 existe una correlación negativa entre Φ_{qp} y $\Phi_{NPQfast}$ para los dos genotipos desarrollados en los tres ambientes lumínicos. Esto coincide con lo observado cuando se analizó el efecto de la interacción AL*LA sobre estos mismos parámetros (figura 9).

Los grafos A y D describen las correlaciones entre los subparámetros de partición de energía para los clones HHK1C3 y HHK2C5 respectivamente, desarrollados en el ambiente invernáculo. En estos se puede observar que existe, en ambos casos, una correlación negativa entre los subparámetros Φ_{qs} y $\Phi_{NO. basal}$. Con esto se puede inferir que el rendimiento cuántico potencial del PSII depende de las estructuras del RC. La diferencia entre los genotipos crecidos en el ambiente invernáculo en cuanto a la correlación en los parámetros de partición de energía es que el genotipo HHK1C3 (figura 10A) evidencia una correlación negativa significativa ($R^2 = -0,7$) entre $\Phi_{NO. basal}$ y $\Phi_{NPQSlow}$, mientras que para HHK2C5 esta interacción no fue significativa. A partir de la correlación entre $\Phi_{NO. basal}$ y $\Phi_{NPQSlow}$ se puede inferir que en el caso del genotipo HHK1C3 el calor que no puede ser disipado por la estructura del PSII genera daño estructural de este fotosistema. Esto no ocurre para HHK2C5. A partir de estos resultados se puede inferir que el clon HHK1C3 presenta menos capacidad adaptativa en este ambiente lumínico que el clon HHK2C5.

Cuando se analiza la partición de energía de los genotipos desarrollados en el ambiente lumínico LB. 400 (figuras 10B y 10E) se observa que para el genotipo HHK1C3 la energía que no puede ser disipada de manera basal debido a la estructura del fotosistema, puede ser disipada de manera regulada. Esto se observa a partir de la correlación negativa entre $\Phi_{NPQFast}$ y $\Phi_{NO. basal}$ ($R^2 = -0,7$). Cuando se analizó la relación entre el cierre de los centros de reacción y la disipación térmica de manera basal (Φ_{qp} y $\Phi_{NO. basal}$) se encontró una correlación positiva ($R^2 = 0,8$) lo cual indica que el nivel de apertura de los centros de reacción depende de la composición estructural del PSII. Es importante remarcar, que el genotipo HHK2C5 no tiene estos procesos de partición de energía del PSII para una hoja desarrollada en el ambiente lumínico LB. 400. Estos resultados evidencian la mayor susceptibilidad al ambiente lumínico de HHK1C3 respecto a HHK2C5.

Por último, cuando se analiza el efecto del ambiente lumínico LB. 800 (figuras 10C y 10F) se observa que para el clon HHK1C3 se destacan correlaciones entre los parámetros $\Phi_{NO. psII}$ y Φ_{qs} ($R^2 = 0,9$), entre Φ_{qp} y $\Phi_{NO. basal}$ ($R^2 = 0,7$) y entre Φ_{qs} y $\Phi_{NO. basal}$ ($R^2 = -0,7$). Lo que permite inferir que el proceso fotoquímico de este genotipo depende en cierta medida de la capacidad de disipación térmica basal. A su vez, a diferencia del HHK1C3 el genotipo HHK2C5 muestra correlaciones negativas entre $\Phi_{NPQFast}$ y Φ_{qs} ($R^2 = -0,8$) y entre $\Phi_{NPQFast}$ y $\Phi_{NO. basal}$ ($R = -0,7$). Indicando que los procesos regulatorios de disipación térmica absorben el exceso de energía producto de la disminución de la disipación basal o del rendimiento cuántico potencial.

D. PROPUESTAS

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se plantean una serie de propuestas que permitirían profundizar en la caracterización de la actividad fotosintética en *Eucalyptus*.

En primer lugar se consideró que evaluar los parámetros de partición de energía del PSII es una buena herramienta para la selección de plantines con mayor capacidad adaptativa a un ambiente lumínico cambiante. Además el control del ambiente lumínico, a nivel de invernáculo, durante el desarrollo de los plantines puede ser considerado como una estrategia de manejo para inducir cambios en el desarrollo de los fotosistemas, permitiendo esto mejores niveles de rustificación cuando el plantin sea trasladado a condiciones de campo. Por otro lado, sería enriquecedor desarrollar diferentes ambientes lumínicos variando la calidad espectral en lugar de la intensidad.

Al mismo tiempo, sería interesante estudiar qué mecanismos de fotoprotección actúan en estos clones, por ejemplo evaluar el ciclo de las xantófilas podría ser útil para cuantificar mecanismos de fotoprotección. En este sentido, se podría investigar si los plantines crecidos en un ambiente lumínico de alta intensidad al ser excitados con una luz actínica también de alta intensidad presentan graves daños en su fotosistema. Además, conocer específicamente que componentes de la cadena de transferencia de electrones se dañan podría ser útil para futuras investigaciones.

Por otro lado, un análisis que cuantifique las proteínas estructurales del PSII clarificaría los procesos de fotoinhibición que actúan en estos plantines.

Por último, evaluar distintos clones de *E. grandis* permitiría comparar los resultados obtenidos para la especie y tener más información para reafirmar o refutar las conclusiones a las que se llega en este trabajo.

V. CONCLUSIONES

1. El incremento en la intensidad de la luz actínica de excitación provoca en ambos clones de *Eucalyptus grandis* una disminución de la energía destinada a la fase fotoquímica.
2. La energía excedente fue disipada en forma de calor y de manera no basal (Φ_{NPQ}).
3. La energía destinada a la fase fotoquímica (Φ_{PSII}) estuvo determinada por el grado de apertura de los centros de reacción (Φ_{qp}).
4. La disipación no basal de la energía (Φ_{NPQ}) se dio de forma regulada en ambos genotipos ($\Phi_{NPQFast}$). Lo que indica que en los plantines estudiados, la energía excedente fue manejada por los mecanismos de fotoprotección, los cuales cumplen un rol fundamental, disminuyendo al mínimo el posible fotodaño.
5. El desarrollo de los plantines en un ambiente lumínico de alta intensidad como el de LB. 800, no sirvió para aclimatar los mismos frente a una alta intensidad de energía de excitación ($1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sino que por el contrario estos individuos fueron los únicos que mostraron graves daños en el PSII.
6. En *Eucalyptus* la partición de energía del PSII depende de la interacción entre el genotipo y el ambiente lumínico donde se dio el desarrollo foliar.
7. Las variaciones en la partición de energía encontradas entre los genotipos se atribuyen a los parámetros de disipación basal, lo cuales se relacionan con la estructura del PSII.

VI. RESUMEN

El objetivo del trabajo fue analizar la respuesta de la actividad fotosintética en hojas de *E. grandis*, frente a cambios en el ambiente lumínico. Se trabajó con clones de interés comercial (HHK1C3 y HHK2C5), se utilizaron plantines de tres meses de edad crecidos en invernáculo. Todas las plantas crecieron en condiciones de invernáculo durante tres meses, luego de ese período las plantas fueron trasladadas a los diferentes ambientes lumínicos en los cuales se desarrolló la hoja donde se realizaron las mediciones de partición de energía. Se estudió la partición de energía en el PSII para cuatro intensidades de luz actínica (200, 400, 850 y 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en tres ambientes lumínicos (invernáculo, LB. 400 y LB. 800). La partición de energía se calculó en base a tres parámetros principales (Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} , Φ_{NO}) y sus correspondientes subparámetros (Φ_{qp} y Φ_{qs} ; Φ_{NPQFast} y Φ_{NPQSlow} ; $\Phi_{\text{NO. basal}}$ y $\Phi_{\text{NO. psII}}$) respectivamente para cada caso. Además, se realizaron análisis de varianza para establecer si hubo efecto significativo de alguno de los factores sobre los parámetros de partición y luego se procedió a estudiar las correlaciones pertinentes. Los clones presentaron estrategias a nivel de partición de energía del PSII que evidencian mecanismos de fotoprotección eficientes, excepto para aquellos crecidos en un ambiente lumínico de alta intensidad (LB. 800) que al ser excitados con una luz actínica de 1700 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ presentaron graves daños en su fotosistema. A su vez, se evidenció como para ambos genotipos crecidos en los diferentes ambientes lumínicos, frente a un aumento en la intensidad de la luz de excitación, la energía destinada a la fase fotoquímica disminuyó. Mientras que, aquella energía excedente se disipó en forma de calor de manera no basal regulada. El estudio de las correlaciones entre los parámetros de partición de energía permitió identificar que para ambos clones, la energía destinada al proceso fotoquímico está determinada por el grado de apertura de los centros de reacción (Φ_{qp}) y no por el rendimiento cuántico potencial (Φ_{qs}). Además, la partición de energía en el PSII resultó ser genotipo dependiente ya que las correlaciones significativas entre los subparámetros de partición de energía fueron diferentes entre los clones en los tres ambientes lumínicos estudiados. Evaluar los parámetros de partición de energía del PSII es una buena herramienta para la selección de plantines de *Eucalyptus* con mayor capacidad adaptativa ante ambientes lumínicos cambiantes.

Palabras clave: Eucalyptus; Clon; Fotosíntesis; Fluorescencia.

VII. SUMMARY

The objective of this work was to analyze the response of the photosynthetic activity in leaves of *E. grandis*, against changes in the lighting environment. We worked on clones of commercial interest (HHK1C3 and HHK2C5), with three-month-old plants growing in a greenhouse. All the plants grew under greenhouse conditions for three months, after that period the plants were transferred to the different lighting environments in which the leaf of study was developed and where energy partition measurements were made. The energy partition in the PSII was studied for four actinic light intensities (200, 400, 850 and 1700 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in three light environments (greenhouse, LB. 400 and LB. 800). The energy partition was calculated based on three main parameters (Φ_{PSII} , Φ_{NPQ} , Φ_{NO}) and their corresponding sub-parameters (Φ_{qp} and Φ_{qs} ; Φ_{NPQFast} and Φ_{NPQSlow} ; $\Phi_{\text{NO. basal}}$ and $\Phi_{\text{NO. PSII}}$) respectively for each case. In addition, analysis of variance was carried out to establish if there was a significant effect of any of the factors on the partition parameters, and then the pertinent correlations between them were studied. The clones presented strategies at the PSII energy partition level that show efficient photoprotection mechanisms, except for those grown in a high intensity light environment (LB. 800) that, when excited with an actinic light of 1700 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ had serious damage to their photosystem. At the same time, it was evidenced that for both genotypes grown in different light environments, in the face of an increase in the intensity of the excitation light, the energy destined to the photochemical phase decreased. Whereas, that surplus energy was dissipated in the form of heat in a non-basal regulated manner. The study of the correlations between the energy partition parameters allowed to identify that for both clones, the energy destined to the photochemical process is determined by how open or close the reaction centers are (Φ_{qp}) and not by the potential quantum yield (Φ_{qs}). Furthermore, the energy partition in the PSII turned out to be genotype dependent since the significant correlations between the energy partition subparameters were different between the clones in the three lighting environments studied. Evaluating the energy partition parameters of the PSII is a good tool for the selection of *Eucalyptus* seedlings with greater adaptive capacity to changing light environments.

Key words: Eucalyptus; Clones; Photosynthesis; Chlorofill fluorescence.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Allorent, G.; Byrdin, M.; Carraretto, L.; Morosinotto, T.; Szabo, I.; Finazzi, G. 2018. Global spectroscopic analysis to study the regulation of the photosynthetic proton motive force: a critical reappraisal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Bioenergetics*. 1859(9):676-683.
2. Arbeletch, P.; Martine, G. 2018. Las dinámicas agropecuarias del siglo XXI en Uruguay. *Revista PAMPA*. 18:31-54.
3. Azcón-Bieto, J.; Talón, M. 2008. *Fundamentos de fisiología vegetal*. 2ª ed. Madrid, Interamericana-McGraw-Hill. 651 p.
4. Baker, N. 2008. Chlorophyll Fluorescence: a probe of Photosynthesis in vivo. *Plant Biology*. 59:89-113.
5. Bjorn, L. 2015. *Photobiology: the Science of Light and Life*. 3rd. ed. New York, Springer. 455 p.
6. Blankenship, R. 2014. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 2nd. ed. Chichester, Wiley. 312 p.
7. Brussa, A. 1994. *Eucalyptus: especies de cultivo más frecuentes en Uruguay y regiones de clima templado*. Montevideo, Hemisferio Sur. 328 p.
8. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. L. 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 3rd. ed. Oxford, UK, Wiley. 1264 p.
9. Bustos-Salazar, A. 2009. *Ensayo de calidad lumínica en plantas de Eucalyptus globulus, Eucalyptus nitens y Pinus radiata bajo cobertura de malla raschel y papel celofán de colores*. (en línea). Tesis Ing. Forestal, Chile. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Forestales. 44 p. Consultado 21 abr. 2021. Disponible en <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2009/fifb982e/doc/fifb982e.pdf>
10. Campbell, G.; Norman, J. 1998. *An introduction to environmental biophysics*. 2nd. ed. New York, Springer. 286 p.
11. Demmig-Adams, B.; Adams, W. III.; 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. *Physiologia Plantarum*. 98:253-264.

12. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2004. Estado y tendencias de la ordenación forestal en 17 países de América Latina por consultores forestales asociados de Honduras. (en línea). Roma, FAO. Dirección de Recursos Forestales. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales. p. irr. Consultado 25 feb. 2021. Disponible en http://www.fao.org/3/j2628s/J2628S18.htm#P1847_297885
13. Fernández, A.; Silva, F. 2016. El género *Eucalyptus* (Myrtaceae) en Galicia: claves y descripción. (en línea). *Nova Acta Científica Compostelana*. 23:23-51. Consultado 25 feb. 2021. Disponible en <https://revistas.usc.gal/index.php/nacc/article/view/2962>
14. González, S.; Perales, H.; Salcedo, M. 2008. La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*. 27(4):119-129.
15. Granados-Sánchez, D.; López, G. 2007. Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*. *Revista Chapingo*. 13(2):143-156.
16. Hikosaka, K. 2004. Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *Journal of Plant Research*. 117(6):481-494.
17. Kasajima, I.; Takahara, K.; Kawai-Yamada, M.; Uchimiya, H. 2009. Estimation of the relative sizes of rate constants for chlorophyll de-excitation processes through comparison of inverse fluorescence intensities. *Plant Cell Physiology*. 50(9):1600-1616.
18. Kato, M.; Hikosaka, K.; Hirotsu, N.; Makino, A.; Hirose, T. 2003. The excess light energy that is neither utilized in photosynthesis nor dissipated by photoprotective mechanisms determines the rate of photoinactivation in photosystem II. *Plant & Cell Physiology*. 44(3):318-325.
19. Koldobika, H.; Terradillos, R.; Hernández, A.; Soto, J.; García, J. 2005. Relevancia del ciclo de la luteína epóxido (Lx) en las respuestas fotoprotectoras de las especies leñosas de los bosques ibéricos.

Cuadernos de la Sociedad Española de Ciencias Forestales (Bilbao). 20:61-65.

20. Kume, A.; Akitsu, T.; Nasahara, K. 2016. Leaf color is fine-tuned on the solar spectra to avoid strand direct solar radiation. *Journal of Plant Research*. 129 (4):615-624.
21. _____. 2017. Importance of the green color, absorption gradient, and spectral absorption of chloroplasts for the radiative energy balance of leaves. *Journal of Plant Research*. 130:501-514.
22. _____. 2019. Color of photosynthetic systems: Importance of atmospheric spectral segregation between direct and diffuse radiation. *In*: Yamagishi, A.; Kakegawa, T.; Usui, T. eds. *Astrobiology: from the Origins of Life to the Search for Extraterrestrial Intelligence*. Singapore, Springer. pp. 123-135.
23. Lazár, D. 2015. Parameters of photosynthetic energy partitioning. *Journal of Plant Physiology*. 175:131-147.
24. Maxwell, K.; Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51:659-668.
25. Mehta, P.; Allakhverdiev, S.; Jajoo, A. 2010. Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). (en línea). *Photosynthesis Research*. 105:249-255. Consultado 10 sep. 2021. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11120-010-9588-y>
26. Meisel, L.; Urbina, D.; Pinto, M. 2011. Fotorreceptores y respuestas de plantas a señales lumínicas. *In*: Squeo, F.; Cardemil, L. eds. *Fisiología vegetal*. La Serena, Chile, s.e. pp. 1-10.
27. Meléndez-Martínez, A.; Vicario, I.; Heredia, F. 2007. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. (en línea). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 57(2):109-117. Consultado 27 feb. 2021. Disponible en http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200002&lng=es
28. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Investigaciones Estadísticas Agropecuarias, UY). 2019. Anuario estadístico agropecuario 2019. Montevideo. 255 p.

29. _____. OPYPA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Oficina de Programación y Política Agropecuaria, UY). 2019. Anuario de análisis sectorial y cadenas productivas. Montevideo. 663 p.
30. Murata, N.; Takahashi, S.; Nishiyama, Y.; Allakhverdiev, S. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1767 (6):414-421.
31. Nión, M. 2018. Caracterización de la actividad fotosintética y anatomía foliar en clones de *Eucalyptus grandis* e híbridos interespecíficos, creciendo en condiciones controladas. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. 50 p.
32. Nobel, S. 2009. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 4th. ed. Los Angeles, Academic Press. 604 p.
33. Ort, D. 2001. When there is too much light. *Plant Physiology*. 125(1):29-32.
34. Pallardy, S. 2008. *Physiology of Woody plants*. 14th. ed. Amsterdam, Elsevier. 454 p.
35. Pérez-Urria, E. 2009. Fotosíntesis: aspectos básicos. *Reduca. Serie Fisiología Vegetal*. 2(3):1-47.
36. Quero, G.; Bonnacarrre, V.; Fernández, S.; Simondi, S.; Borsani, O.; Silva, P. 2018. Light-use efficiency and energy partitioning in rice is cultivar dependent. (en línea). *Photosynthesis Research*. 140:51-63. Consultado 30 mar. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11120-018-0605-x>
37. _____.; _____.; _____.; _____.; _____.; Garaycochea, S.; Gutiérrez, L.; Santos, J. 2020. Genetic architecture of photosynthesis energy partitioning as revealed by a genome-wide association approach. (en línea). *Photosynthesis Research*. 150: 97-115. Consultado 30 mar. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1007/s11120-020-00721-2>
38. R Core Team. 2017. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, The R Foundation. 1731 p.

39. Ritter, M. 2014. Field guide to the Eucalypts (Myrtaceae) and how to identify them. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 99:642-687.
40. Russell, L. 2018. Emmeans: estimated marginal means, aka leastsquares means. R package version 1.2.1. (en línea). s.n.t. s.p. Consultado 20 may. 2021. Disponible en <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>
41. Takahashi, S.; Milward, S.; Yamori, W.; Evans, J.; Hillier, W.; Badger, M. 2010. The solar action spectrum of photosystem II damage. (en línea). *Plant Physiology*. 153 (3):988-993. Consultado 15 jun. 2021. Disponible en <https://doi.org/10.1104/pp.110.155747>
42. Terashima, I.; Fujita, T.; Inoue, T.; Chow, W.; Oguchi, R. 2009. Green Light Drives Leaf Photosynthesis More Efficiently than Red Light in Strong White Light: Revisiting the Enigmatic Question of Why Leaves are Green. *Plant and Cell Physiology*. 50:684-697.
43. Zavafer, A.; Cheah, M.; Hillier, W.; Chow, W.; Takahashi, S. 2015. Photodamage to the oxygen evolving complex of photosystem II by visible light. *Scientific Reports*. 5:1-8.
44. Zivcak, M.; Brestic, M.; Kunderlikova, K.; Sytar, O.; Allakhverdiev, S. 2015. Repetitive light pulse-induced photoinhibition of photosystem I severely affects CO₂ assimilation and photoprotection in wheat leaves. *Photosynthesis Research*. 126:449-463.
45. _____.; _____.; Botyanszka, L.; Chen, Y. E.; Allakhverdiev, S. 2018. Phenotyping of isogenic chlorophyll-less bread and durum wheat mutant lines in relation to photoprotection and photosynthetic capacity. *Photosynthesis Research*. 139:239-251.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Firmas de fluorescencia de los genotipos HHK1C3 y HHK2C5 los cuales presentaron graves daños en su fotosistema, crecidos en el ambiente LB. 800 para una luz actínica de excitación de $1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$

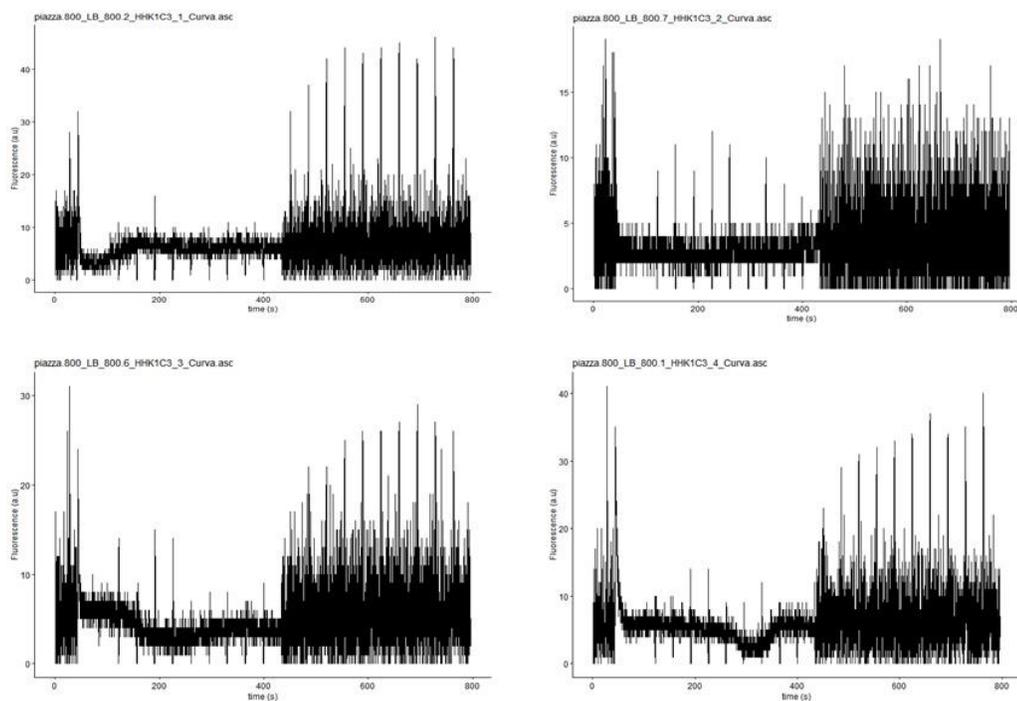


Figura 1. Firmas de fluorescencia para cuatro plantines del genotipo HHK1C3 crecidos en el ambiente lumínico LB. 800 excitados con una luz actínica de $1700 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$

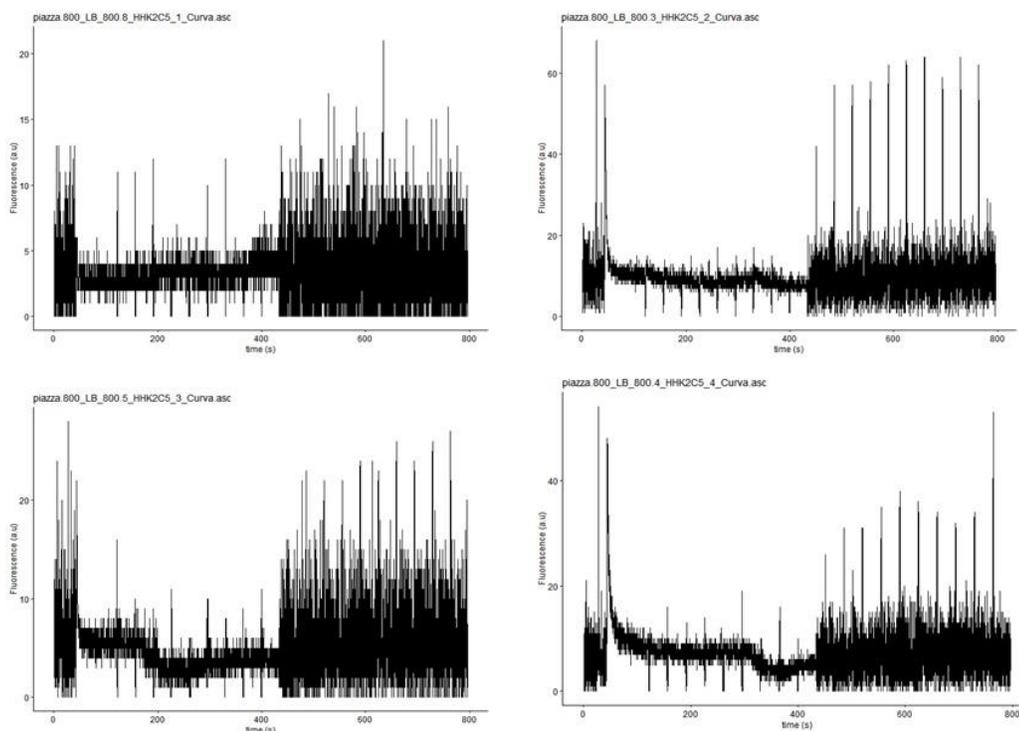


Figura 2. Firmas de fluorescencia para cuatro plantines del genotipo HHK2C5 crecidos en el ambiente lumínico LB. 800 excitados con una luz actínica de 1700 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Anexo 2. Tablas de verificación de los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk test) y homogeneidad de varianza (Levene test) con su respectivo análisis de varianza (ANOVA) para los parámetros de partición de energía Φ_{PSII} , Φ_{qp} , Φ_{NPQ} y Φ_{NPQFast}

Φ_{PSII}

Cuadro 1. Levene test para el parámetro Φ_{PSII}

Levene's test for homogeneity of variance			
group	Df	F value	Pr (>F)
	15	1,0075	0,4596
	62		

Cuadro 2. Shapiro-Wilk test para el parámetro Φ_{PSII}

Shapiro-Wilk normality test	
W= 0,98119	p-value= 0,3037

Cuadro 3. ANOVA para el parámetro Φ_{PSII}

FVD	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)	Signif. codes
ambiente lumínico	1	0,07281	0,07281	15,5646	0,0002058	***
luz actínica	3	1,27506	0,42502	90,8599	<2,2e-16	***
genotipo	1	0,00005	0,00005	0,0113	0,9155747	
ambiente lumínico:luz actínica	3	0,06391	0,0213	4,554	0,0060071	**
ambiente lumínico:genotipo	1	0,01783	0,01783	3,8123	0,0553958	.
luz actínica:genotipo	3	0,01237	0,00412	0,8817	0,4555695	
ambiente lumínico:luz actínica:genotipo	3	0,00995	0,00332	0,7091	0,5502152	
Residuals	62	0,29002	0,00468			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Φ_{qp}

Cuadro 4. Levene test para el parámetro Φ_{qp}

Levene's test for homogeneity of variance			
Group	Df	F value	Pr (>F)
	15	0,8394	0,6315
	62		

Cuadro 5. Shapiro-Wilk test para el parámetro Φ_{qp}

Shapiro-Wilk normality test	
W= 0,98227	p-value= 0,3504

Cuadro 6. ANOVA para el parámetro Φ_{qp}

FVD	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)	Signif. codes
ambiente lumínico	1	0,12584	0,12584	16,6006	0,0001334	***
luz actínica	3	1,41728	0,47243	62,3194	< 2,2e-16	***
genotipo	1	0,00086	0,00086	0,1137	0,7371556	
ambiente lumínico:luz actínica	3	0,06223	0,02074	2,7363	0,0510074	.
ambiente lumínico:genotipo	1	0,03954	0,03954	5,2152	0,0258281	*
luz actínica:genotipo	3	0,02735	0,00912	1,2027	0,3162561	
ambiente lumínico:luz actínica:genotipo	3	0,01502	0,00501	0,6605	0,5795074	
Residuals	62	0,47001	0,00758			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Φ_{NPQ}

Cuadro 7. Levene test para el parámetro Φ_{NPQ}

Levene's test for homogeneity of variance			
Group	Df	F value	Pr (>F)
	15	1,0501	0,4196
	62		

Cuadro 8. Shapiro-Wilk test para el parámetro Φ_{NPQ}

Shapiro-Wilk normality test	
W= 0,99226	p-value= 0,9236

Cuadro 9. ANOVA para el parámetro Φ_{NPQ}

FVD	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)	Signif. codes
ambiente lumínico	1	0,1858	0,1858	3,2839	0,074806	.
luz actínica	3	17,4077	5,8026	102,5418	< 2,2e-16	***
genotipo	1	0,0217	0,0217	0,3830	0,538272	
ambiente lumínico:luz actínica	3	1,0304	0,3435	6,0699	0,001086	**
ambiente lumínico:genotipo	1	0,8255	0,8255	14,5873	0,000312	***
luz actínica:genotipo	3	0,4109	0,1370	2,4203	0,074469	.
ambiente lumínico:luz actínica:genotipo	3	0,0800	0,0267	0,4710	0,703596	
Residuals	62	3,5084	0,0566			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

$\Phi_{NPQFast}$

Cuadro 10. Levene test para el parámetro $\Phi_{NPQFast}$

Levene's test for homogeneity of variance			
Group	Df	F value	Pr (>F)
	15	0,9966	0,4702
	62		

Cuadro 11. Shapiro-Wilk test para el parámetro $\Phi_{NPQFast}$

Shapiro-Wilk normality test	
W= 0,98867	p-value= 0,7241

Cuadro 12. ANOVA para el parámetro $\Phi_{NPQFast}$

FVD	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)	Signif. codes
ambiente lumínico	1	0,1802	0,1802	3,9375	0,0516519	.
luz actínica	3	15,6977	5,2326	114,3377	< 2,2e-16	***
genotipo	1	0,0275	0,0275	0,6004	0,4413772	
ambiente lumínico:luz actínica	3	0,7818	0,2606	5,6947	0,0016474	**
ambiente lumínico:genotipo	1	0,6488	0,6488	14,1776	0,0003722	***
luz actínica:genotipo	3	0,2329	0,0776	1,6960	0,1770754	
ambiente lumínico:luz actínica:genotipo	3	0,0105	0,0035	0,0766	0,9724103	
Residuals	62	2,8374	0,0458			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1