



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magíster en Ciencias con mención en Botánica

“Estrés oxidativo, capacidad antioxidante y contenidos de antioxidantes no enzimáticos en dos Hymenophyllaceae Link. (Pteridophyta) sometidas a un ciclo de desecación y rehidratación bajo intensidades lumínicas distintas”

Tesis para optar al grado académico de Magíster en Ciencias c/m en Botánica

Karina Isabel Acuña Contreras

Concepción, Chile

2015

Profesor guía : Dr. León A. Bravo Ramírez
Dpto. de Agroindustria, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales Universidad de La Frontera.
Profesor co-guía : PhD. Luis J. Corcuera Pérez
Dpto. de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo de tesis sin duda ha estado llena de aciertos, errores, satisfacciones, sinsabores y mucho aprendizaje. Fue en cada uno de estos momentos que mucha gente me acompañó ya sea para celebrar un triunfo o para levantarme tras haber sufrido una derrota. Por esto es que no puedo dejar de agradecer:

A Dios por toda la gente que puso en mi camino y que colaboraron de una u otra forma a que este largo proceso llegara a buen término.

A mis amados padres Tirsa y Rolando. Gracias papá y mamá por el permanente apoyo, confianza, orgullo, comprensión y paciencia entregados durante todo este tiempo. No se imaginan lo importante que son en mi vida y la trascendencia que hoy tiene este momento. Lo último no precisamente por el logro académico obtenido, sino más bien porque cada avance en mi vida sólo refleja el excelente trabajo que han hecho como padres y el resultado de su enorme amor, preocupación y enseñanzas.

A mis hermanas Cynthia y Cathy. Gracias hermanitas por todo su amor, paciencia, cariño y admiración. El tenerlas a ustedes a mi lado me hace tener la necesidad de esforzarme cada día para llegar aún más lejos. El saber que tan sólo con esbozarles el camino ustedes ya me estarán esperando en la meta es uno de los más grandes alicientes para no desmayar en la persecución de mis objetivos.

A mi querida co-autora y eterna compañera de mediciones, experimentos, confección de informes y presentaciones a congreso, Katy Aravena. Gracias por toda la ayuda, paciencia y apoyo emocional brindados, pues sé que sin ellos el camino hubiese sido mucho más pedregoso y el objetivo aún más difícil de lograr.

A mi tutor, el Dr. León Bravo. Querido mentor, cómo agradecerle su eterna paciencia y entrega de tan valiosos conocimientos. En ningún momento he dudado que en la actualidad estoy donde estoy académicamente gracias a las innumerables oportunidades y guía que me ha dado. Gracias a UD. he aprendido a disfrutar con la fisiología vegetal y ahora incluso a complementarla con algo que jamás pensé abordar, la biología molecular. Profe, de verdad muchas gracias por ser uno de mis grandes referentes en la ciencia.

Al mi co-tutor, el Dr. Luís Corcuera. Gracias Doc por haberme recibido hace ya varios años en su laboratorio, dándome la posibilidad de así descubrir el fascinante mundo de cómo funcionan las plantas y cómo interaccionan con el ambiente que las rodea.

A mis queridos y grandes amigos. Los Silva Fuentes, Paty, Carlita, Carito S., Cami, Gus, Kike, Ale, Bartolo y, de forma muy especial, a Carito Hernández. Chicos, no saben lo importante que son para mí y lo trascendentales que han sido en todo este proceso. Cada buen o mal día junto a ustedes se transforma en el mejor de los momentos. Gracias amigos por las diversas e innumerables formas que contribuyeron con esta tesis.

Al Parque Katalapi, Puerto Montt, Chile. por las acomodaciones facilitadas y apoyo logístico proporcionados.

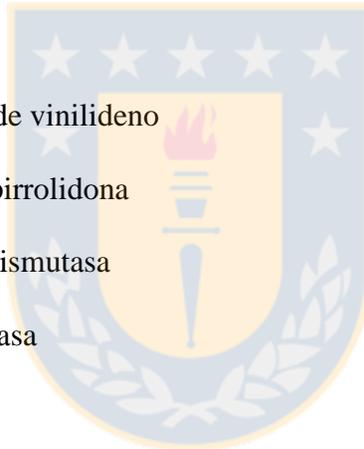
A los proyectos FONDECYT 1090397 y 1120964 por el financiamiento para la realización de este estudio y su exposición en distintas reuniones científicas.

LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$:	Oxígeno singlete
$^3\text{Chl}^*$:	Clorofila en estado triplete excitado
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
APX:	Ascorbato peroxidasa
ARN:	Ácido ribonucleico
AsA:	Ascorbato
ATP:	Adenosina trifosfato
CAOX:	Capacidad antioxidante
CAT:	Catalasa
CFT:	Compuestos fenólicos totales
C_i :	CO_2 intracelular
CO_2 :	Dióxido de carbono
CRA:	Contenido relativo de agua
Cu^+ :	Ión cobre
Cy <i>t</i> <i>b</i> :	Citocromo b
D_1 :	Proteína que forma parte del centro de reacción del fotosistema II
D_2 :	Proteína que forma parte del centro de reacción del fotosistema II
DAB:	3,3'-diaminobencidina
DAD:	Detector de matriz de fotodiodos
DMPBQ:	2,3-dimetil-6-fetil-1,4-benzoquinona
DPPH $^\bullet$:	radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EROs:	Especies reactivas del oxígeno

Fe ²⁺ :	Ión hierro
FSI:	Fotosistema I
FSII:	Fotosistema II
F _v /F _m :	Eficiencia fotoquímica máxima o intrínseca del fotosistema II
gPS:	Gramo de peso seco
GPX:	Glutación peroxidasa
GSH:	Glutación
H ₂ O:	Agua
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrógeno
HO ₂ :	Radical peroxil
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento
MDA:	Malondialdehído
mitAPX:	Ascorbato-peroxidasa mitocondrial
Mn:	Manganeso
MnSOD:	Manganeso superóxido-dismutasa
MPBQ:	2-metil-6-fetil-1,4-benzoquinona
Na ₂ CO ₃ :	Carbonato de sodio
NADP ⁺ :	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en estado oxidado
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en estado reducido
NBT:	Azul de nitro-tetrazolio
NO :	Radical óxido nítrico
O ₂ :	Oxígeno molecular
O ₂ :	Anión superóxido
OH :	Radical hidroxilo

PC-8:	Plastocromanol-8
PC-OH:	Hidroxi-plastocromanol
PF:	Peso fresco
POD:	Peroxidasas
PPO:	Polifenol oxidasa
PQ-9:	Plastoquinona-9
PQH2-9:	Plastoquinol-9
Prxs:	Peroxirredoxinas
PS:	Peso seco
PT:	Peso túrgido
PVDF:	Polifluoruro de vinilideno
PVPP:	Polivinilpolipirrolidona
SOD:	Superóxido dismutasa
XOD:	Xantina-oxidasa



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	7
I.1. Tolerancia a la desecación.....	9
I.2. Especies reactivas del oxígeno (EROs).....	11
I.2.1. Cloroplastos	14
I.2.2. Peroxisomas	16
I.2.3. Mitocondrias	17
I.3. Mecanismos de remoción de EROS	18
I.3.1. Compuestos fenólicos.....	19
I.3.1.1. Ácidos fenólicos	20
I.3.1.2. Flavonoides.....	21
I.3.2. Tococromanos.....	23
I.3.2.1. Tocoferoles.....	24
I.3.2.2. Plastocromanol-8.....	27
I.4. Estrés oxidativo y sus principales blancos en plantas	29
I.5. La familia Hymenophyllaceae.....	30
I.6. Antecedentes y problemática de estudio	32
II. HIPÓTESIS.....	34
III. OBJETIVOS	35

III.1. Objetivo general.....	35
III.2. Objetivos específicos	36
IV. METODOLOGÍA.....	36
Actividad N°1: Colecta y mantención del material vegetal.....	36
Actividad N°2: Diseño experimental.....	38
2.1. Tratamientos de hidratación, desecación y rehidratación bajo distintas intensidades lumínicas.	38
Actividad N°3: Mediciones fisiológicas durante los experimentos.....	40
3.1. Contenido relativo de agua (CRA).....	40
3.2. Eficiencia fotoquímica máxima o intrínseca del fotosistema II (F_v/F_m).....	41
Actividad N°4: Toma y mantención de muestras	42
Actividad N°5: Determinación de la capacidad antioxidante: Actividad de remoción del radical libre DPPH.	42
Actividad N°6: Estrés Oxidativo	43
6.1. Detección histoquímica de anión superóxido ($O_1^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	43
6.2. Determinación de contenidos de malondialdehido (MDA)	44
Actividad N°7: Determinación de compuestos fenólicos totales.....	45
Actividad N°8: Determinación de ácidos fenólicos y flavonoides	46
Actividad N°9: Determinación de tococromanos.	47
Actividad N°10: Análisis estadísticos.....	48

V. RESULTADOS.....	49
V.1. Contenidos relativos de agua	49
V.2. Capacidad antioxidante: Actividad de remoción del radical libre DPPH.	50
V.3. Estrés oxidativo.....	52
V.3.1. Acumulación de anión superóxido ($O_1^{\bullet-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)...52	
V.3.2. Contenidos de malondialdehido (MDA).....	54
V.3.3. Eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II (Fv/Fm).....	56
V.3.4. Aspecto visual de las frondes	58
V.4. Contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT).....	59
V.5. Contenidos de ácidos fenólicos y flavonoides	61
V.5.1. Ácidos fenólicos.....	61
V.5.2. Flavonoides	65
V.6. Contenidos de tococromanoles	69
V.6.1. Tocoferoles.....	69
V.6.2. Plastocromanol-8 (PC-8).....	701
VI. DISCUSIÓN	712
VI.1. <i>Hymenoglossum cruentum</i> v/s <i>Hymenophyllum dentatum</i>	72
VI.2. Hymenophyllaceae v/s otras plantas de resurrección	77
VI. CONCLUSIONES FINALES	88
VII. REFERENCIAS	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Contenidos de los cinco ácidos fenólicos analizados en frondes de <i>H. cruentum</i> y <i>H. dentatum</i> sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos.	62
Tabla 2	Cantidad aproximada de veces en que <i>H. cruentum</i> supera a <i>H. dentatum</i> en los contenidos de los cinco ácidos fenólicos analizados en frondes sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos.	64
Tabla 3	Contenidos de los cuatro flavonoides analizados en frondes de <i>H. cruentum</i> y <i>H. dentatum</i> sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos.	66
Tabla 4	Cantidad aproximada de veces en que <i>H. cruentum</i> supera a <i>H. dentatum</i> en los contenidos de los cuatro flavonoides analizados en frondes sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos.	68
Tabla 5	Concentración de compuestos fenólicos totales en hojas normalmente hidratadas de distintas plantas de resurrección y una planta sensible a la desecación.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estado basal del oxígeno molecular con sus electrones de valencia en el orbital más externo desapareados y con sus spins paralelos.	12
Figura 2	Generación de oxígeno singlete $^1\text{O}_2$ a partir del oxígeno molecular (O_2) tras la absorción de energía suficiente para invertir el spin en uno de los electrones desapareados.	14
Figura 3	Generación de anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\cdot) y agua (H_2O) a partir del oxígeno molecular (O_2) y por medio de transferencias sucesivas de electrones y/o protones.	14
Figura 4	Generación de EROs a nivel de la cadena transportadora cloroplastidial a causa de condiciones ambientales adversas.	16
Figura 5	Sitios de generación de EROs en la cadena respiratoria mitocondrial.	18
Figura 6	Estructura básica de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos.	21
Figura 7	Estructura genérica de una molécula flavonoide.	22
Figura 8	Estructura básica y tipos de tocoferoles.	25
Figura 9	Estructura molecular del plastocromanol-8.	27
Figura 10	Aspecto de las frondes de <i>H. cruentum</i> y <i>H. dentatum</i> sometidas a tratamientos de desecación y rehidratación bajo condiciones de oscuridad.	34
Figura 11	Especies de Hymenophyllaceae con distribución vertical contrastante utilizadas en este estudio: <i>Hymenoglossum cruentum</i> e <i>Hymenophyllum dentatum</i> .	37
Figura 12	Mantenimiento en vivero de las plantas colectadas en terreno para	38

experimentos en laboratorio: Pared artificial y sistema de riego controlado con microaspersores.

- Figura 13** Obtención del nivel máximo de hidratación foliar de frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* antes de cada experimento. 39
- Figura 14** Cámara de fotoinhibición con focos halógenos adosados a la parte superior y frondes bajo tratamiento al interior de ella. 40
- Figura 15** Contenidos relativos de agua (CRA) en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos hídricos lumínicos. 49
- Figura 16** Capacidad antioxidante en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. 51
- Figura 17** Acumulación de O_1^{\bullet} en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tratamientos de “hidratación”, “deseccación” y “rehidratación” bajo tres condiciones lumínicas distintas. 53
- Figura 18** Acumulación de H_2O_2 en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tratamientos de “hidratación”, “deseccación” y “rehidratación” bajo tres condiciones lumínicas distintas. 54
- Figura 19** Niveles de peroxidación lipídica en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. 55
- Figura 20** Eficiencia fotoquímica máxima del FSII (F_v/F_m) en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. 57
- Figura 21** Aspectos de las frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos de hidratación, desecación y rehidratación bajo tres intensidades lumínicas distintas. 59

- Figura 22** Contenidos de compuestos fenólicos totales en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. 60
- Figura 23** Contenidos de - y -Tocoferol en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. 70
- Figura 24** Contenidos de plastocromanol-8 (PC-8) en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. 71



RESUMEN

El déficit hídrico ambiental es una de las situaciones de estrés más comunes y perjudiciales para la gran mayoría de las plantas. Esto debido al efecto directo que tiene sobre su integridad celular y funcional. Además, gran parte del tiempo actúa en compañía de la luz solar, la cual funciona como un factor adicional de estrés. De los distintos procesos fisiológicos alterados, la disminución en las tasas de asimilación de CO₂ es uno de los que puede comprometer más directamente su sobrevivencia. Esto a raíz de que puede inducir el traspaso de electrones al oxígeno molecular (O₂) y, consecuentemente, a cascadas oxidativas descontroladas que afectan severamente a varios componentes celulares. Por esto la gran mayoría de las plantas sólo pueden tolerar condiciones de déficit hídrico leve a moderado. Sin embargo, existe un grupo minoritario de especies que son capaces de tolerar déficit hídrico extremo. Éste es conocido como desecación. Las plantas capaces de sobrevivir exitosamente a tal nivel de pérdida de agua son denominadas “plantas de resurrección”. Ellas pueden recuperar completamente su integridad celular y funcional tras su rehidratación, lo cual deben a eficientes estrategias de protección y/o reparación celular. Dentro de éstas se encuentran mecanismos de protección antioxidante altamente eficientes. Varios trabajos han documentado la capacidad antioxidante de plantas de resurrección pertenecientes a los clados menos complejos. Sin embargo, se ha excluido de tales estudios a la familia Hymenophyllaceae Link. Experimentos realizados con especies de preferencias de microhábitats distintas demostraron que existen diferencias entre ellas en los niveles de tolerancia a la desecación y en sus requerimientos lumínicos. Hasta la fecha aún no existe ningún otro estudio que indague en los mecanismos o procesos fisiológicos que subyacen tales diferencias. Considerando que la sobregeneración de EROs es una de las principales

consecuencias del déficit hídrico en presencia de luz, el presente trabajo de tesis estuvo enfocado en evaluar la implicancia de la protección antioxidante en la tolerancia a la desecación de dos Hymenophyllaceae que difieren en sus preferencias de microhábitat en un bosque templado-lluvioso del sur de Chile, así como también, si dicha tolerancia se ve afectada por la intensidad lumínica incidente. Se postularon las siguientes hipótesis:

1. Las diferencias en preferencias de microhábitat entre dos de las especies de helechos película presentes en Chile se deben a que la especie de hábito más restringido posee menor capacidad de protección antioxidante que aquella más ampliamente distribuida, lo cual compromete su tolerancia a la desecación sobre todo bajo condiciones lumínicas que superan sus óptimos fotosintéticos.
2. El déficit hídrico extremo tiene un efecto negativo en la protección antioxidante de la especie de hábito más restringido al disminuir con la desecación, y más aún con la rehidratación, la capacidad contenida en sus frondes para remover las EROs sobreproducidas durante dichas etapas.
3. El pardeamiento intenso exhibido por las frondes de la especie de hábito más restringido tras su rehidratación en experimentos anteriores, se debe a que, junto con contenidos más bajos de antioxidantes liposolubles que otorguen mayor protección a las membranas celulares frente al estrés oxidativo, posee también mayores concentraciones constitutivas y/o inducidas de compuestos fenólicos potencialmente oxidables durante el reingreso del agua a los tejidos.

Los experimentos de hidratación, desecación y rehidratación en condiciones lumínicas baja ($\pm 5 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$), intermedia ($\pm 30 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y alta ($\pm 150 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$), arrojaron como resultado que *H. cruentum* (de hábito más restringido) posee, efectivamente, menos capacidad de protección antioxidante (alrededor de un 20% inferior) que *H. dentatum* (de hábito más amplio). Además también se constató que tal deficiencia compromete su tolerancia a la desecación bajo condiciones lumínicas que superan sus óptimos fotosintéticos. Por otro lado, los análisis de CAOX demostraron que el déficit hídrico tiene sólo efectos leves en *H. cruentum*. Las disminuciones en él detectadas rara vez excedieron el 5% de decaimiento en la inhibición de la absorbancia del DPPH obtenida en frondes hidratadas. A su vez, las concentraciones de los antioxidantes no enzimáticos obtenidas tras los distintos tratamientos (ácidos fenólicos, flavonoides, tocoferoles y PC-8), corroboran en gran medida lo recién mencionado. Éstas además indican que el sistema de protección antioxidante de las Hymenophyllaceae es más bien de tipo constitutivo que inducido por la desecación/rehidratación de sus frondes. Finalmente, los niveles de pardeamiento exhibidos con anterioridad por *H. cruentum*, ciertamente se deberían a la oxidación de polifenoles, siendo el ácido clorogénico el principal sustrato. No obstante, tal reacción sería provocada por el estrés mecánico ejercido durante la manipulación permanente de sus frondes para la determinación de parámetros fisiológicos y no por su utilización masiva como antioxidantes durante la rehidratación de las mismas.

ABSTRACT

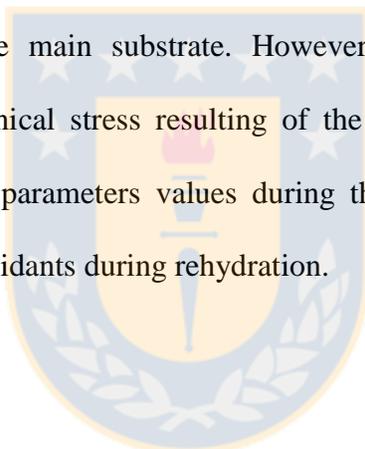
Environmental water deficit is one of the most common and harmful situations for land plants. This is due to its direct effects on cellular and functional integrity. Additionally, most of the time water deficit acts in association with sunlight, an additional stress factor. Among the different physiological processes that are altered, the decrease of CO₂ assimilation rates is one that may compromise a plant's survival directly. This is because it may induce electron transfer to molecular oxygen (O₂), and consequently, give rise to uncontrolled oxidative cascades that have severe effects on diverse cellular components. This is one of the reasons why most plants can only tolerate mild to moderate water deficit. Nonetheless, there is a small group that is able to tolerate extreme water deficit. This water stress level is known as desiccation. Plants that are able to survive such stressful conditions are known as “resurrection plants”. These plants can recover complete cellular and functional integrity after rehydration, due to highly efficient and sophisticated strategies of protection and/or cellular repair. Among these are antioxidant mechanisms. Several studies have documented the antioxidant capacity of resurrection plants belonging to less complex plant clades. However, they have excluded Hymenophyllaceae. Experiments with species that differ in their habitat preferences demonstrate that although they are all desiccation and shade tolerant, they differ in their levels of desiccation tolerance and light requirements. To date, there are no other studies that investigate the mechanisms or physiological processes that underlie such differences. Considering that ROS overproduction is one of the main consequences of water deficit under light, it was the focus of this thesis to assess the implications of antioxidant protection on the desiccation tolerance of two Hymenophyllaceae that differ in their microhabitat preferences in a

temperate rainforest of southern Chile, and also if such tolerance is affected by light intensity. The hypotheses proposed were:

1. Differences in microhabitat preferences between two filmy ferns present in Chile are due to less antioxidant protection capacity in the species with more restricted distribution, which compromises its desiccation tolerance under light intensities that exceed its photosynthetic optimum.
2. The extreme water deficit has a negative impact on the antioxidant protection of the species with more restricted distribution, since it decreases its ability to remove ROS during desiccation and, even further under rehydration.
3. The intense browning exhibited by the fronds of the species with more restricted habitat during its rehydration in previous experiments, is due to, along with lower concentrations of some lipophilic antioxidants that protect cells membranes under oxidative stress, it also have higher concentrations of constitutive and/or inducible leaf phenolic compounds that could potentially be oxidized during the recovery of leaf water status.

Hydration, desiccation and rehydration experiments under low ($\pm 5 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$), intermediate ($\pm 30 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and high ($\pm 150 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) light intensities showed that *H. cruentum* (more restricted habitat fern) has less antioxidant protection capacity (about 20% lower) than *H. dentatum* (more widely distributed fern). It

was also found that such a deficiency compromises its desiccation tolerance under light conditions that exceed its photosynthetic optimum. On the other hand, CAOX analyses demonstrate that water deficit only has mild effects on *H. cruentum*. Decreases in DPPH^{*} absorbance inhibition were rarely lower than 5% of the values obtained in hydrated fronds. Additionally, non-enzymatic antioxidants concentrations after the different treatments (phenolic acids, flavonoids, tocopherols and PC-8), largely corroborate the previously mentioned results. These results further indicate that Hymenophyllaceae antioxidant system is constitutive rather than induced by fronds desiccation/rehydration events. Finally, the previous browning levels exhibited by *H. cruentum* could be due to polyphenols oxidation, being chlorogenic acid the main substrate. However, such a reaction might be the consequence of the mechanical stress resulting of the recurrent fronds manipulation to obtain some physiological parameters values during the experiments rather than by its massive utilization as antioxidants during rehydration.



I. INTRODUCCIÓN

Las plantas terrestres están constantemente expuestas a variaciones en las condiciones ambientales, las cuales en ciertas ocasiones se alejan de los rangos fisiológicos óptimos de algunas especies y con ello generan complejas situaciones de estrés (Levitt, 1980; Hsiao, 1973). Entre éstas, una de las más comunes y perjudiciales es la disminución en la disponibilidad hídrica a nivel del suelo y/o de la atmósfera. En el primero, la escasez de agua provoca una limitación del suministro hídrico a las raíces; mientras que en el segundo, ocasiona una continua pérdida de agua por transpiración y/o evaporación a través de las hojas (Jaleel *et al.*, 2009). Ambas situaciones afectan directamente las relaciones hídricas de la planta al reducir el potencial hídrico y turgor de los tejidos. Esto trae consigo la disminución de la elongación celular, la reducción del crecimiento vegetal y consecuencias negativas en la fotosíntesis, respiración, translocación, captura de iones y metabolismo de nutrientes (Farooq *et al.*, 2008; Jaleel *et al.*, 2009; Lisar *et al.*, 2012). De tales procesos, uno de los que sin duda es particularmente sensible a la escasez de agua es la fotosíntesis (Smirnov, 1993; Jaleel *et al.*, 2009). En primera instancia, debido a la disminución en la concentración de CO₂ intracelular (C_i) por efecto del cierre estomático (el cual puede ocurrir incluso antes de que sea posible cuantificar variaciones en el estado hídrico foliar) (Darwin, 1898; Arve *et al.*, 2011; Bauer, 2013), y en segunda, y a medida que los niveles de estrés se intensifican, a causa de los efectos directos que tiene la deshidratación de las células del mesófilo sobre la bioquímica fotosintética (Kaiser, 1987; Smirnov, 1993; Cornic, 2000; Lisar *et al.*, 2012). Además, si a esto se le suma que en la naturaleza es común que el déficit hídrico ocurra por largos periodos y en compañía de la luz solar (Osmond *et al.*, 1980), las repercusiones que éste tiene sobre dichos procesos no

son las únicas consecuencias que trae consigo. Concretamente, la ineficiencia con la cual la energía lumínica absorbida es utilizada fotoquímicamente bajo condiciones de escasez de agua, puede hacer que hasta una intensidad lumínica óptima se vuelva saturante para el aparato fotosintético. Y si a esto se le suma que, por lo general, las plantas reciben y capturan más luz de la que realmente requieren para llevar a cabo la asimilación de CO₂ (Müller *et al.*, 2001; Ort, 2001), entonces la conjunción de ambos estreses se vuelve altamente perjudicial para ellas. Cuando la energía lumínica es absorbida en exceso, es primordialmente disipada por medio de un aumento en la tasa con la cual los electrones están siendo transportados lejos del fotosistema II (FSII) con dirección al metabolismo del carbono, así como también, por medio de un incremento en la eficiencia con la que está siendo transformada y disipada como calor (Osmond *et al.*, 1997). Sin embargo, como el déficit hídrico afecta indirecta (cierre estomático) y directamente (pérdida del turgor celular) la tasa de asimilación de CO₂, y como la proporción de fotones absorbidos que es térmicamente disipado a menudo llega a un máximo antes de que las irradianzas saturantes sean alcanzadas (Ort & Baker, 2002), entonces la disipación fotoquímica asimilativa y no fotoquímica de energía no son suficientes para la fotoprotección. Es por esto que vías alternativas de disipación de energía se vuelven cruciales para manejar el exceso de irradianza (Müller *et al.*, 2001; Ort & Baker, 2002; D`Ambrosio *et al.*, 2006). No obstante, algunas de éstas utilizan al oxígeno molecular (O₂) como aceptor final de electrones (Mehler, 1957; Asada, 1999; 2000). Así, y si los niveles de estrés hídrico se intensifican haciendo que la intensidad lumínica se vuelva aún más saturante para el aparato fotosintético, la sobregeneración de especies reactivas del oxígeno (EROs) puede superar la capacidad de detoxificación por parte del sistema antioxidante. Esto finalmente puede traducirse en la generación de cascadas oxidativas severas (estrés oxidativo) que dañan gran

parte de los componentes celulares y que pueden provocar incluso la muerte del vegetal (Miittler, 2002). Es por todo esto que la disponibilidad de agua es uno de los principales factores que limitan el crecimiento, supervivencia, producción y distribución geográfica de las diversas especies vegetales al ser éstas sensibles a la deshidratación (Levitt, 1980; Lawlor, 2002; Touchette *et al.*, 2007; Jaleel *et al.*, 2009). A pesar de dicha sensibilidad, la gran mayoría es capaz de tolerar situaciones de déficit hídrico que se encuentren dentro de los rangos considerados como “**suave**”, con un contenido relativo de agua en sus tejidos (CRA) entre 90-70%, y “**moderado**”, con un CRA entre 70-30% (Smirnoff, 1993; Hoekstra *et al.*, 2001). Estas plantas son consideradas como “tolerantes a la sequía” (Hoekstra *et al.*, 2001). Sin embargo, existe un grupo minoritario de especies que son capaces de tolerar condiciones de déficit hídrico extremo o “**severo**” (CRA < 30%). Bajo esta situación, la deshidratación celular es tan intensa que provoca que la capa de hidratación de las moléculas sea gradualmente perdida. Las especies que conforman este grupo son conocidas como plantas “tolerantes a la desecación” (Hoekstra *et al.*, 2001).

I.1. Tolerancia a la desecación

La tolerancia a la desecación puede ser básicamente definida como la capacidad de un organismo para equilibrar su potencial hídrico interno con aquel del aire desecante y luego recuperarse de la casi completa pérdida del agua protoplasmática (80-95%) tras su rehidratación (Alpert, 2000; Oliver *et al.*, 2000; Rascio & La Rocca, 2005). Este mecanismo requiere de una notable tolerancia a la deshidratación celular, capacidad que en la gran mayoría de las plantas superiores se encuentra restringida sólo a las estructuras reproductivas, polen, esporas y semillas. Sin embargo, y contrario a lo que generalmente se cree, la capacidad para sobrevivir a la desecación en el estado vegetativo adulto está

ampliamente representada entre los distintos taxa del reino vegetal, siendo bastante común en los clados menos complejos que constituyen algas, líquenes y briófitos, pero rara en pteridófitas y angiospermas. Específicamente, cerca de 330 especies entre pteridófitas y angiospermas son capaces de sobrevivir a la desecación, constituyendo éstas el 0,02% del total de plantas vasculares (Alpert 2000; Alpert & Oliver *et al.* 2002). Tales cifras incluyen especies de cinco familias de pteridófitas (Actioniopteridaceae, Aspleniaceae, Pteridaceae, Selaginellaceae y Sinopteridaceae), cinco familias de monocotiledóneas (Boryaceae, Cyperaceae, Poaceae, Schizaeaceae y Velloziaceae), y tres familias de dicotiledóneas (Gesneriaceae, Myrothamnaceae y Scrophulariaceae) (Porembski, 2000).

Los organismos vegetales que son capaces de sobrevivir a la desecación son conocidos como **“plantas de resurrección”** (Gaffit, 1971). Éstos pueden ser divididos en “completamente tolerantes”, si su tolerancia es constitutiva y no afectada por la tasa de desecación, y en “tolerantes modificadas”, si su tolerancia es inducida y se ve afectada por la velocidad con que pierden y ganan agua a través de sus tejidos. Dentro de las primeras, es común encontrar a la mayoría de los briófitos, cuyos representantes se desecan a velocidades extremadamente rápidas (minutos); mientras que dentro de las segundas están las angiospermas, que presentan tasas de desecación muy lentas (días a semanas) debido al control estomático de la pérdida de agua (Oliver & Bewley 1997; Proctor & Pence 2002).

Según Bewley (1979), para que una planta o estructura vegetal pueda sobrevivir a la pérdida severa de agua protoplasmática, debe ser capaz de llevar a cabo tres importantes procesos: (1) limitar el daño sufrido durante la desecación, (2) mantener su integridad celular en el estado desecado, y (3) activar mecanismos de reparación luego de la rehidratación. Estas capacidades de protección y/o reparación celular, están dadas por diversas estrategias que van desde adaptaciones mecánicas y anatómicas como el

plegamiento foliar, la presencia de pelos o tricomas y/o de cutículas gruesas con capas de ceras sobre ellas (Arve *et al.*, 2011); hasta mecanismos fisiológicos y bioquímicos que incluyen, entre otros, la inducción del cierre estomático, la acumulación de azúcares, el desmantelamiento del aparato fotosintético (poikiloclorofilia), la síntesis de diversas proteínas (que protegen a las células durante la desecación o que apoyan la reparación y recuperación de la funcionalidad durante la rehidratación), y la sobreinducción de los sistemas antioxidantes (Alpert, 2000; Mittler, 2002). De los últimos, uno de los que sin duda representa uno de los mecanismos primordiales de protección es el sistema antioxidante vegetal. Esto debido a que la generación normal de especies reactivas del oxígeno durante el metabolismo normal de las plantas, se ve fuertemente incrementada bajo situaciones de déficit hídrico, llegando a ocurrir incluso mucho antes de que los tejidos alcancen contenidos de agua que comprometen la morfología y estructura celular por la pérdida del turgor (Smirnoff, 1993). Por lo tanto, las especies tolerantes a la desecación deben tener mecanismos que prevengan la sobregeneración de EROs o sistemas eficientes que los detoxifiquen y reparen el daño causado durante la desecación y las primeras horas de la rehidratación.

I.2. Especies reactivas del oxígeno (EROs)

Como es sabido, una consecuencia inevitable del metabolismo aeróbico es la producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) (Asada & Takahashi, 1987). En su estado triplete basal, el O_2 es relativamente no reactivo debido a que sus dos electrones de valencia en el orbital más externo, se encuentran desapareados y con sus spins paralelos (Eltner, 1987; Edreva 2005) (Fig. 1).

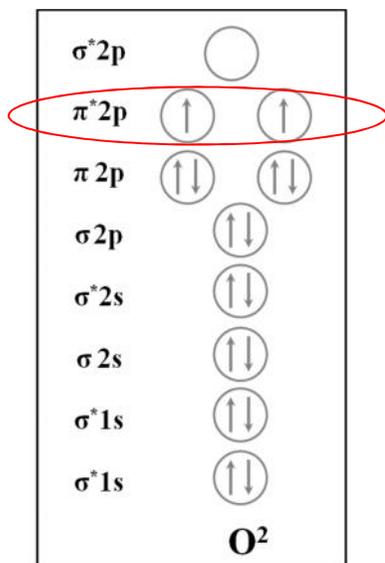


Figura 1. Estado basal del oxígeno molecular con sus electrones de valencia en orbital más externo desapareados y con sus spins paralelos (enmarcado con óvalo rojo).

Tal situación restringe la aceptación de dos electrones a la vez ya que, para que esto ocurra, el O₂ necesita reaccionar con un átomo o molécula que posea un par de electrones con spins paralelos (triplete) y en sentido opuesto a los que él contiene, lo cual es poco frecuente en biomoléculas que tienden a poseer una configuración antiparalela en sus electrones de los orbitales externos (o estado de singlete) (Apel & Hirt, 2004). A pesar de este fenómeno conocido como “restricción de spin”, los organismos aerobios constantemente utilizan el O₂ como aceptor final de electrones en sus procesos metabólicos, estimándose que alrededor del 1% del O₂ consumido por las plantas es desviado para este propósito (Edreva, 2005; Karuppanpandian *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2012). Esto debido a que el O₂ es capaz de reaccionar con otras moléculas que contengan spins antiparalelos favoreciendo los intercambios de un electrón (Mittler *et al.*, 2004; Scandalios, 2005). Dichas reacciones de reducción monoelectrónica dan paso a la generación de

intermediarios del oxígeno parcialmente reducidos y de alta reactividad conocidos como EROs, los cuales pueden ser de tipo radical libre y no radical (Edreva, 2005). Dada su gran reactividad, cuando las EROs se encuentran en altas concentraciones pueden atacar (oxidar) virtualmente a todas las macromoléculas (Karuppanapandian *et al.*, 2011). Esto resulta en severos daños a los componentes celulares, tales como: lipoperoxidación de componentes de membranas, oxidaciones de grupos prostéticos metálicos de enzimas, oxidaciones de pigmentos fotosintetizadores, lesiones al ADN y mutaciones; lo que a menudo conlleva a una disfunción metabólica irreparable y la muerte celular (Halliwell & Gutteridge, 1999; Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004; Adreva, 2005; Karuppanapandian *et al.*, 2011). Entre los distintos tipos de EROs producidas por las plantas, las principales son el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Edreva, 2005; Sharma *et al.*, 2012). El primero se forma por la absorción de energía suficiente para invertir el spin de uno de los electrones desapareados del O_2 (Fig. 2); mientras que los otros tres se generan por medio de transferencias sucesivas de electrones y/o protones, las que a su vez dan paso a la formación de dos moléculas de H_2O (Edreva, 2005) (Fig. 3).

Dado que las EROs son subproductos normales de varios procesos metabólicos, su generación tiene lugar en distintos compartimientos tanto dentro como fuera de las células. Éstos incluyen cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplasmático, apoplasto, membranas plasmáticas y paredes celulares (Corpas *et al.*, 2001; Moller, 2001; del Río *et al.*, 2002; Mittler, 2002; Asada, 2006; Navrot *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2012). No obstante, los principales generadores de EROs bajo condiciones déficit hídrico son los cloroplastos y los peroxisomas, seguidos en tercer lugar por las mitocondrias (Edreva, 2005; Rhoads *et al.*, 2006; Navrot *et al.*, 2007; Karuppanapandian *et al.*, 2011).

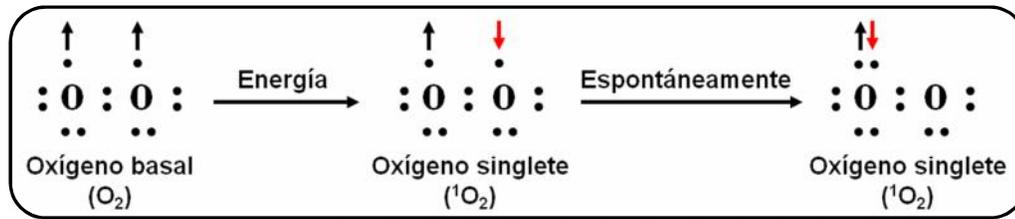


Figura 2. Generación de oxígeno singlete ${}^1\text{O}_2$ a partir del oxígeno molecular (O_2) tras la absorción de energía suficiente para invertir el spin en uno de los electrones desapareados (Extraído y modificado de Edreva, 2005).

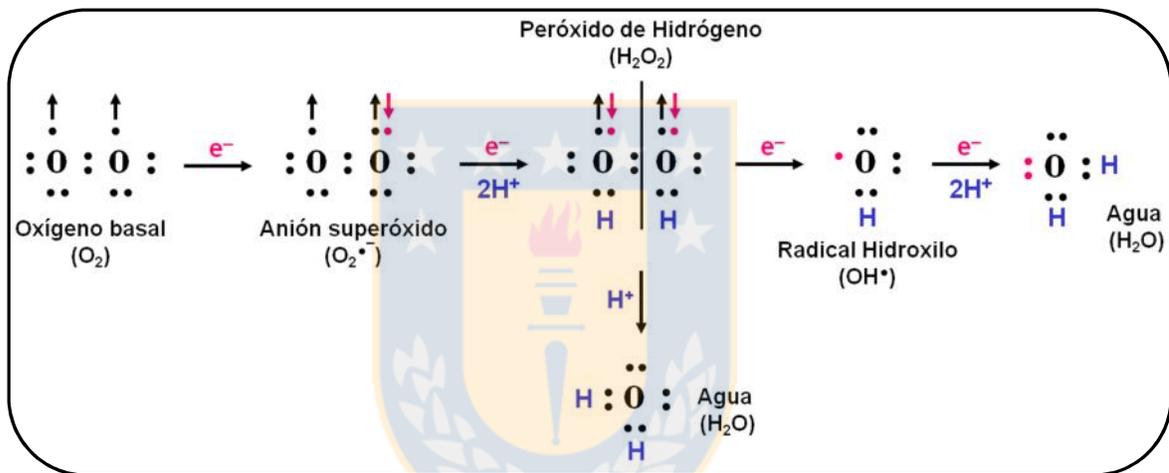


Figura 3. Generación de anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y agua (H_2O) a partir del oxígeno molecular (O_2) y por medio de transferencias sucesivas de electrones y/o protones (Extraído y modificado de Edreva, 2005).

I.2.1. Cloroplastos: La generación de EROs en este organelo ocurre principalmente a nivel de los fotosistemas I y II, producto de un desbalance entre la energía lumínica absorbida y la utilizada a través de la fijación de CO_2 (Edreva, 2005; Asada, 2006; Sharma *et al.*, 2012). Cuando las plantas están expuestas a condiciones ambientales que provocan una limitación en la tasa de asimilación del carbono en el ciclo de Calvin y, por ende, una

limitación en la regeneración de la ribulosa 1,5 bifosfato y del NADP^+ , ocurre una sobreredución de la cadena transportadora de electrones. Esto se traduce en un aumento en la presión de excitación sobre el fotosistema II, situación que a su vez puede llevar a la fotoinhibición y posterior fotodaño del aparato fotosintético (Lawlor & Cornic, 2002; Yuan *et al.*, 2005). Para evitar tales consecuencias, se activan vías primarias de disipación de energía que incluyen mecanismos fotoquímicos no asimilativos (fotorespiración) y no fotoquímicos (pérdida de energía en forma de calor) (Osmond *et al.* 1997; Müller *et al.* 2001). No obstante, en ciertas ocasiones éstos no son suficientes para la fotoprotección, teniendo que entrar en funcionamiento vías alternativas de disipación que utilizan al O_2 como aceptor final de energía y electrones (Niyogi *et al.* 1999; Ort & Baker 2002; D`Ambrosio *et al.* 2006). A nivel del fotosistema II (FSII), los centros de reacción y las moléculas de clorofila en estado triplete excitado ($^3\text{Chl}^*$) pueden transferir su energía a distintas moléculas de O_2 dando paso a la formación del no radical $^1\text{O}_2$; en tanto que las quinonas del lado aceptor al inicio de la cadena (Q_A y Q_B) pueden transferir los electrones recibidos a otras moléculas de O_2 generándose el radical libre O_2^- (Krieger-Liszkay, 2005). Similarmente, a nivel del fotosistema I (FSI) el O_2 puede reemplazar al NADP^+ como aceptor final de los electrones provenientes de la fotólisis del agua y generar, por medio de la reacción de Mehler, O_2^- en vez de NADPH (Fig. 3). Posterior a esto, el O_2^- generado a nivel de ambos fotosistemas puede seguir dos vías y producir otros intermediarios del oxígeno (“EROs secundarios”) que son incluso más peligrosos. Internamente, en el lumen acidificado del tilacoide, el O_2^- puede ser protonado a HO_2 (radical peroxil); o externamente, en el estroma, puede ser rápidamente dismutado a H_2O_2 ya sea de manera espontánea o por medio de la reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Asada, 2000; Alscher *et al.*, 2002; Fryer *et al.*, 2002).

Finalmente, el no radical H_2O_2 recién formado puede, a su vez, seguir otras dos vías y formar O_2 y H_2O en caso de ingresar al ciclo del ascorbato-glutatión o generar a través de la reacción de Fenton la ERO más perjudicial de todas, es decir, el OH^\bullet (Asada, 1999; Dat *et al.*, 2000).

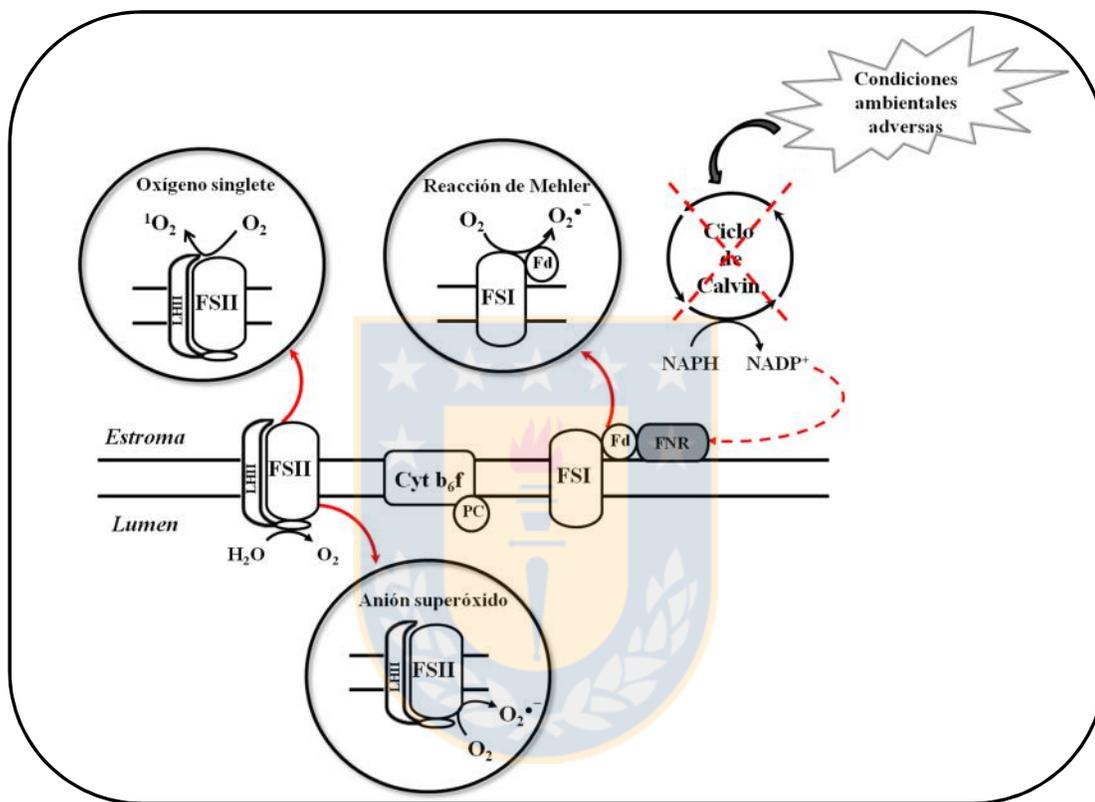


Figura 4. Generación de EROs a nivel de la cadena transportadora cloroplastidial a causa de condiciones ambientales adversas.

I.2.2. Peroxisomas: estos organelos poseen un tipo de metabolismo esencialmente oxidativo. Es por esta razón que bajo condiciones ambientales normales son probablemente el principal sitio de generación intracelular de EROs (del Río *et al.*, 2006; Gill & Tuteja, 2010). Al igual que los cloroplastos y las mitocondrias, los peroxisomas generan, producto de su metabolismo normal, $\text{O}_2^\bullet^-$ y H_2O_2 . Para el caso del radical $\text{O}_2^\bullet^-$, se han identificado

dos sitios de generación (del Río *et al.*, 2002). El primero es en la matriz peroxisomal donde la xantina-oxidasa (XOD) cataliza la oxidación de la xantina o hipoxantina a ácido úrico (Corpas *et al.*, 2001); mientras que el segundo es en las membranas peroxisomales dependientes de NAD(P)H, por medio de una pequeña cadena transportadora de electrones compuesta por una flavoproteína-NADH y el Cyt *b* (Gill & Tuteja, 2010). A su vez, el H₂O₂ producido puede provenir de la α -oxidación de ácidos grasos, las reacciones enzimáticas de las flavin-oxidadas durante la respiración peroxisomal, la dismutación del O₂⁻ y la oxidación del glicolato por acción de la glicolato-oxidasa durante la fotorespiración, proceso que bajo condiciones de déficit hídrico es el principal generador (Huang *et al.*, 1983; Baker & Graham, 2002; Noctor *et al.*, 2002; del Río *et al.*, 2002; 2006; Mittler *et al.*, 2004; Karuppanapandian *et al.*, 2011). Además de las EROs ya especificadas, se ha demostrado que el radical NO (óxido nítrico) también es producido en los peroxisomas, pero más como molécula mensajera que como consecuencia de la disipación de energía (Gill & Tuteja, 2010).

I.2.3. Mitocondrias: Bajo condiciones normales de crecimiento vegetal, la cadena transportadora de electrones mitocondrial y la síntesis de ATP están estrechamente asociadas. Sin embargo, varios factores de estrés pueden llevar a la inhibición y modificación de sus componentes, provocando la sobreredución de los transportadores de electrones y la consecuente formación de EROs (Noctor *et al.*, 2007; Bloquina & Fagerstedt, 2010; Karuppanapandian *et al.*, 2011). Tanto en la región flavoproteica del segmento NADH-deshidrogenasa a nivel del complejo I como en la región ubiquinona-Cyt a nivel del complejo III, se produce O₂⁻ por la reducción directa del O₂ (Dat *et al.*, 2000; Arora *et al.*, 2002; Navrot *et al.*, 2007; Murphy, 2009) (Fig. 4). Posteriormente, y al igual

que lo ocurrido en cloroplastos y peroxisomas, el $O_2^{\cdot -}$ es rápidamente dismutado a H_2O_2 por acción de la manganeso superóxido-dismutasa (MnSOD). Así mismo, el no radical H_2O_2 puede ser removido gracias a la ascorbato-peróxidasa mitocondrial (mitAPX) o reaccionar con iones de Fe^{2+} y Cu^+ a través de la reacción de Fenton, siendo convertido en el extremadamente radical activo OH (Navrot *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2012). A pesar todo lo anterior, la mitocondria no es tradicionalmente considerada como una fuente principal de EROs en las hojas (Möller, 2001; King *et al.* 2004). Esto se debe a que, bajo condiciones lumínicas moderadas y altas, la producción de dichas moléculas en este organelo es entre 30-100 veces más lenta que la de los cloroplastos y peroxisomas (Foyer & Noctor, 2003).

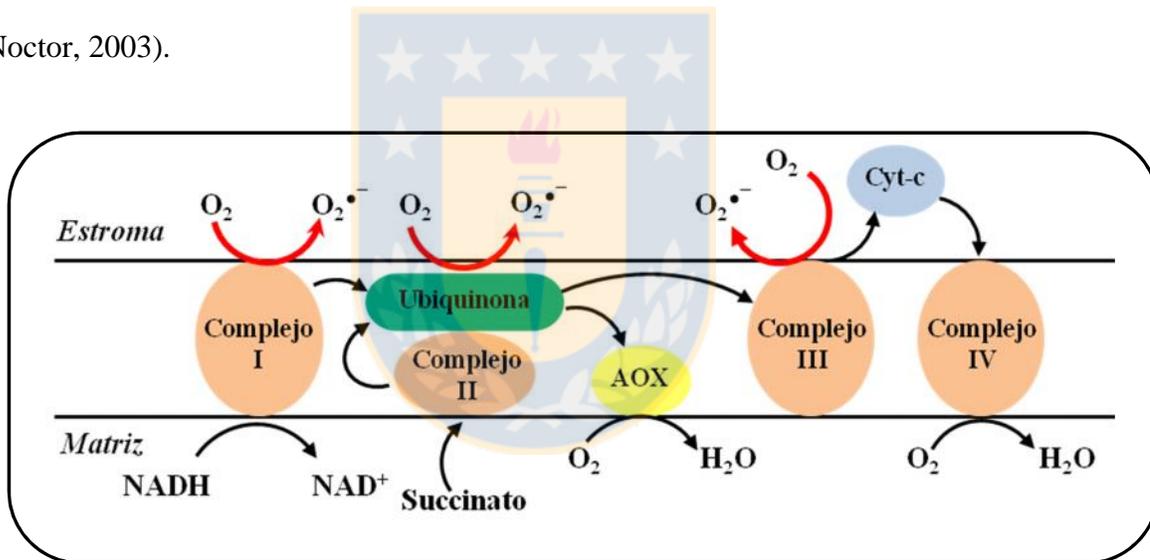


Figura 5. Sitios de generación de EROs en la cadena respiratoria mitocondrial (Extraída y modificada de Mittler 2002).

I.3. Mecanismos de remoción de EROS

Cuando las EROs se encuentran en bajas concentraciones o en niveles levemente incrementados, son esenciales para el metabolismo celular. Esto debido a que actúan como eficientes aceptores de electrones disipando el exceso de energía y/o como moléculas

mensajeras para activar diversas vías de señalización que inducen la expresión de genes involucrados en defensa. Sin embargo, cuando están en mayores concentraciones pueden llegar a ser incluso letales (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2002; Apel & Hirt, 2004; Edreva, 2005). Debido a tal propiedad dual de las EROs, las plantas han desarrollado diversas estrategias para mantener el balance redox al interior de sus células, evitando así los daños producidos ya sea por su carencia o exceso. Tales estrategias consisten en los denominados sistemas antioxidantes o mecanismos de remoción de EROs, los que pueden ser de tipo enzimático y no enzimático (Dat *et al.*, 2000; Mittler, 2000; Arora *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003; Apel & Hirt, 2004; Edreva, 2005). Dentro de los primeros están las enzimas superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT) y peroxirredoxinas (Prxs) (Allen, 1995; Niyogi, 1999; Dietz 2003); mientras que dentro de los segundos se encuentran el ascorbato (AsA), glutatión (GSH), y aquellos considerados en este trabajo de tesis, compuestos fenólicos, tocoferoles y plastocromanol-8 (Rice-Evans *et al.*, 1996; Noctor & Foyer, 1998; Apel & Hirt, 2004; Jaleel *et al.*, 2009). Dichos antioxidantes reaccionan con las EROs, convirtiéndolas en compuestos relativamente estables en presencia del electrón radical. Así, al remover los electrones radicales, los antioxidantes “apagan” las reacciones en cadena y evitan daños mayores como la eventual muerte celular (Vermerris & Nicholson, 2008).

I.3.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados exclusivamente en las plantas a partir de las vías pentosa-fosfato, shikimato y fenilpropanoide (Randhir *et al.*, 2004). Entre sus principales funciones se destacan su participación en el crecimiento y reproducción, protección contra patógenos y herbívoros, y su contribución en la coloración

y características sensoriales de frutas y vegetales (Harborne, 1993; Bravo, 1998; Alasalvar *et al.*, 2001). Además, también participan activamente como moléculas antirradicales y potentes antioxidantes gracias a su potencial redox (Knox & Dodge, 1985; McKersie & Leshem, 1994; Grace & Logan, 2000; Khadem & Marles, 2010; Sharma *et al.*, 2012). Su eficiencia como tales es muy diversa y depende de muchos factores, tales como: concentración, sitio de unión y mutua posición de los grupos hidroxilos unidos al anillo aromático (Sroka & Cisowski, 2003). Pueden ser, en general, clasificados como fenoles simples y polifenoles. Esto depende del número de carbonos constitutivos que poseen en conjunto con la estructura del esqueleto fenólico basal (Rice-Evans *et al.*, 1997; Solecka, 1997; Sgherri *et al.*, 2003). De ambos tipos, los polifenoles (ácidos benzoicos, fenilpropanoides y flavonoides) poseen la estructura química ideal para la actividad de remoción de radicales libres, pudiendo actuar como agentes reductores, protonadores, queladores de metales pesados y “apagadores” del oxígeno singlete (Rice-Evans *et al.*, 1996; Ali & Alqurainy, 2006). Entre los polifenoles que destacan por su actividad antioxidante están los (1) ácidos fenólicos y (2) flavonoides (Halliwell & Gutteridge, 1999; Dixon & Paiva, 1995; Rice-Evans & Miller, 1998; Sroka & Cisowski, 2003)

I.3.1.1. Ácidos fenólicos: Corresponden a aquellos compuestos que como esqueleto basal contienen un anillo fenólico y un ácido carboxílico orgánico (Vermerris & Nicholson, 2006). Sin embargo, el número y ubicación de los grupos hidroxilos que se unen al anillo aromático dan paso a la formación de distintas estructuras que otorgan variedad al grupo (Robbins *et al.*, 2003). En cuanto a su conformación general, se encuentran comúnmente como glicósidos o ésteres en combinación con otros compuestos naturales, tales como: esteroides, alcoholes, glucósidos, ácidos alifáticos o aromáticos y ácidos hidroxilados

(Torres *et al.*, 1987). Como grupo, los ácidos fenólicos han sido reconocidos como eficientes antioxidantes contra varias EROs, pudiendo incluso remover aquellas tan tóxicas como el radical hidroxilo y el oxígeno singlete (Sroka & Cisowski, 2003). De hecho, se sabe que tras su oxidación por otras moléculas presentes en el medio celular debido a alguna situación de estrés, varios ácidos fenólicos y sus derivados contribuyen a las muchas veces indeseable coloración gris, café o verde de algunos productos vegetales (Clarck *et al.*, 1957; Carter *et al.*, 1972).

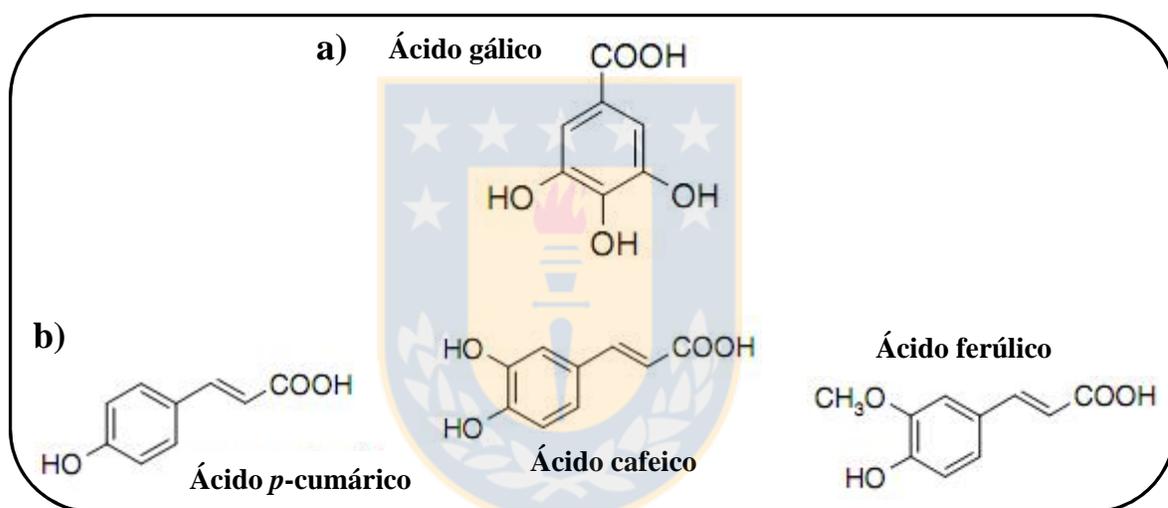


Figura 6. Estructura básica de los ácidos (a) hidroxibenzoicos (ácido gálico) e (b) hidroxicinámicos (ácidos p-cumárico, cafeico y ferúlico) con mayor actividad antioxidante.

I.3.1.2. Flavonoides: son el grupo más común y ampliamente distribuido de los compuestos fenólicos, además de ser el más complejo al incluir más de 9000 moléculas diferentes. Se acumulan comúnmente en la vacuola como glicósidos y su estructura basal (C6-C3-C6) está conformada por dos anillos aromáticos (anillo A y anillo B) unidos por tres puentes de carbono que usualmente es un heterociclo oxigenado (anillo C) (Figura 6) (Ahmad *et al.*, 2009). Los principales tipos de flavonoides conforman 7 grupos (Houghton,

2002; Vermerris & Nicholson, 2006), los cuales, según pruebas *in vitro*, poseen incluso 5 veces más poder antioxidante que el ascorbato (Vitamina C) y el α -tocoferol (Vitamina E) (Rice-Evans *et al.*, 1997). Asimismo, estudios han demostrado que los compuestos fenólicos, y especialmente los flavonoides, son capaces de alterar las cinéticas de peroxidación por medio de la modificación del orden de empaquetamiento de los lípidos y la estabilización de las membranas al disminuir su fluidez, impidiendo esto la difusión de radicales libres (Arora *et al.* 2000; Blokhina *et al.* 2003; Verstraeten *et al.* 2003). Entre los flavonoides que destacan por su capacidad antioxidante están los flavonoles (kaempferol, quercetina y miricetina) y los flavanoles (catequina, epicatequina) (Halliwell & Gutteridge, 1989; Dixon & Paiva, 1995; Bors *et al.*, 1996; Rice-Evans & Miller, 1998).

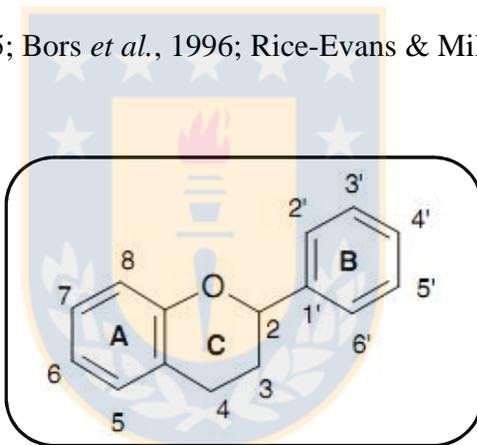


Figura 7. Estructura genérica de una molécula flavonoide (Extraído de Balasundram *et al.*, 2006).

En general, muy pocos trabajos han explorado el rol de los flavonoides y ácidos fenólicos en la tolerancia a la desecación. Entre ellos está el estudio de Sgherri *et al.* (2004) en individuos de *Ramonda serbica*. Durante la deshidratación, los contenidos de ácidos fenólicos totales disminuyeron en esta especie desde 2,7mg/gPS en las hojas completamente hidratadas a 0,9 mg/gPS en aquellas más desecadas. No obstante, volvieron a aumentar hasta en un 300% tras 5 horas de rehidratación, alcanzando los valores iniciales

luego del término de dicho tratamiento (48 horas). Similarmente, Djilianov *et al.* (2011) reportaron que en individuos de *Haberlea rhodopensis* sometidos a tratamientos de desecación y rehidratación bajo $75\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de irradianza, los contenidos de compuestos fenólicos totales disminuyeron casi 2 veces desde el 92% hasta el 35% de contenido relativo de agua (CRA) en comparación con los individuos control, para luego aumentar por más de 4 veces desde el CRA 35% hasta el CRA 12%. Posteriormente en la rehidratación, los contenidos disminuyeron gradualmente desde el inicio (CRA 12%) hasta el término de la misma (CRA 92%) en donde alcanzan valores similares a los iniciales y de las plantas control. En otro estudio, Moore *et al.* (2005) documentaron que los contenidos del polifenol principal en *Myrothamnus flabellifolius*, el ácido 3,4,5-tri-*O*-galoiloquínico, incrementaron casi un 40% en hojas deshidratadas, sugiriendo esto un posible rol en la protección de dicha especie contra la desecación, específicamente a nivel de las membranas biológicas. Así en el mismo estudio, y tras la utilización de un sistema membranoso artificial al cual se le agregó distintas cantidades del ácido en cuestión, los autores constataron que efectivamente protegió a los liposomas de la membrana contra la desecación. Finalmente, Živkovic *et al.* (2010) reportaron que durante la desecación del helecho *Asplenium ceterach* se observó una disminución en los contenidos de los ácidos fenólicos principales de esta especie, los ácidos clorogénico y cafeico, de aproximadamente el doble que los valores registrados para los controles no deshidratados. No obstante, bajo condiciones hidratadas los contenidos de los dos ácidos difirieron enormemente entre sí, siendo los contenidos del ácido cafeico 45 veces menores que los del ácido clorogénico.

I.3.2. Tococromanoles

Los tococromanoles son un grupo de moléculas anfipáticas constituido

mayoritariamente por tocoferoles y tocotrienoles, y minoritariamente por el plastocromanol-8 y sus derivados. Los dos primeros son producidos en diferentes niveles y en varias combinaciones por todos los tejidos vegetales y algunas cianobacterias (DellaPenna & Pogson, 2006); en tanto que el tercero sólo ha sido detectado en tejidos foliares, semillas y frutos (Wittle *et al.*, 1965; Zbierzak *et al.*, 2010). De los órganos donde están presentes, los tococromanoles son particularmente importantes en hojas y semillas, pues les proporcionan protección antioxidante. Su estructura molecular les permite interactuar con los grupos acil poliinsaturados, protegiendo a los lípidos de membrana (especialmente ácidos grasos poliinsaturados) del daño oxidativo mediante la remoción de los radicales peroxilípidos y/o a través del apagamiento o remoción del $^1\text{O}_2$ (Kruk *et al.*, 2005; DellaPenna & Pogson, 2006).

I.3.2.1. Tocoferoles: son moléculas liposolubles isoprenoides sintetizadas exclusivamente por plantas vasculares, algas y algunas cianobacterias (Munné-Bosch, 2005; DellaPenna & Pogson, 2006). Su biosíntesis tiene lugar en los plástidos (amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos), y ocurre como resultado de la combinación de las vías del shikimato e isoprenoide al condensarse los respectivos ácido homogentísico (HGA) y fitil difosfato (PDP), acción que es catalizada por la enzima fitil transferasa (Cahoon *et al.*, 2003; Munné-Bosch, 2005). Existen 4 tipos de tocoferoles: α -, β -, γ - y δ - tocoferol. Cada uno de ellos está conformado por un anillo polar de cromanol y una cadena lateral poliprenil saturada (lipofílica) (Fig.8a), diferenciándose entre sí sólo por la cantidad y posición de los grupos metilos que contiene el anillo aromático (Fig.8b) (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Munné-Bosch & Falk, 2004; DellaPenna & Pogson, 2006).

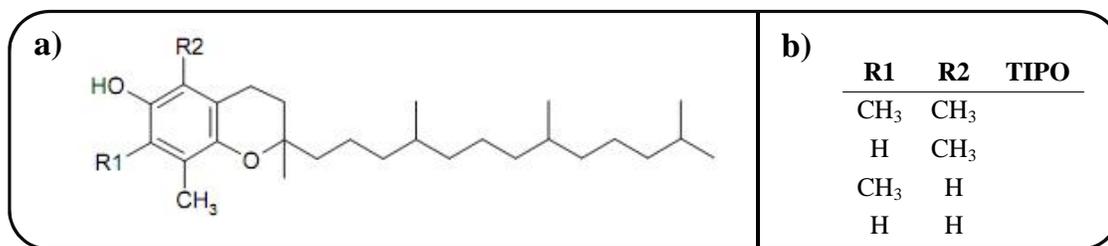


Figura 8. Estructura básica (a) y tipos de tocoferoles (b) (Extraído de Falk & Munné-Bosch, 2010).

La función principal de estos compuestos es la del control de la peroxidación lipídica no enzimática que puede afectar tanto a lípidos libres como a aquellos que conforman las membranas celulares (Liebler, 1993). Esto lo logran gracias a su excelente actividad antioxidante, la cual radica en la capacidad de su anillo heterocíclico de cromanol para donar el hidrógeno fenólico a los radicales peroxilípidos, reduciéndolos a los hidroperóxidos correspondientes (Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996; Münné-Bosch & Alegre, 2002; Sattler *et al.*, 2004). Además la presencia de dobles enlaces conjugados en su estructura molecular, los cuales son requeridos para “apagar” físicamente al ¹O₂ por medio de la facilitación de la transferencia de energía y la disipación de calor (Peñuelas & Munné-Bosh, 2005), los convierte en excelentes moléculas fotoprotectoras. Estas propiedades, en conjunto con que las hojas son unos de los dos órganos vegetales que contienen mayor contenido de tocoferoles (especialmente -tocoferol), los sitúan como unos de los principales antioxidantes en los cloroplastos (Fryer, 1992; Münné-Bosch & Alegre, 2002). Específicamente en estos últimos, se encuentran presentes en la envoltura, membranas tilacoidales y plastoglobulos. Entre la primera y las segundas están distribuidos de forma aproximadamente igual (Maeda & DellaPenna, 2007); en tanto que en los terceros se encuentran alrededor de 1/3 de los tocoferoles totales (Austin *et al.*, 2006; Vidi *et al.*,

2006). Tal distribución les permite contribuir en la estabilización de las membranas tilacoidales (Wang & Quinn, 1999), otorgar protección a las mismas y al FSII contra los efectos deletéreos del $^1\text{O}_2$ sobreproducido bajo condiciones de estrés foto-oxidativo severo (Munné-Bosch & Alegre, 2002; Havaux *et al.*, 2005; Kruk *et al.*, 2005; Krieger-Liszkay & Trebst, 2006), y participar (eventualmente) en el transporte cíclico de electrones alrededor del FSII (Munné-Bosch & Alegre, 2002).

La síntesis de tocoferoles foliares puede cambiar en respuesta a diferentes situaciones de estrés (Munné-Bosch, 2005; Maeda & DellaPenna, 2007). Este es el caso de lo ocurrido con los contenidos de tocoferoles totales en plantas de tabaco (Tanaka *et al.*, 1999), y con los niveles de α -tocopherol en *Arabidopsis thaliana* (Porfirova *et al.*, 2002; Collakova & DellaPenna, 2003b; Szymánska & Kruk, 2010), los cuales aumentaron tras la exposición de los respectivos individuos a intensidades lumínicas altas. Similarmente, también se han constatado incrementos en los niveles de α -tocopherol por efecto de la sequía en *Rosmarinus officinalis* (Munné-Bosch *et al.*, 1999), *Arabidopsis thaliana*, tabaco, salvia y toronjil (Munné-Bosch & Alegre, 2003; Liu *et al.*, 2008). No obstante el aumento en algunas especies de dicha forma de tocoferol, también se han evidenciado disminuciones tanto por acción de la irradianza como por efecto del déficit hídrico. De hecho dentro de este último se encuentran los únicos datos concernientes a plantas de resurrección. Se ha reportado que en *Myrothamnus flabellifolius* existe una disminución en la concentración del α -tocopherol conforme aumenta el grado de desecación; mientras que los contenidos de β -tocopherol exhiben un decaimiento menos pronunciado. Posteriormente, tras la rehidratación desde un estado de desecación severo, se constató una rápida recuperación de los niveles de α -tocopherol; en tanto que los de β -tocopherol no exhibieron mayores cambios (Kranner *et al.*, 2002).

cantidad en los tilacoides y en concentraciones mucho menores en las membranas de la envoltura (Zbierbak *et al.*, 2010). Tanto por su estructura molecular como por su muy probable ubicación hacia más al interior de las membranas tilacoidales, se cree que el PC-8 colabora con el α -tocoferol y el plastoquinol-9 en la protección del aparato fotosintético contra el estrés foto-oxidativo (Menè-Saffrané *et al.*, 2010; Szymanska & Kruk, 2010; Nowicka *et al.*, 2013). De hecho, existe evidencia *in vitro* que señala que en medios polares el PC-8 tiene una actividad antioxidante comparable con la de los tocoferoles (Olejnik *et al.*, 1997; Gruzka *et al.*, 2008; Nowicka *et al.*, 2013); siendo ésta incluso mejor en medios apolares gracias a la presencia de dobles enlaces conjugados en su larga cadena lateral (Gruzka *et al.*, 2008; Nowicka *et al.*, 2013). Así, una diferencia importante entre los tocoferoles y el PC-8 en cuanto a actividad antioxidante se refiere, es que en este último no sólo el anillo aromático es activo en el proceso de apagamiento del $^1\text{O}_2$ sino que también lo es su cadena lateral (Szymanska & Kruk, 2010).

Aunque se ha comprobado la acción antioxidante *in vitro* del PC-8 en membranas artificiales (Nowicka *et al.*, 2013), así como también, la presencia de dicho compuesto en plantas que habitan lugares extremos (Strzalka *et al.*, 2011), hasta la fecha prácticamente no existen trabajos que vinculen a este compuesto con la protección antioxidante de plantas expuestas a condiciones de estrés ambiental. De hecho la única información disponible comprende a lo más tres estudios realizados con *Arabidopsis thaliana* “tipo salvaje”, “transgénicas” y “mutantes”. Específicamente, Zbierzak *et al.* (2010) constataron efectos de la intensidad lumínica en los contenidos de PC-8 al detectar contenidos aproximadamente 3 veces más altos en individuos que tras crecer a irradianza baja ($120\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) por un largo periodo fueron luego expuestos por 4 días a irradianza alta ($600\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Por otro lado, Szymanska *et al.* (2010) detectaron el producto resultante de la oxidación del

PC-8 por el oxígeno singlete, el hidrox-plastocromanol (PC-OH) (Gruska *et al.*, 2008), en plantas que habían crecido en baja ($100\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y alta intensidad lumínica ($380\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Según los autores, el PC-OH encontrado en los respectivos individuos pudo ser el resultado de la oxidación del PC-8 cloroplastidial por el $^1\text{O}_2$ generado en el FSII durante el proceso fotosintético, lo cual estaría avalado por los mayores niveles de PC-OH detectados en aquellas *Arabidopsis* aclimatadas a alta irradianza como por las mayores concentraciones de $^1\text{O}_2$ y de malondialdehído (producto secundario de la peroxidación de lípidos) detectadas por Rastogi *et al.* (2014) en mutantes de *A. thaliana* que carecen de tocoferol o de PC-8 y que fueron expuestas a condiciones de alta irradianza.

I.4. Estrés oxidativo y sus principales blancos en plantas

El estrés oxidativo es la consecuencia directa del desbalance entre la generación de EROs y su remoción por parte de la defensa antioxidante, lo cual conlleva a la acumulación de dichas moléculas y al inicio de cascadas oxidativas descontroladas (Noctor & Foyer, 1998; Möller, 2001; Apel & Hirt, 2004; Cruz de Carvalho, 2008). Dado que la mayoría de las EROs son generadas en los cloroplastos durante el transporte fotosintético de electrones, es natural que los componentes plastídicos se conviertan en los blancos preferidos del daño oxidativo. Así, y a pesar de ser una de las menos dañinas, el O_2^- ataca predominantemente los compuestos que contienen dobles enlaces como lo son los ácidos grasos insaturados y las moléculas de clorofilas, reaccionando también con aminoácidos aromáticos como la tirosina en la proteína D_1 , y destruye los complejos hierro-azufre de las metaloproteínas, en particular los centros [4Fe-4S] presentes en muchas hidrolisas. Por su parte, el H_2O_2 inactiva numerosas enzimas claves del ciclo de Calvin, enzimas que contienen F_2^{2+} , enzimas de otras vías metabólicas por oxidación de los tioles funcionales, y las proteínas

D₁/D₂ y cluster de Mn en el PSII, además de tener la capacidad de peroxidar lípidos y pigmentos (Asada, 1999; Niyogi, 1999; Zhang *et al.*, 2003). De igual forma, aunque siendo más dañino que las EROs ya mencionadas y ocupando el segundo lugar en cuanto a toxicidad se refiere, el ¹O₂ produce la degradación de la clorofila y otros pigmentos fotosintéticos, la destrucción de la proteína D₁ del PSII y la formación de radicales orgánicos en los lípidos de membrana, particularmente aquellos con enlaces insaturados (Aro *et al.*, 1993; Niyogi, 1999). Por último, y como la ERO más tóxica de todas, el OH reacciona con cualquier grupo electrofílico ubicado en su proximidad y, dado que su formación requiere de un ion ferroso, la mayor parte del daño tiene lugar en sitios de unión con este metal a biomoléculas, pudiendo iniciar así la peroxidación de lípidos, provocar daños en el ADN y ARN, y en proteínas como la rubisco y la glutamina-sintetasa, entre otras (Fridovich, 1998; Palatnik *et al.*, 1999).

I.5. La familia Hymenophyllaceae

La familia Hymenophyllaceae Link. es una de las más primitivas dentro de los helechos leptosporangiados (Pryer *et al.*, 1995), siendo además la más grande y diversa con alrededor de 630 especies (Lellinger, 1994; Pryer *et al.*, 1995; Kenrick & Crane, 1997). Entre éstas, existe una marcada diversidad en términos de morfología con frondes pequeñas a medianas (1-40cm de largo), simples a altamente divididas, mono o dimórficas, rizomas cortos o largos rastreros y raíces robustas o sin ellas. Su requerimiento de hábitat también es variable, reportándose especies terrestres, epífitas y/o epipétricas, hemi-epífitas y trepadoras (Dubuisson, 1997; Dubuisson *et al.*, 2003). Una de las características más llamativas de este grupo, y a la cual deben su denominación de “helechos película”, es la presencia de frondas monolaminares o con pocas capas de células (Tryon & Tryon, 1982).

Esto trae como consecuencia la carencia de epidermis diferenciada y estomas, particularidades anatómicas que, junto con la ausencia de cutícula (o presencia de una muy reducida), los hace dependientes de una alta humedad relativa al no tener barreras que eviten la pérdida de agua desde sus tejidos (Krömer & Kessler, 2006). Por esta razón, los helechos película son altamente hidrófilos y, en general, percibidos como plantas de constante humedad, habitando dentro de los bosques en lugares de sombra profunda (Gessner, 1940; Richards & Evans, 1972; Kelly, 1985; Hietz & Hietz-Seifert, 1995; Johnson *et al.*, 2000; Zotz & Büche, 2000; Dubuisson *et al.*, 2003; Proctor, 2003).

En cuanto a su distribución geográfica, la familia se encuentra presente en casi todo el mundo desde regiones tropicales húmedas, donde presenta su mayor diversidad y abundancia, hasta regiones oceánicas con altas precipitaciones ubicadas en latitudes templadas como lo son las islas Macaronésicas y las regiones costeras atlánticas del oeste de Europa, sur de Chile, Nueva Zelanda y sureste de Australia (Tryon & Tryon, 1982; Iwatsuki, 1990; Proctor, 2012). Específicamente, los géneros *Hymenophyllum* Smith., *Trichomanes* L. y *Serpyllopsis* Van den Bosch., están distribuidos predominantemente en los trópicos de ambos hemisferios, aunque también se extienden hacia Norteamérica, Sudamérica, Nueva Zelanda y Japón. Así mismo, existen otros géneros como *Cardiomanes* Presl. e *Hymenoglossum* Presl. que son endémicos de Nueva Zelanda y Chile, respectivamente (Holloway, 1923; Rodríguez, 1995). En nuestro país, los helechos película se encuentran desde los 36° hasta los 56°S, aunque con algunos representantes más al norte en el área de los bosques relictos de Fray Jorge (30°S) y en el Archipiélago de Juan Fernández. Sin embargo, su mayor diversidad y abundancia se encuentran en los bosques del sur, en los cuales se han identificado hasta 22 especies que incluyen los géneros *Hymenophyllum*, *Trichomanes*, *Serpyllopsis* e *Hymenoglossum* (Rodríguez, 1995; Parra *et*

al., 2012).

I.6. Antecedentes y problemática de estudio

Como ya se mencionó, los helechos película son ecofisiológicamente percibidos como plantas de constante humedad, habitando dentro de los bosques en lugares de sombra profunda (Gessner, 1940; Richards & Evans, 1972; Kelly, 1985; Hietz & Hietz-Seifert, 1995; Johnson *et al.*, 2000; Zotz & Büche, 2000; Dubuisson *et al.*, 2003; Proctor, 2003). Esta percepción se debe a que tanto su diversidad como abundancia aumentan considerablemente en los estratos medios e inferiores del bosque, donde la humedad relativa es muy alta y la intensidad lumínica es muy baja (Kelly, 1985; Hietz & Hietz-Seifert, 1995; Andrade & Novel, 1997; Zotz & Büche, 2000; Kelly *et al.*, 2004; Arévalo, 2006). No obstante, diversos autores han señalado la habilidad de algunas especies de habitar los estratos superiores del dosel, con la disminución de la humedad relativa e incremento en la intensidad lumínica que esto conlleva (Parker, 1995). Algunos ejemplos lo constituyen especies de *Hymenophyllum s.l.* y *Trichomanes s.l.* que alcanzan alturas por sobre los 25m en forófitos de bosques tropicales de Panamá (Zotz & Buche, 2000), Venezuela (Engwald, 1999) y Costa Rica (Grayum & Churchill, 1989), de bosques montanos y submontanos de Bolivia (Kröemer & Kessler, 2006), y de un bosque nuboso de Colombia (Van Leerdam *et al.*, 1990). Tal explotación diferencial de micronichos en el hospedero ha llevado al reconocimiento de un patrón de distribución vertical de las himenofiláceas en el bosque, el cual estaría explicado por distintos grados de tolerancia ambiental entre las especies (Shreve, 1911; Holloway, 1923a; Dickinson, 1993; Zotz & Buche, 2000; Parra *et al.*, 2009). Esto último ha sido corroborado por Evans (1964), Richard & Evans (1972) y Proctor (2003), quienes al estudiar comparativamente las

respuestas a la desecación y a la luz de *Hymenophyllum tumbridgense* (L.) Sm., de distribución más diseminada y localizada en sitios húmedos oceánicos resguardados, e *Hymenophyllum wilsonii* Hook., de distribución más amplia y expuesta a la irradianza; concluyeron que aunque ambas especies poseen una tolerancia a la desecación considerable y bajos puntos de saturación lumínica, la primera posee menor tolerancia a la desecación prolongada y menores requerimientos lumínicos para la fotosíntesis. Similarmente, Parra *et al.* (2008, datos sin publicar) y Parra *et al.* (en preparación), también obtuvieron discrepancias al comparar la tolerancia a la desecación y los requerimientos lumínicos de dos especies de distribución vertical contrastante en un bosque templado-lluvioso del sur de Chile: *Hymenoglossum cruentum* (Cav.) Presl, restringido bajo los 60cm en el hospedero o en sitios preferentemente sombríos, e *Hymenophyllum dentatum* (Cav.), ampliamente distribuido hacia alturas mayores en el hospedero o en sitios más expuestos a la luz solar. Dentro de sus resultados destaca que de ambas especies, *H. cruentum* es la que exhibió los rendimientos cuánticos máximos del FSII (F_v/F_m) más bajos al recuperar el CRA 50% durante la rehidratación (*H. cruentum* $F_v/F_{mCRA50\%}$: 0,320 v/s *H. dentatum* $F_v/F_{mCRA50\%}$: 0,700), los mayores daños visibles tras la rehidratación (Fig. 10), y los menores puntos de saturación lumínica en estado completamente hidratado (*H. cruentum* $I_s = 24,6 \pm 0,13 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ v/s *H. dentatum* $I_s = 40,5 \pm 2,9 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

A pesar de que los resultados anteriormente expuestos confirman tanto la existencia de distintos grados de tolerancia a la desecación como de discrepancias en los requerimientos lumínicos de himenofiláceas que discrepan en su amplitud ecológica, aún no existe ningún estudio que indague en los mecanismos o procesos fisiológicos que subyacen tales diferencias. Por esta razón, y considerando los resultados obtenidos

previamente por Parra y colaboradores para dos de las especies de helechos película presentes en los bosques templado-lluviosos del sur de Chile, así como también, que la generación excesiva de EROs es una de las principales consecuencias del déficit hídrico en presencia de luz (Dinakar *et al.*, 2001), el presente trabajo de tesis estuvo enfocado en evaluar la implicancia de la protección antioxidante en la tolerancia a la desecación de dos Hymenophyllaceae que difieren en sus preferencias de microhábitat en un bosque templado-lluvioso del sur de Chile, así como también, si dicha tolerancia se ve afectada por la intensidad lumínica incidente.

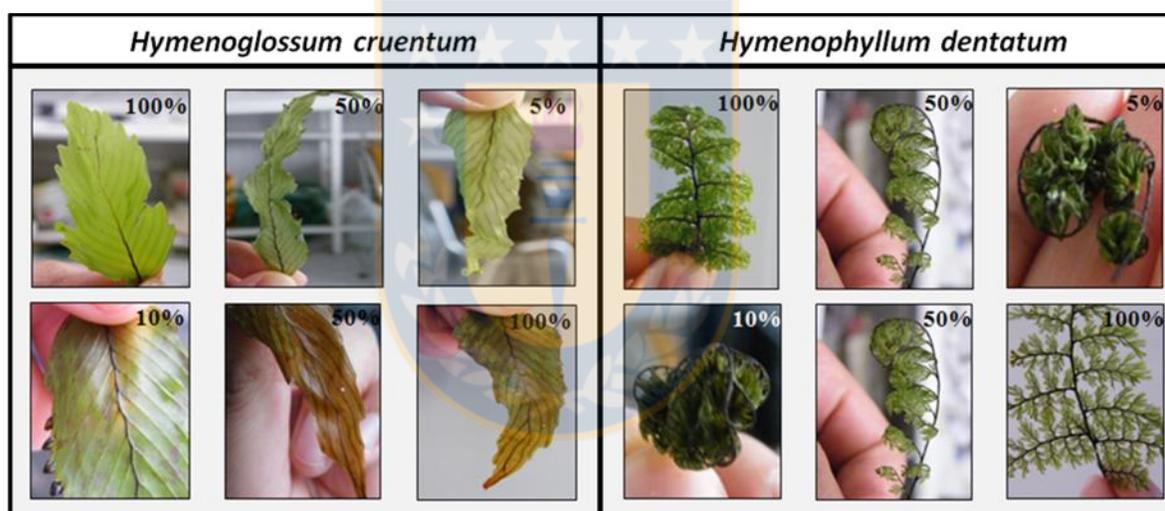


Figura 10. Aspecto de las frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a desecación (paneles superiores) y rehidratación (paneles inferiores). Los porcentajes indican el contenido relativo de agua (CRA) en el tejido foliar al inicio de los tratamientos (100% y 10%, respectivamente), transcurrido un tiempo (50%) y al término de los mismos (5% y 100%, respectivamente) (Parra *et al.* 2008, datos sin publicar).

II. HIPÓTESIS

A fin de dilucidar la relación entre la protección antioxidante y las diferencias en

tolerancia a la desecación y requerimientos lumínicos de dos Hymenophyllaceae que discrepan en sus preferencias de microhábitat en un bosque templado-lluvioso del sur de Chile, se postulan las siguientes hipótesis:

1. Las diferencias en tolerancia a la desecación entre *H. cruentum* y *H. dentatum* se deben a que la primera posee menor capacidad de protección antioxidante que la segunda, lo cual compromete dicha tolerancia sobre todo bajo condiciones lumínicas que superan sus óptimos fotosintéticos.
2. El déficit hídrico extremo tiene un efecto negativo en la protección antioxidante de *H. cruentum* al disminuir con la desecación, y más aún con la rehidratación, la capacidad contenida en sus frondes para remover las EROs sobreproducidas durante dichas etapas.
3. El pardeamiento intenso exhibido por *H. cruentum* tras su rehidratación en experimentos anteriores, se debe a que, junto con menores contenidos de antioxidantes liposolubles que otorguen mayor protección a las membranas celulares frente al estrés oxidativo, posee también mayores concentraciones constitutivas y/o inducidas de compuestos fenólicos potencialmente oxidables durante el reingreso del agua a los tejidos.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general:

Establecer el rol de la protección antioxidante en la tolerancia a la desecación exhibida por dos especies de helechos película que difieren en sus preferencias de

microhábitat en un bosque templado-lluvioso del sur de Chile.

III.2. Objetivos específicos:

1. Constatar si la capacidad de protección antioxidante de ambos helechos coincide con las diferencias en preferencias de microhábitat de ambos helechos.
2. Evaluar los efectos del estado hídrico foliar y de la intensidad lumínica tanto en la capacidad de protección antioxidante como en la concentración de compuestos fenólicos totales, flavonoides y ácidos fenólicos de las plantas en cuestión.
3. Determinar si el pardeamiento previamente exhibido tras la rehidratación de *H. cruentum* tiene relación con la sobreproducción de EROs y daños oxidativos por ellas ocasionados, así como también, con menores contenidos de antioxidantes liposolubles y mayores concentraciones constitutivas y/o inducidas de compuestos fenólicos como potenciales sustratos oxidables.

IV. METODOLOGÍA

Actividad N°1: Colecta y mantención del material vegetal

Como modelo de estudio, se utilizaron dos especies de helechos película que además de diferir en su distribución vertical y amplitud ecológica en un bosque templado-lluvioso del sur de Chile (Parque Katalapi, Región de Los Lagos, Chile; 41°31'12.0''S - 72°45'02.3''O), también lo hacen en su tolerancia a la desecación y respectivos puntos de saturación lumínica. Las Hymenophyllaceae en cuestión corresponden a: *Hymenoglossum cruentum* (Fig. 11a), distribuida bajo los 60cm en el fuste o preferentemente a la sombra, e *Hymenophyllum dentatum* (Fig. 11b), distribuida ampliamente hacia dosel o en zonas más

expuestas a la luz solar e inclemencias climáticas (Parra *et al.*, 2009).



Figura 11. Especies de Hymenophyllaceae con distribución vertical contrastante utilizadas en este estudio: *Hymenoglossum cruentum* (a) e *Hymenophyllum dentatum* (b).

Las muestras de ambas especies fueron obtenidas con sus respectivos rizomas y parte del sustrato, siendo luego trasladadas al vivero del que dispone el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Universidad de Concepción. Aquí fueron mantenidas en una pared orgánica artificial (arpillera) y bajo condiciones de luz e hidratación ($\pm 15 \mu\text{mol}$ de foton m^2s^{-1} y $\pm 90\%$ de humedad relativa, respectivamente) similares a aquellas en las que viven en campo. Para disminuir la irradianza incidente, se utilizó un techo de policarbonato y malla Raschel, mientras que la hidratación de las plantas fue proporcionada por un sistema automático de riego compuesto por diversos microaspersores de tipo nebulizadores (Fig. 12a y 12b).

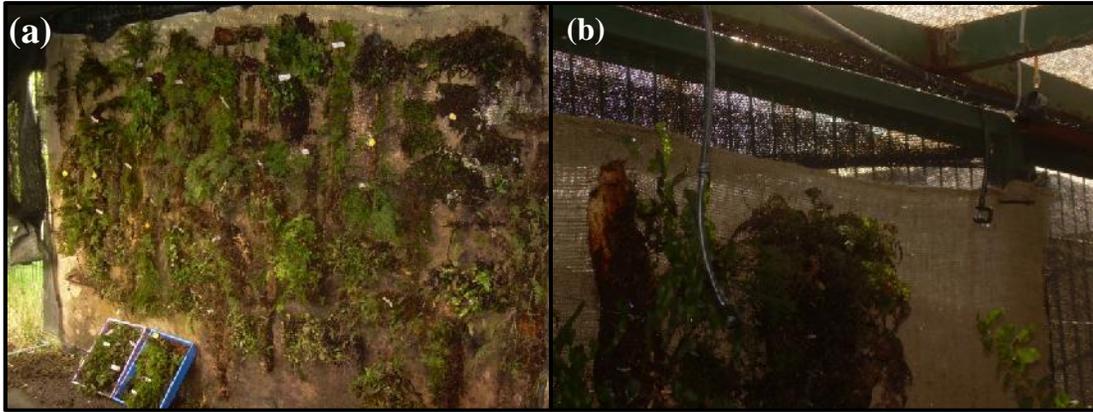


Figura 12. Mantenimiento en vivero de las plantas colectadas en terreno para experimentos en laboratorio. Pared artificial (a), Sistema de riego automático con microaspersores (b).

Actividad N°2: Diseño experimental

2.1. Tratamientos de hidratación, desecación y rehidratación bajo distintas intensidades lumínicas.

Con frondes escindidas de *H. cruentum* y *H. dentatum*, se efectuaron tratamientos de hidratación, desecación y rehidratación bajo intensidad lumínica baja ($\pm 7 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$), intermedia ($\pm 30 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y alta ($\pm 150 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$). El criterio de selección de las respectivas irradianzas se basó en los puntos de saturación lumínica obtenidos para ambas especies por Parra *et al.*, (en preparación). Para los experimentos se utilizó un total de 45 frondes por especie ($n = 5$, por estado de hidratación; $n = 15$, por irradianza), las cuales fueron previamente sumergidas en agua destilada durante un tiempo de 24 horas a fin de asegurar su nivel máximo de hidratación foliar (Fig. 13). Tras el término de los distintos experimentos se consiguió tres estados hídricos foliares por irradianza: (1) “Hidratado”, mediante la mantención constante de la fronde en agua destilada en una placa petri, (2) “Desecado”, mediante la suspensión de la disponibilidad hídrica, y (3) “Rehidratado”, mediante la suspensión y posterior re-aplicación permanente

del recurso hídrico en la placa. Los tratamientos hídricos en cada irradianza tuvieron una duración de 8 horas cada uno y fueron realizados a una temperatura de 20°C. Tanto la temperatura como la intensidad lumínica requerida para cada caso, se mantuvieron constantes gracias a la utilización de una cámara con control térmico y que cuenta con una puerta superior transparente (termopaneles) que permitió adosar un sistema de iluminación consistente en cuatro paneles de haluro metálico de 250 watts. Esto hizo posible el ajuste y mantención de la temperatura al interior de la cámara al desacoplar el aporte térmico de las lámparas, cuya intensidad se controla variando la distancia a la plantas mediante un sistema de poleas y aplicando, en algunos casos, filtros que permitan disminuir aún más la irradianza incidente (Fig. 14a y 14b).

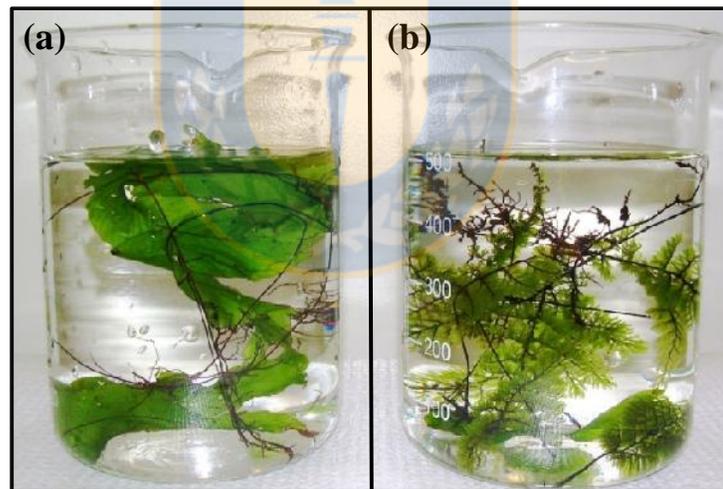


Figura 13. Obtención del nivel máximo de hidratación foliar de frondes de *H. cruentum* (a) y *H. dentatum* (b) antes de cada experimento. Las respectivas frondes fueron sumergidas en agua destilada durante 24 horas bajo condiciones lumínicas de laboratorio ($\pm 25 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$).



Figura 14. Cámara con control térmico y focos halógenos adosados a la parte superior **(a)** y frondes bajo tratamiento al interior de la cámara de fotoinhibición **(b)**.

Actividad N°3: Mediciones fisiológicas durante los experimentos

3.1. Contenido relativo de agua (CRA)

Con el propósito de tener una estimación del contenido hídrico alcanzado por las frondes de ambas especies en los distintos experimentos, se procedió a registrar con una balanza analítica (ALC-320.3 Milligram Balan, Acculab) el peso de las frondes tras 24 horas de hidratación previa a los tratamientos (Peso Túrgido = **PT**) (Fig. 13), al término de los mismos (Peso Fresco = **PF**) y luego de 48 horas de exposición del tejido foliar a 60°C en una estufa de secado (Binder E28 series) (Peso Seco = **PS**). Con los valores de peso obtenidos ($n = 5$ por cada estado de hidratación; $n = 15$ por irradianza; $n = 45$ por especie), se calculó el CRA respectivo según la fórmula (Barrs & Weatherly, 1962):

$$\text{CRA} = [(\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / (\text{Peso túrgido} - \text{Peso seco})] * 100$$

3.2. Eficiencia fotoquímica máxima o intrínseca del fotosistema II (F_v/F_m)

Una de las formas más rápidas, sensibles y confiables de evaluar la integridad de las membranas tilacoidales en plantas que han sido sometidas a condiciones de estrés, es mediante la razón existente entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima de la clorofila *a* (F_v/F_m) (Öquist *et al.*, 1992; Tijssens *et al.*, 1994, DeEll *et al.*, 1999). Esto debido a que dicha razón es equivalente a la eficiencia fotoquímica intrínseca del fotosistema II (FSII) (Buttler, 1978; Björkman & Demmig, 1987), la cual consiste en la probabilidad de que un fotón capturado por los complejos cosechadores de luz termine en el centro de reacción, desencadenando un evento fotoquímico (Rosenqvist & van Kooten, 2003). En plantas C3 saludables o no estresadas, el valor promedio del F_v/F_m es de aproximadamente 0,83 (Bjorkman & Demmig, 1987), con ligeras variaciones entre las especies. Por lo tanto, cualquier daño sufrido a causa de alguna condición adversa se verá reflejado en la disminución del F_v/F_m ya sea de forma temporal (fotoinhibición dinámica) o definitiva (fotoinhibición crónica).

Con la finalidad de asegurar el estado fisiológico óptimo del aparato fotosintético de las frondes antes de cada tratamiento ($n = 5$ por cada estado de hidratación; $n = 15$ por intensidad lumínica), se registraron los valores de F_v/F_m luego de que éstas alcanzaron su nivel máximo de hidratación o peso túrgido y tras su exposición a condiciones de oscuridad durante 30 minutos. Posteriormente, se efectuaron los mismos registros al término de cada tratamiento hídrico en las distintas condiciones lumínicas. De esta manera, se obtuvo valores de F_v/F_m en 4 estados fisiológicos: (1) Inicial (antes de cada tratamiento y con la respectiva fronde previamente hidratada a turgor máximo), (2) Hidratado, (3) Desecado, y (4) Rehidratado. Para tal efecto se utilizó un fluorímetro de pulso modulado (FMS II, Hansatech Instruments Ltd., UK), el cual mediante la aplicación de un haz de luz modulado

(<0,1 μ mol foton m⁻²s⁻¹) seguido por un pulso de luz saturante (9000 μ mol foton m⁻²s⁻¹) de 0,8 segundos de duración, proporciona los valores “in vivo” de dicho parámetro.

Actividad N°4: Toma y mantención de muestras

Para los ensayos bioquímicos correspondientes, muestras (mg) de tejido foliar (n = 5) de ambas especies fueron tomadas al término de los distintos tratamientos. Tras su colecta, éstas fueron rápidamente congeladas con nitrógeno líquido, siendo luego ubicadas en un congelador a -80°C para su mantención hasta el momento de los respectivos análisis.

Actividad N°5: Determinación de la capacidad antioxidante: Actividad de remoción del radical libre DPPH.

A fin de detectar posibles diferencias entre la capacidad de protección antioxidante de ambos helechos y si ésta sufría variaciones por efecto de los tratamientos hídricos y/o lumínicos, se determinó la actividad antioxidante contenida en los extractos foliares respectivos en términos de la habilidad contenida en ellos para reducir el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Blois, 1958). Este radical cuando se reduce, exhibe un cambio de coloración de su solución desde un violeta oscuro inicial a uno anaranjado o amarillo pálido residual (Molineaux, 2004). Así, mientras mayor sea la capacidad de reducción del radical libre, mayor será la decoloración de la solución que lo contiene, lo cual se traduce en una disminución de la absorbancia a 517nm de longitud de onda.

La determinación de la capacidad antioxidante fue realizada de acuerdo al procedimiento detallado a continuación, el cual se basó en la metodología propuesta por Fakumoto & Mazza (2000). Cinco muestras de 10-12mg de tejido hidratado/rehidratado y 4-6mg de tejido desecado fueron molidas con N₂ líquido y un micropistilo en un microtubo

frío, agregando 1ml de metanol 80% frío para su homogenización con un vortex. Los homogenizados fueron luego centrifugados a 13000g y 4°C durante 5 minutos, recuperando sólo los sobrenadantes. Posteriormente, una alícuota de 10µl de cada extracto fue diluida en 490µl de metanol 80% frío. De esta dilución, se tomaron 100µl que fueron adicionados a otro microtubo que contenía 400µl de solución 90µM DPPH en metanol 80%. La solución de reacción se incubó durante 30 minutos en oscuridad, tomando luego 2 alícuotas de 200µl (2 réplicas) que fueron traspasadas a una microplaca para el registro de la absorbancia a 517nm con un lector de microplacas (Biotek, Synergy 2 multi-modo). Finalmente, la capacidad de remoción del radical libre DPPH contenida en los extractos fue calculada como “porcentaje de inhibición de la absorbancia del DPPH” mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición } A_{\text{DPPH}} (\%) = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

Actividad N°6: Estrés Oxidativo

6.1. Detección histoquímica de anión superóxido ($O_1^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Con la finalidad de evidenciar tanto la acumulación de $O_1^{\cdot-}$ como de H_2O_2 en cada una de las frondes utilizadas por especie, estado hídrico e intensidad lumínica, se procedió a realizar un corte transversal en la zona media de éstas, dividiéndolas en una sección inferior y otra superior. Los cortes se efectuaron tras el término de los tratamientos hídricos a cada irradiación y en 3 frondes por estado de hidratación. Se destinó una de las respectivas secciones de cada fronde a la detección de $O_1^{\cdot-}$ y la otra a la de H_2O_2 . El método de

detección utilizado fue el de tinción histoquímica *in situ* con azul de nitro-tetrazolio (NBT) y 3,3'-diaminobencidina (DAB), respectivamente. El NBT, al reducirse en presencia de $O_1^{\cdot-}$, forma un complejo insoluble de color azul-violáceo (formazán) que se deposita y puede detectarse a simple vista en los sitios de acumulación de $O_1^{\cdot-}$ (Doke, 1983). Similarmente, el DAB forma un producto de polimerización café-rojizo al reaccionar con el H_2O_2 en presencia de alguna peroxidasa (Thordal-Christensen *et al.*, 1997), el cual se acumula e identifica fácilmente también sin ayuda de algún implemento óptico. El procedimiento de tinción consistió en la infiltración al vacío del material vegetal durante 5 minutos en oscuridad con una solución compuesta por 0,5mg/ml de NBT (Merck, #124823) en buffer fosfato de sodio 0,05M (pH 7,5) (Venisse *et al.*, 2001); o con una solución compuesta por 1mg/ml de DAB (Sigma-aldrich, D12384) en agua destilada ajustada a pH 3,8 con HCL fumante 37% (Merck, #100317) (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Posterior a la infiltración, el material vegetal fue incubado en las soluciones respectivas durante 48 horas en oscuridad, siendo luego traspasado y mantenido en etanol 70% durante 24 horas para su posterior observación.

6.2. Determinación de contenidos de malondialdehído (MDA)

El malondialdehído (MDA) es el producto de la autooxidación y degradación enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados que componen las membranas celulares y sistemas biológicos (Hodges *et al.*, 1999). Este producto secundario final de la peroxidación lipídica tiene la capacidad de reaccionar con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), generando un cromógeno de color rosado-rojizo cuyo máximo de absorbancia se encuentra a 532nm de longitud de onda (Kappus, 1985; Janero, 1990). En base a esto, y siguiendo el método de propuesto por Hodges *et al.* (1999), se determinó en

los extractos foliares de ambos helechos, los niveles de peroxidación lipídica en términos de contenidos de MDA.

Cinco muestras de tejido foliar (200-210mg en estado hidratado/rehidratado y 90-110mg en estado desecado) fueron pulverizadas en un mortero frío con N₂ líquido y PVPP, homogenizadas con 5ml de metanol 80% y un vortex, y centrifugadas a 10000g por 10 minutos para recuperar el sobrenadante. A continuación, dos alícuotas de 1,5ml de cada extracto fueron adicionadas separadamente a un tubo de ensayo con 1,5ml de solución - **TBA** (solución A), compuesta por 20% (p/v) TCA y 0,01% BHT; o con 1,5ml de solución +**TBA** (solución B), compuesta por 20% (p/v) TCA y 0,01% BHT más 0,65%TBA. Las diferentes muestras fueron luego agitadas vigorosamente con un vortex, calentadas durante 25 minutos a 95°C en un baño termoregulado (Memmert *WB XX*), enfriadas rápidamente en hielo y centrifugadas a 10000g durante 5 minutos. Finalmente, 5 alícuotas de 200µl del nuevo sobrenadante (en duplicado) fueron traspasadas a una microplaca para el registro de la absorbancia a 440, 532 y 600nm con un lector de microplacas (Biotek, Synergy 2 multi-modo). Los cálculos de equivalentes de MDA fueron realizados de la siguiente manera:

$$1) [(Abs\ 532_{+TBA}) - (Abs\ 600_{+TBA}) - (Abs\ 532_{-TBA} - Abs\ 600_{-TBA})] = \mathbf{A}$$

$$2) [(Abs\ 440_{+TBA} - Abs\ 600_{+TBA}) 0,0571] = \mathbf{B}$$

$$3) \text{Equivalentes de MDA (nmol m}^{-1}\text{)} = [(A - B) / 157000] 10^6$$

Actividad N°7: Determinación de compuestos fenólicos totales

Con el propósito de tener una aproximación acerca de posibles diferencias entre las especies en cuanto a su protección antioxidante no enzimática, se determinó los contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT) en base a lo propuesto por Ainsworth & Gillespie

(2007). Cinco muestras de 10-12mg de tejido hidratado/rehidratado y 0,004-0,006mg de tejido desecado fueron pulverizados en un mortero frío con N₂ líquido y homogenizados con 2ml de metanol ácido (1% HCl) frío. El homogenizado fue a continuación incubado por 12 horas en oscuridad y centrifugado a 13000g a T° ambiente durante 5 minutos para recuperar el sobrenadante. Posteriormente, a 5 alícuotas de 100µl de sobrenadante diluido (1:4 vol/vol) se le adicionaron 200µl de 10% reactivo Foulin-Ciocalteau, agitando fuertemente con un vortex. Las muestras se incubaron en oscuridad y a T° ambiente por no más de 8 minutos, agregando luego 800µl de 700mM Na₂CO₃ para volver a incubar durante 2 horas bajo las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 10000g a T° ambiente durante 5 minutos, de cuyo nuevo sobrenadante se tomaron alícuotas de 200µl (en 8duplicado) que fueron traspasadas a una microplaca para el registro de la absorbancia a 765nm con un lector de microplacas (Biotek, Synergy 2 multi-modo). Los cálculos de los contenidos de CFT fueron efectuados a partir de una curva de calibración con ácido gálico como estándar (0-2mM), expresando dichos contenidos como equivalentes de ácido gálico (mmol/gPS).

Actividad N°8: Determinación de ácidos fenólicos y flavonoides

Para la determinación y cuantificación de flavonoides y ácidos fenólicos, el procedimiento de preparación de los extractos consistió en la pulverización de 5 muestras (por cada estado de hidratación e intensidad lumínica), correspondientes a 10-12mg de tejido hidratado/rehidratado y 0,004-0,006mg de tejido desecado, en un mortero frío con N₂ líquido y su homogenización con 2ml de metanol ácido (1% HCl) frío. Los homogenizados fueron a continuación incubados por 12 horas en oscuridad y centrifugados a 13000g durante 5 minutos a T° ambiente. Los sobrenadantes fueron luego filtrados con un filtro

PVDF de 0,2 μ m (Millipore, USA). Finalmente, los análisis de los respectivos compuestos fenólicos fueron realizados mediante la inyección de alícuotas de 20 μ l de extracto por muestra en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Jasco LC-Net II/ADC), la cual se encuentra equipada con una columna de fase reversa de (RP)-18 (250 x 4.6 mm i.d.) y un detector de matriz de fotodiodos (DAD) (Jasco MD 2015 Plus). Los análisis de HPLC se llevaron a cabo según lo descrito previamente por Ruhland & Day (2000), con menores modificaciones, a una tasa de flujo de 1.0mL min⁻¹. Los ácidos fenólicos, clorogénico, cafeico, ferúlico, gálico y p-cumárico, así como también, los flavonoides quercetina, miricetina, kaempferol y rutina fueron utilizados como estándares (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), mientras que ácido fosfórico 10% (A) y acetonitrilo 100% (B) fueron utilizados como fase móvil. Las absorbancias fueron detectadas a 320nm.

Actividad N°9: Determinación de tococromanos.

Para la determinación y cuantificación de los tococromanos α -, β - y γ -tocoferol, así como también, para el plastocromanol-8, se procedió a liofilizar durante 72 horas 5 muestras de tejido foliar (por cada estado de hidratación e intensidad lumínica) correspondientes a 300mg en estado hidratado/rehidratado y 140mg en estado desecado. Posteriormente, alrededor de 20mg de tejido liofilizado fueron extraídos en 1ml de heptano puro (Sigma-Aldrich, Germany) y centrifugados a 16100g durante 20 minutos. Los sobrenadantes fueron a continuación filtrados con filtros PTFE de 0,2 μ m (Teknocroma, España). Los análisis de los diferentes tococromanos fueron luego llevados a cabo por medio de HPLC y en base a la metodología propuesta por Bagci *et al.* (2002; 2004). Brevemente, 1,5 μ l de cada muestra fueron inyectados en el sistema de HPLC. Los tococromanos fueron separados en una columna Supercosil LC-Diol (250 x 4.6mm, 5 μ m

of pore) (Sigma-Aldrich, USA). El sistema fue operado con un efluente de heptano/terc-butil metil ether (97.5:2.5 v/v) a 1 ml min^{-1} . La detección fue realizada con un detector de fluorescencia Waters 474 a 295nm de longitud de onda de excitación y 325nm de longitud de onda de emisión. Para la identificación y cuantificación de tococromanoles se utilizaron estándares puros de α -, β -, γ - y δ -tocoferol y α -, β -, γ - y δ -tocotrienol (Sigma-Aldrich, Germany).

Actividad N°10: Análisis estadísticos

En los casos en los que se cumplieron los supuestos estadísticos, se aplicó estadística paramétrica por medio de la prueba de t-student o ANOVAs de 1 o 2 (estas últimas, y de ameritarse, con la correspondiente prueba de Tukey). Alternativamente, se utilizó estadística no paramétrica a través de las pruebas de U Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Los factores para los distintos análisis fueron “Especie” (2 niveles: *H. cruentum* e *H. dentatum*), “Estado hídrico foliar” (3 niveles: “Hidratado”, “desechado” y “Rehidratado”) e “Intensidad lumínica” (3 niveles: “Baja”, “Intermedia” y “Alta”); mientras que las variables respuesta fueron “CRA”, “Fv/Fm”, “Capacidad antioxidante”, “Contenidos de MDA”, “Contenidos de compuestos fenólicos totales”, “Concentración de flavonoides”, “Concentración de ácidos fenólicos” y “Concentración de tococromanoles”. El nivel de significancia utilizado fue $p < 0,05$; con $n = 5$. Todos los análisis fueron realizados con el programa “Statistica versión 7.0” (StatSoft, 2004). No obstante, tanto la determinación del óptimo para las transformaciones de los datos que no cumplieran con los supuestos estadísticos, así como dichas transformaciones, fueron efectuadas con el programa Minitab 15.

V. RESULTADOS

V.1. Contenidos relativos de agua

Bajo las 3 irradianzas aplicadas, ambas especies exhibieron la mantención del CRA 100% en estado “hidratado”, una notoria disminución hacia valores inferiores del CRA 20% en el “desechado”, y un evidente aumento por sobre el CRA 90% en el “rehidratado” (Fig. 15). Aun cuando no fue posible evaluar la interacción entre los distintos factores, sí se pudieron constatar los efectos de la especie y de la intensidad lumínica en los CRA de frondes desecadas y rehidratadas. *H. cruentum* fue la especie que alcanzó los mayores niveles de desecación y rehidratación a irradiación baja ($p_{\text{desechado}} = 0,00002$; $p_{\text{rehidratado}} = 0,002$), y alta ($p_{\text{desechado}} = 0,0006$; $p_{\text{rehidratado}} = 0,005$), al perder y recuperar alrededor de un 5% más de agua que *H. dentatum* en ambas intensidades lumínicas (Fig. 15).

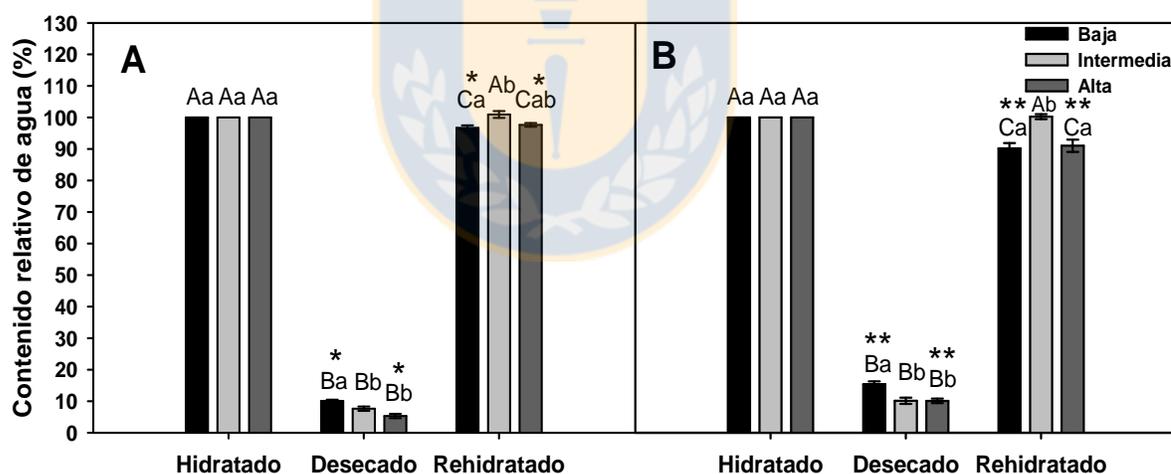


Figura 15. Contenido relativo de agua (CRA) en frondes de *H. cruentum* (A) y *H. dentatum* (B) sometidas a 3 tratamientos hídricos lumínicos. Las letras y símbolos sobre las barras indican los resultados de los análisis estadísticos (Letras mayúsculas: comparación entre estados de hidratación, Letras minúsculas: comparación entre intensidades lumínicas, Asteriscos: comparación entre especies.). Diferentes letras y cantidad de asteriscos reflejan discrepancias entre los valores bajo comparación ($n = 5$; $p = 0,05$).

En cuanto a las irradianzas, las que más influyeron en los CRA fueron la intermedia y alta. En ambas, las frondes de *H. cruentum* exhibieron niveles de desecación de alrededor del 94%, siendo éstos incluso un 4% mayores que los obtenidos a irradianza baja ($p = 0,0004$). La rehidratación mayor ocurrió a intensidad lumínica intermedia, al recuperar en ésta el CRA100% y sobrepasar en $\pm 4\%$ a los conseguidos a intensidad baja ($p = 0,006$) (Fig. 15A). *H. dentatum*, por su parte, también fue más desecado a irradianza intermedia y alta. Los CRAs alcanzados en éstas estuvieron en torno al 10%, siendo inferiores a los de la irradianza baja en aproximadamente un 5% ($p = 0,001$). Luego la mayor rehidratación fue a irradianza intermedia. Los contenidos hídricos recuperados fueron del CRA100%, los cuales superaron a aquellos obtenidos en las dos irradianzas extremas en aproximadamente un 10% ($p = 0,0001$) (Fig. 15B).

V.2. Capacidad antioxidante: Actividad de remoción del radical libre DPPH.

Intraespecíficamente, sólo *H. cruentum* exhibió efectos de la disponibilidad hídrica en la capacidad de protección antioxidante. Esto fue constatado tras la comparación de la reducción del DPPH entre los estados “hidratado” v/s “desecado” a irradianza baja, y “desecado” v/s “rehidratado” a irradianza alta (Fig. 16A). En el primero de los casos, la CAOX disminuyó en aproximadamente un 8% en el estado “desecado” ($p = 0,01$); en tanto que en el segundo lo hizo en alrededor de un 8% en el estado “rehidratado” ($p = 0,02$). De forma contraria, el efecto de la intensidad lumínica fue constatado en ambas especies. En *H. dentatum* se detectó diferencias entre las CAOXS en estado “rehidratado” obtenidas a irradianza baja e intermedia, siendo las de ésta última aproximadamente un 18% inferiores ($p = 0,05$) (Fig. 16B). En *H. cruentum* se detectaron discrepancias entre las irradianzas baja y alta en el estado “desecado” ($p = 0,03$), observándose en la última un incremento de

alrededor del 8% (Fig. 16A).

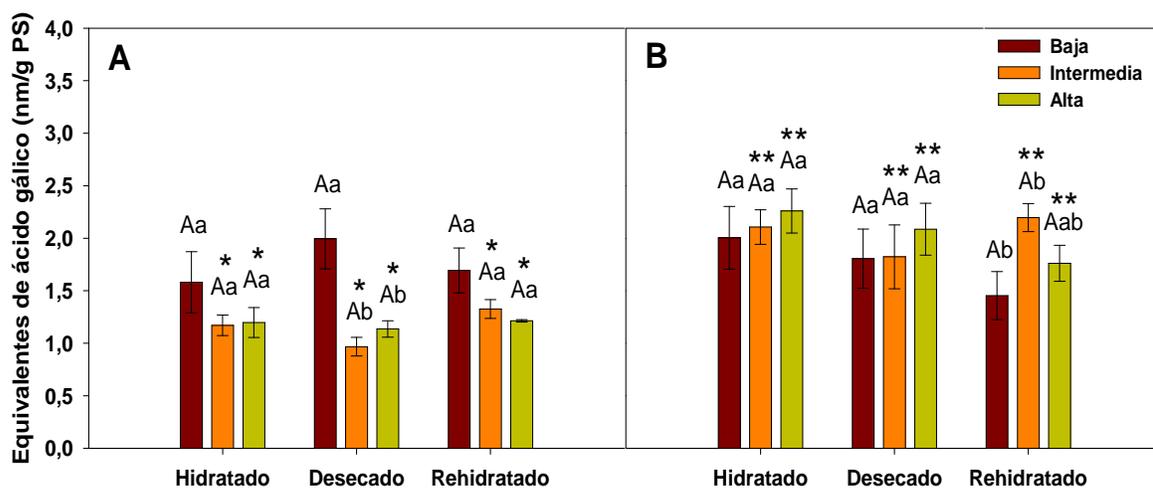


Figura 16. Capacidad antioxidante (expresada como el porcentaje de inhibición de la absorbancia a 517nm de longitud de onda del radical libre DPPH^{*}) en frondes Las letras y símbolos sobre las barras indican los resultados de los análisis estadísticos (Letras mayúsculas: comparación entre estados de hidratación, Letras minúsculas: comparación entre intensidades lumínicas, Asteriscos: comparación entre especies.). Diferentes letras y cantidad de asteriscos reflejan discrepancias entre los valores bajo comparación ($n = 5$; $p < 0,05$).

Por otro lado, los análisis interespecíficos demuestran diferencias notorias entre las especies tanto en cada estado hídrico foliar como en cada una de las irradianzas. En todos los casos, *H. dentatum* fue el helecho que mostró siempre la mayor CAOXS, teniendo, en general, la capacidad de reducir el DPPH en un 60% (Fig. 16B); mientras que *H. cruentum* rara vez excedió el 40% (Fig. 16A). Desglosando los resultados, se puede observar que en comparación con *H. cruentum*, *H. dentatum* posee a irradianza baja CAOXS mayores en alrededor del 21% en estado “hidratado” ($p = 0,0008$), del 32% en el “desechado” ($p = 0,009$), y del 37% en el “rehidratado” ($p = 0,0001$) (Fig. 16). Así mismo, a irradianza intermedia exhibe CAOXS más altas en aproximadamente un 28% en estado “hidratado” (p

= 0,003), un 29% en el “desechado” ($p = 0,0002$), y un 27% en el “rehidratado” ($p = 0,0003$). Por último, a irradiación alta muestra valores de CAOX mayores en alrededor del 19% en estado “hidratado” ($p = 0,001$), del 25% en el “desechado” ($p = 0,0004$), y del 35% en el “rehidratado” ($p = 0,009$).

Finalmente, no fue posible determinar estadísticamente alguna interacción entre los tres factores estudiados. Sin embargo, sí se pudo evaluar para ambos helechos la interacción entre la intensidad lumínica y el estado hídrico foliar, no dando ésta significativa en ninguno de los casos ($p > 0,05$). Así mismo, y aunque sólo se pudo abordar la interacción entre los factores especie v/s estado hídrico foliar (en solo una de las irradianzas), y especie v/s irradiación (en sólo un estado hídrico foliar), los análisis arrojaron que tales interacciones no son significativas ($p > 0,05$).

V.3. Estrés oxidativo

V.3.1. Acumulación de anión superóxido ($O_1^{\bullet -}$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Los patrones de tinción obtenidos por medio de la tinción histoquímica con azul de nitro-tetrazolio (NBT) no evidenciaron efectos de la disponibilidad hídrica en la generación de $O_1^{\bullet -}$ en ninguna de las dos especies (Fig. 17). En todos los estados de hidratación se observó el mismo patrón de coloración, sin atenuarse o intensificarse con la presencia o ausencia de agua. Sin embargo, sí se pudo constatar cierto efecto de la intensidad lumínica en *H. cruentum*, al detectar la aparición (aunque leve) de la tinción azul-violácea (indicativa de la acumulación $O_1^{\bullet -}$) sólo en las frondes sometidas a los tratamientos hídricos bajo condiciones de irradiación alta (Fig. 17, flechas negras).

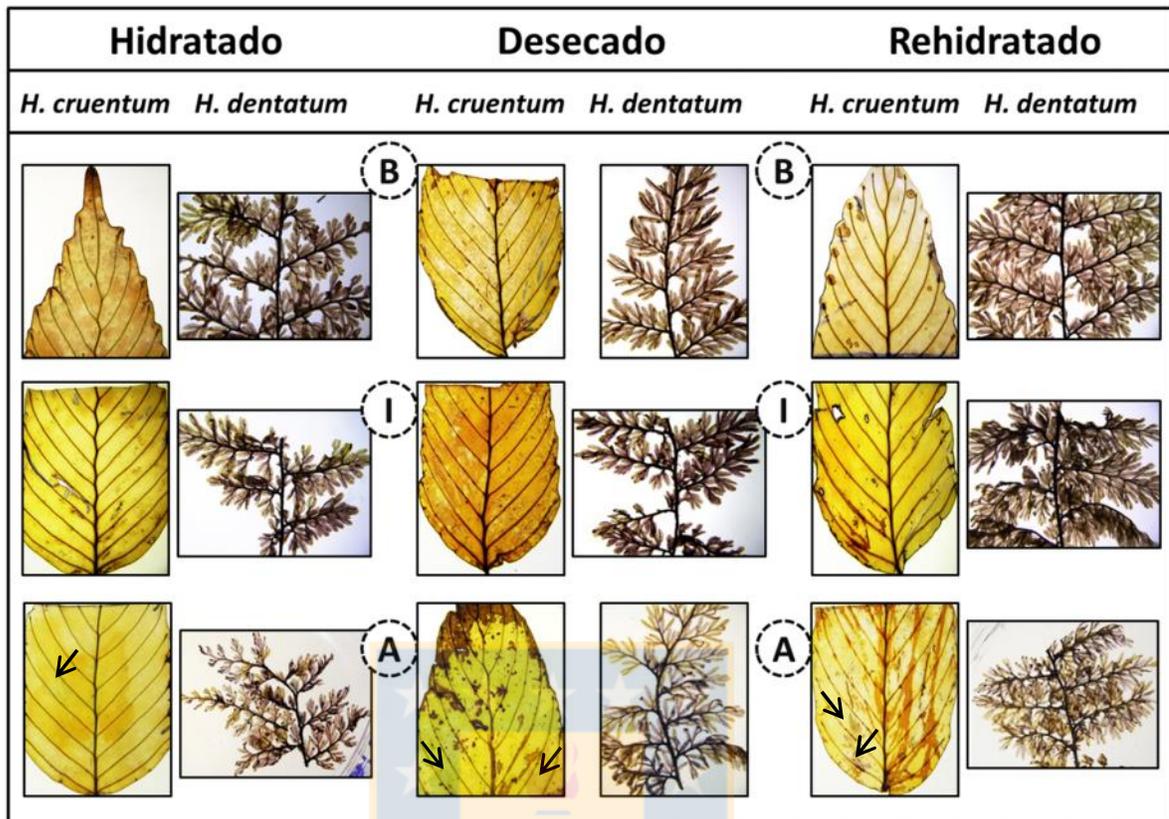


Figura 17. Acumulación de $O_2^{\cdot -}$ en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tratamientos de “Hidratación”, “Desecación” y “Rehidratación” a intensidad lumínica baja (letra B en círculo con línea punteada), intermedia (letra I en círculo con línea punteada) y alta (letra A en círculo con línea punteada). Las flechas negras en *H. cruentum* indican las zonas donde se aprecia cierto nivel de coloración azul-violácea.

A través de la técnica de tinción histoquímica con 3,3'-diaminobencidina (DAB), el contenido hídrico foliar por sí solo tampoco pareció tener mayores efectos en la generación de H_2O_2 en ninguno de los dos helechos. Esto nuevamente debido a que, en ambos casos, se aprecia un patrón de tinción similar entre los distintos estados de hidratación (Fig. 18). Contrario a esto, el factor “intensidad lumínica” sí pareció afectar la producción de H_2O_2 al menos en una de las dos especies. Particularmente, en *H. cruentum* se visualizó un incremento en la aparición e intensidad de la tinción rojiza-café (indicativa de la

acumulación de H_2O_2) a irradianza alta, específicamente al realizar las comparaciones entre los estados “desechado” (por un lado) y “rehidratado” (por el otro) de las distintas irradianzas (Fig. 18).

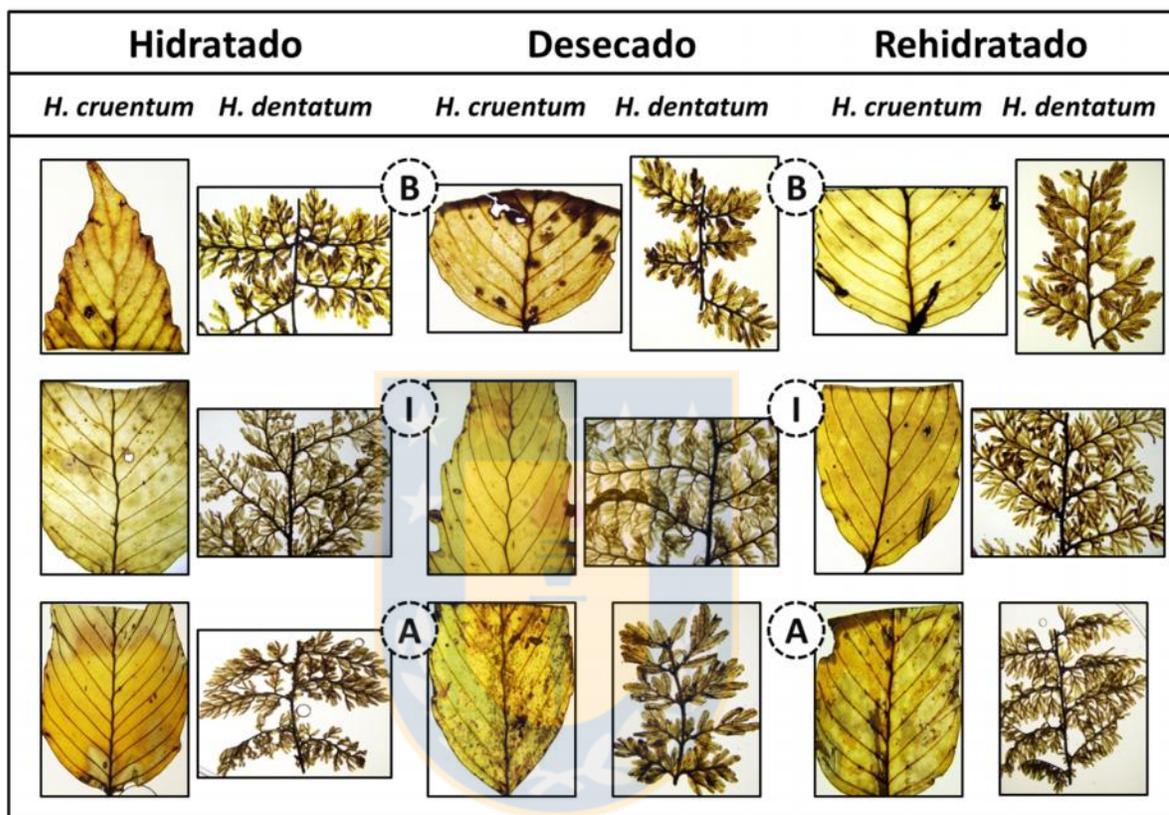


Figura 18. Acumulación de H_2O_2 en frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tratamientos de “hidratación”, “desección” y “rehidratación” a intensidad lumínica baja (letra B en círculo con línea punteada), intermedia (letra I en círculo con línea punteada) y alta (letra A en círculo con línea punteada). Las flechas negras en *H. cruentum* indican las zonas donde se aprecia cierto nivel de coloración azul-violácea.

V.3.2. Contenidos de malondialdehído (MDA)

Desde el punto de vista intraespecífico, los análisis arrojaron como resultado que la irradianza no incide en los niveles de peroxidación lipídica en ninguna de las dos especies.

No obstante, el estado hídrico foliar sí lo hace, aunque sólo en los contenidos de MDA de *H. dentatum* bajo condiciones de irradianza intermedia y alta. En la primera, los valores MDA de los estados “hidratado” y “rehidratado” fueron, respectivamente, 1,5 ($p = 0,004$) y 1,1 ($p = 0,001$) veces más altos que los del “desechado”; mientras que en la segunda, los mayores niveles de peroxidación lipídica fueron alcanzados en el estado “rehidratado”, siendo éstos 3,7 veces más altos que los del “desechado” ($p = 0,03$) (Fig. 19B).

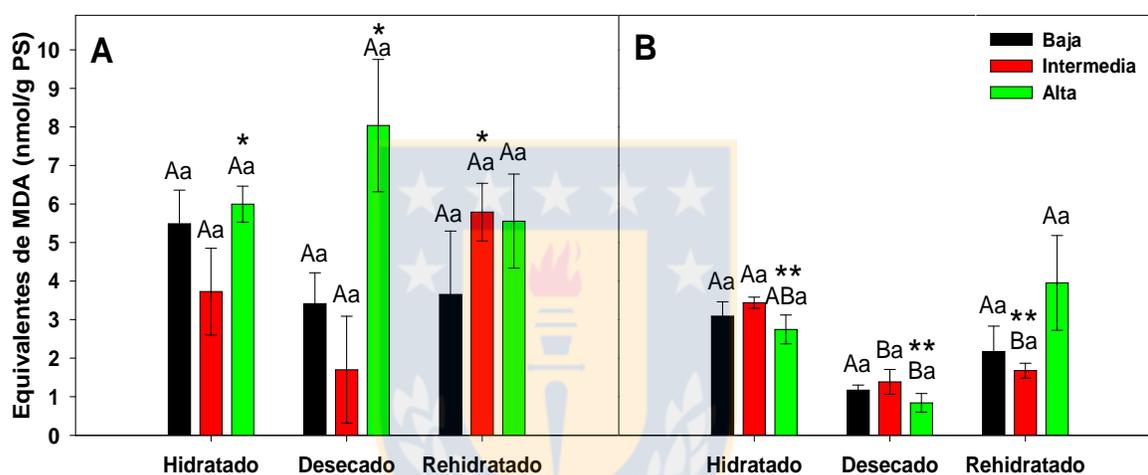


Figura 19. Niveles de peroxidación lipídica, expresados como equivalentes de malondialdehído (MDA), en extractos foliares de *H. cruentum* (A) y *H. dentatum* (B) cuyas frondes fueron sometidas a tres tratamientos lumínicos. Las letras y símbolos sobre las barras indican los resultados de los análisis estadísticos (Letras mayúsculas: comparación entre estados de hidratación, Letras minúsculas: comparación entre intensidades lumínicas, Asteriscos: comparación entre especies.). Diferentes letras y cantidad de asteriscos reflejan discrepancias entre los valores bajo comparación ($n = 5$; $p = 0,05$).

Por su parte, los diversos análisis interespecíficos demostraron que sólo existen diferencias estadísticas entre las especies a irradianza intermedia y alta. Las discrepancias se encuentran entre los respectivos estados “rehidratados” a irradianza intermedia ($p =$

0,002), y entre los “hidratados” ($p = 0,001$) y “desechados” ($p = 0,004$) a irradianza alta (Fig. 19). En todos los casos fue siempre *H. cruentum* quien exhibió los mayores niveles de peroxidación de lípidos. A intensidad lumínica intermedia fue superior a *H. dentatum* en 2,5 veces en las frondes rehidratadas, en 1,2 veces en las hidratadas y en 8,5 veces en las desecadas. Finalmente, tampoco fue posible evaluar la interacción entre los tres factores en cuestión. Sin embargo, ésta sí se pudo establecer en ciertos casos, analizando pares de factores: intensidad lumínica v/s estado hídrico foliar (en ambas especies), especie v/s estado hídrico foliar (sólo a irradianza baja) y especie v/s intensidad lumínica (sólo en frondes rehidratadas). De las tres parejas de factores, sólo se obtuvo interacción en el primero de los casos, aunque sólo en *H. dentatum* ($p = 0,046$).

V.3.3. Eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II (F_v/F_m)

Los análisis intraespecíficos dejan en evidencia tanto el efecto del estado hídrico foliar como de la irradianza en los F_v/F_m de ambas especies. El primero de los factores provocó siempre un decaimiento, considerando siempre para efecto de comparaciones al estado “hidratado”. Los F_v/F_m de *H. cruentum* fueron un 38,6% más bajos en estado “desechado” ($p = 0,0007$) y un 7,3% inferiores en el “rehidratado” ($p = 0,04$) a irradianza baja; un 59,7% menores en el desecado ($p = 0,0005$) y un 7,3% inferiores en el rehidratado ($p = 0,004$) a irradianza intermedia; y un 23,9% más bajos que los del estado “desechado” ($p = 0,0003$) a irradianza alta (Fig. 20A). Por su parte, en *H. dentatum* las eficiencias disminuyeron en un 38,3% en estado “desechado” ($p = 0,002$) y en un 9,5% en el “rehidratado” en condiciones lumínicas bajas ($p = 0,01$); un 59,5% en el “desechado” ($p = 0,001$) en condiciones lumínicas intermedias; y 40,5 veces también en estado “desechado” ($p = 0,000001$) en condiciones lumínicas altas (Fig. 20B). En cuanto a la incidencia de la

intensidad lumínica, ésta también pudo constatarse para los dos helechos. Siempre en relación a la irradianza más baja, *H. cruentum* exhibió disminuciones del orden del 2,9% a irradianza intermedia ($p = 0,02$) y del 49,3% a irradianza alta ($p = 0,003$) en estado “hidratado”, del 24% a irradianza intermedia ($p = 0,005$) y del 34,6% a irradianza alta ($p = 0,003$) en estado “desechado”, y del 2,9% a intensidad lumínica intermedia ($p = 0,02$) y 47,4% a intensidad lumínica alta ($p = 0,0002$) en estado “rehidratado” (Fig. 20A). En tanto *H. dentatum* mostró decaimientos de un 31,7% a irradianza alta ($p = 0,004$) en estado “hidratado”, de un 22,9% a irradianza intermedia ($p = 0,002$) y 33,9% a irradianza alta en estado “desechado”, y de un 28,5% a irradianza alta ($p = 0,005$) en estado “rehidratado” (Fig. 20B).

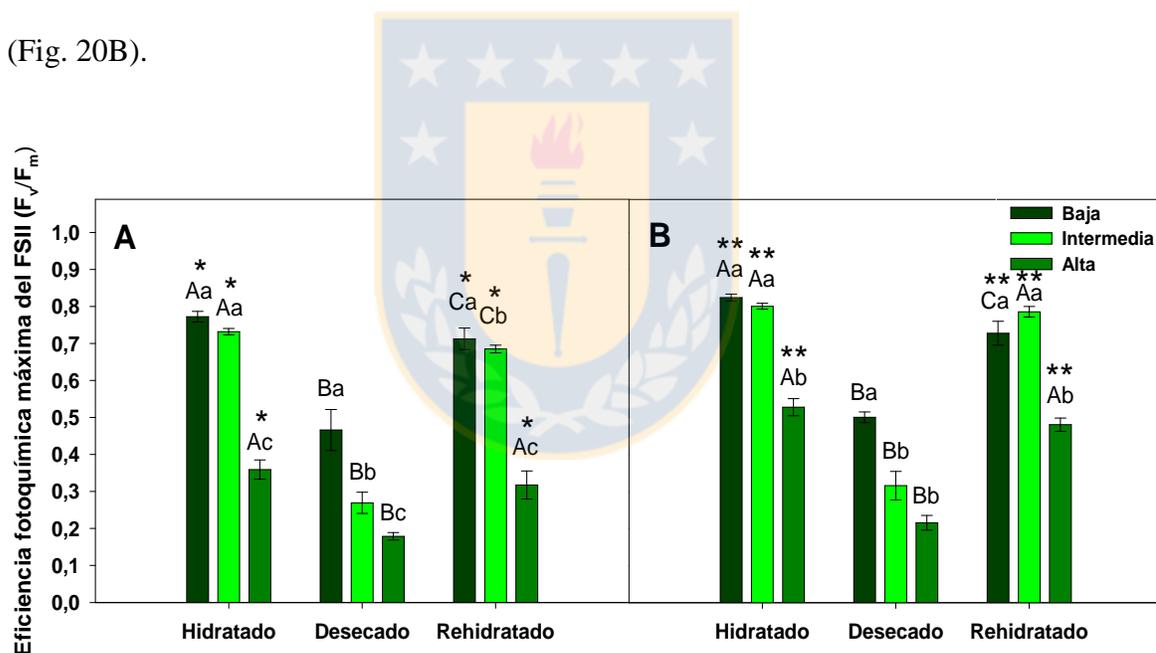


Figura 20. Eficiencia fotoquímica máxima del FSII (F_v/F_m) en frondes de *H. cruentum* (A) y *H. dentatum* (B) sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. Las letras y símbolos sobre las barras indican los resultados de los análisis estadísticos (Letras mayúsculas: comparación entre estados de hidratación, Letras minúsculas: comparación entre intensidades lumínicas, Asteriscos: comparación entre especies.). Diferentes letras y cantidad de asteriscos reflejan discrepancias entre los valores bajo comparación ($n = 5$; $p < 0,05$).

Luego, los análisis interespecíficos arrojaron diferencias entre ambos helechos bajo todas las irradianzas, pero no en todos los estados de hidratación foliar. De estos últimos, en el único que no se detectaron discrepancias fue en el estado “desechado” (Fig. 20). En las otras dos condiciones de hidratación, siempre que hubo discrepancias entre las especies, *H. dentatum* fue quien exhibió los valores de eficiencia más altos. Los F_v/F_m de este helecho fueron, como mínimo, un 2,1% ($p = 0,02$) y, como máximo, un 33,9% ($p = 0,0003$) más altos que los de *H. cruentum* (Fig. 20).

V.3.4. Aspecto visual de las frondes

Los cambios morfológicos foliares inducidos por los distintos tratamientos no fueron diferentes a los ya reconocidos por varios autores para otras especies de resurrección (Alpert, 2000; Rascio & La Rocca, 2005). Concretamente, se observó que las frondes de *H. cruentum* sufren cierto grado de encogimiento al deshidratarse casi por completo; mientras que las de *H. dentatum* se pliegan o enrollan en dirección hacia el haz hasta dejar sólo la cara abaxial expuesta al ambiente. No obstante las diferencias evidentes, ambos tejidos foliares regresan a su tamaño y formas originales luego de la rehidratación (Fig. 21). A pesar de que dichos cambios morfológicos fueron un patrón en las 3 irradianzas, fue posible notar un mayor grado de encogimiento o de enrollamiento en aquellas frondes desecadas en las irradianzas intermedia y alta. Sin embargo, en ninguna de las condiciones lumínicas se evidenció el pardeamiento reportado con anterioridad para las frondes rehidratadas de *H. cruentum*, aunque sí ciertos niveles de blanqueamiento en aquellas permanentemente “hidratadas” y “rehidratadas” a intensidad alta (Fig. 21).

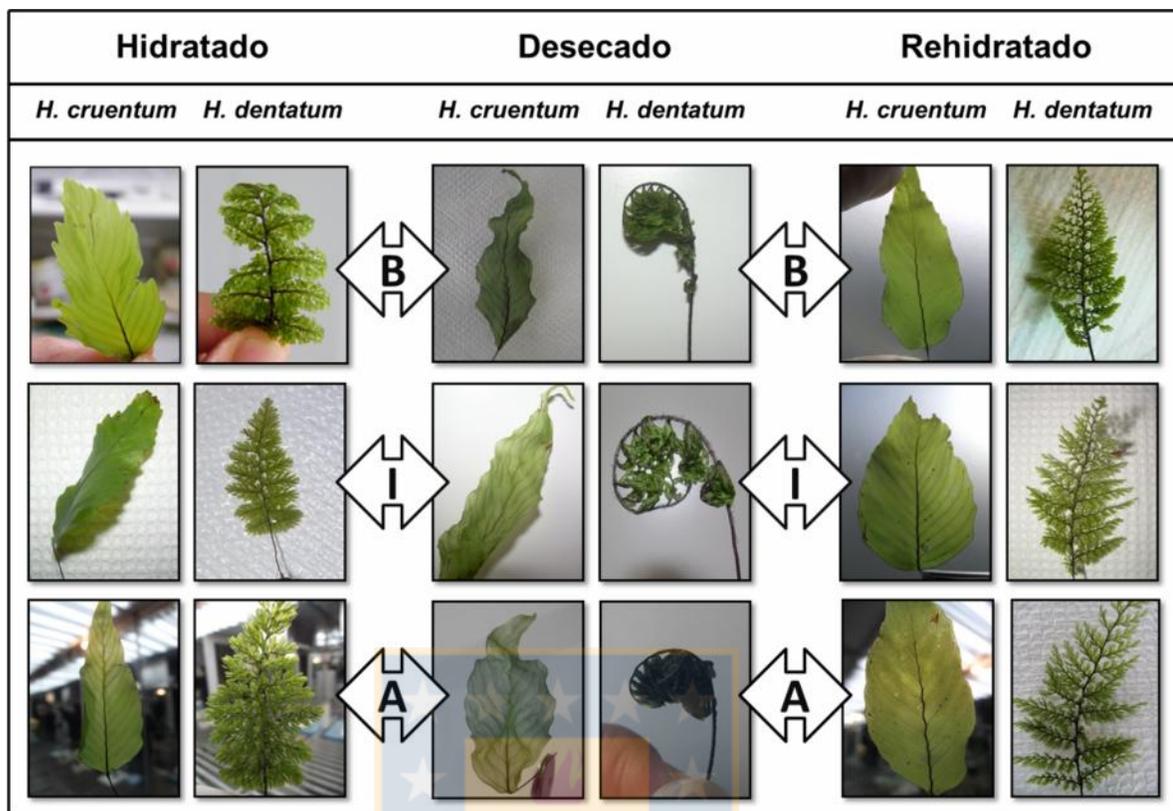


Figura 21. Aspectos de las frondes de *H. cruentum* y *H. dentatum* sometidas a tratamientos de hidratación, desecación y rehidratación bajo intensidades lumínicas baja ($\pm 5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), intermedia ($\pm 30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y alta ($\pm 150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Las flechas indican la intensidad lumínica en cada tratamiento hídrico (B: Baja, I: Intermedia, y A: Alta).

V.4. Contenidos de compuestos fenólicos totales (CFT)

Los análisis intraespecíficos no muestran efectos significativos ($p > 0,05$) del estado hídrico foliar en la concentración de CFT en ninguna de las dos especies (Fig. 22). Análogamente, la intensidad lumínica sí incide en la concentración CFT de ambos helechos. Los contenidos de CFT en frondes desecadas de *H. cruentum* disminuyeron (con respecto a la irradianza más baja) en 1,1 veces a irradianza intermedia ($p = 0,002$) y en 0,8 veces a irradianza alta ($p = 0,01$) (Fig. 22A); en tanto que los de las frondes rehidratadas de *H. dentatum* incrementaron en 0,5 veces al comparar la irradianza baja con la intermedia

(Fig. 22B). Interespecíficamente, los análisis muestran diferencias entre los contenidos de CFT de *H. cruentum* y *H. dentatum* en los tres estados de hidratación, aunque sólo en las dos irradianzas más altas. Bajo condiciones de intensidad intermedia, *H. dentatum* exhibió concentraciones CFT 0,8 veces más altas que *H. cruentum* en estado “hidratado”, 1,6 veces más altos en estado “desechado” ($p = 0,002$), y 0,7 veces mayores en estado “rehidratado” ($p = 0,004$) (Fig. 22). Así mismo, en condiciones lumínicas altas *H. dentatum* alcanzó contenidos de CFT 0,9 veces por encima de los de *H. cruentum* en estado “hidratado” ($p = 0,003$), 0,8 veces mayores en el “desechado” ($p = 0,009$) y 0,5 veces superiores en el “rehidratado” ($p = 0,007$) (Fig. 22).

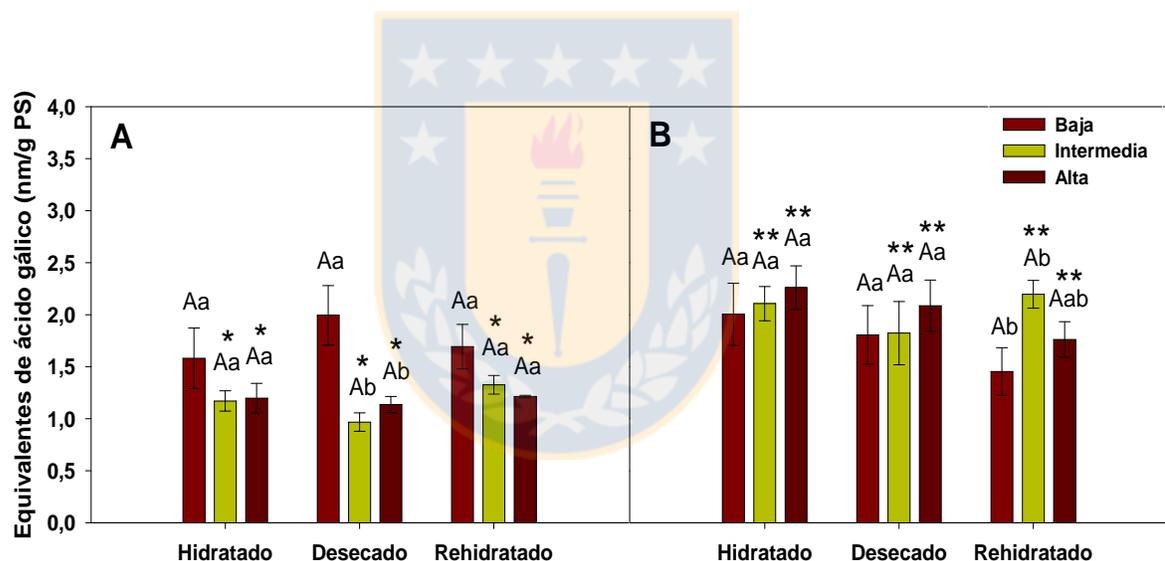


Figura 22. Contenidos de compuestos fenólicos totales (expresados como equivalentes de ácido gálico) en frondes de *H. cruentum* (A) y *H. dentatum* (B) sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. Las letras y símbolos sobre las barras indican los resultados de los análisis estadísticos (Letras mayúsculas: comparación entre estados de hidratación, Letras minúsculas: comparación entre intensidades lumínicas, Asteriscos: comparación entre especies.). Diferentes letras y cantidad de asteriscos reflejan discrepancias entre los valores bajo comparación ($n = 5$; $p = 0,05$).

Por otro lado, y al igual que en todos los otros parámetros evaluados, no fue posible

determinar la interacción entre los 3 factores. No obstante, sí se pudo comprobar la interacción entre la irradianza v/s estado hídrico foliar (en *H. dentatum*), y entre especie v/s estado hídrico foliar (a irradianzas baja e intermedia), obteniendo en todos los casos resultados no significativos ($p > 0,05$). Del mismo modo, también fue posible determinar la interacción entre los factores especie v/s irradianza en los estados hídricos foliares “desechado” y “rehidratado”, siendo significativa sólo en el “desechado” ($p = 0,011$).

V.5. Contenidos de ácidos fenólicos y flavonoides

V.5.1. Ácidos fenólicos

Al determinar los efectos de la irradianza en cada una de las especies, en frondes hidratadas de *H. cruentum* se encontraron diferencias sólo en el ácido cafeico ($p = 0,002$). Sus contenidos aumentaron 0,8 veces desde la irradianza baja a la intermedia, volviendo luego a disminuir 4,2 veces desde la irradianza intermedia a la alta (Tabla 1, panel superior). Diferentemente, en *H. dentatum* se hallaron discrepancias en los ácidos gálico, clorogénico y cafeico. En el primero se registraron contenidos 0,6 veces mayores a irradianza baja con respecto a la intermedia y alta ($p = 0,01$); mientras que en el segundo las concentraciones aumentaron 0,7 veces desde la irradianza baja a la intermedia, volviendo luego disminuir 1,7 veces desde la intermedia a la alta ($p = 0,0005$). En el último los contenidos incrementaron 0,8 veces desde la irradianza baja a la intermedia, disminuyendo luego 0,2 veces desde la intermedia a la alta ($p = 0,0005$) (Tabla 1, panel inferior). En cuanto al estado “desechado”, sólo se detectaron diferencias en el ácido cumárico de *H. cruentum*. Las concentraciones de éste incrementaron 1,3 veces desde la irradianza intermedia a la alta (Tabla 1, panel superior). Por último, en el estado “rehidratado”, en *H. cruentum* sólo se vio afectado el ácido cafeico ($p = 0,001$). Los

contenidos más altos de éste se detectaron a irradianza intermedia, siendo 2,6 y 2,3 veces más altos que aquellos a irradianza baja y alta, respectivamente. En cambio en *H. dentatum*, además de variar el contenido del ácido cafeico, también lo hizo el del ácido gálico. En el primero hubo un aumento en la irradianza más alta de 2,5 veces desde la más baja y de 1,8 veces desde la intermedia ($p = 0,001$); en tanto que en el segundo se detectó una disminución de 1,6 veces desde la irradianza baja a la intermedia y de 1,3 veces desde la baja a la alta ($p = 0,001$) (Tabla 1, panel inferior).

<i>Hymenoglossum cruentum</i>									
Ácido [mg/gPS]	Hidratado			Desecado			Rehidratado		
	B	I	A	B	I	A	B	I	A
Gálico	0,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,7
Clorogénico	51 ± 6	60 ± 9	63 ± 9	71 ± 11	57 ± 10	60 ± 17	52 ± 5	57 ± 7	62 ± 8
Cafeico	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,3	0,4 ± 0,0
Cumárico	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,6	1,7 ± 0,4	2,2 ± 0,4	1,6 ± 0,2	3,8 ± 0,6	2,9 ± 0,9	2,1 ± 0,0	3,4 ± 0,6
Ferúlico	2,1 ± 0,4	2,9 ± 0,5	1,9 ± 0,3	2,8 ± 0,5	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,6	2,8 ± 0,5	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,3

<i>Hymenophyllum dentatum</i>									
Ácido [mg/gPS]	Hidratado			Desecado			Rehidratado		
	B	I	A	B	I	A	B	I	A
Gálico	1,1 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,2 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Clorogénico	5,7 ± 0,7	9,7 ± 1,0	3,6 ± 0,7	4,7 ± 1,1	6,1 ± 1,1	8,9 ± 1,6	3,8 ± 0,9	2,6 ± 0,6	5,2 ± 1,5
Cafeico	0,3 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	1,0 ± 0,2
Cumárico	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
Ferúlico	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,0 ± 0,5	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,0 ± 0,1

Tabla 1. Contenidos de los cinco ácidos fenólicos analizados en frondes de *H. cruentum* (panel superior) y *H. dentatum* (panel inferior) con distintos estados de hidratación (hidratado, desecado y rehidratado) tras haber sido sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos (B: irradianza baja, I: irradianza alta, A: irradianza alta). $n = 5$; $p = 0,05$.

Desde el punto de vista interespecífico, fue en los ácidos cumárico y clorogénico

donde se encontraron las diferencias más grandes, siendo en ambos casos *H. cruentum* el helecho que presentó los mayores contenidos. En el ácido cumárico, las concentraciones de *H. cruentum* superaron como mínimo a las de *H. dentatum* en $\pm 11,7$ veces en el estado “hidratado” a irradianza baja ($p = 0,001$), y como máximo en $\pm 39,2$ veces en el estado “desechado” a irradianza alta ($p = 0,01$); en tanto que en el clorogénico las menores y mayores diferencias estuvieron en los estados “hidratado” y “rehidratado” a irradianza intermedia, al exhibir *H. cruentum* contenidos superiores en $\pm 5,1$ veces en las frondes hidratadas ($p = 0,00004$) y en $\pm 21,2$ veces en las rehidratadas ($p = 0,02$) (Tablas 1 y 2). Tales diferencias entre los helechos fueron desde mucho más atrás seguidas por las constatadas en los ácidos ferúlico, cafeico y gálico. En el ferúlico fue nuevamente *H. cruentum* quien presentaba las mayores cantidades, siendo éstas superiores a las de su contraparte en un mínimo de $\pm 0,7$ veces en estado “desechado” a intensidad lumínica intermedia ($p = 0,012$), y en un máximo de $\pm 1,9$ veces en estado “rehidratado” a intensidad alta ($p = 0,002$) (Tabla 1 y 2). Sin embargo, en el ácido cafeico fue *H. dentatum* quien presentó las mayores concentraciones, siendo éstas superiores a las de *H. cruentum* en un mínimo de ± 2 veces en el estado “rehidratado” ($p = 0,0001$), y un máximo de ± 3 veces en el “desechado” ($p = 0,0006$), ambas en condiciones lumínicas altas. Por último, en el ácido gálico también se observaron diferencias contradictorias entre las especies, pero al igual que en la gran mayoría de los casos, es *H. cruentum* quien preferentemente posee las cantidades más altas. Las diferencias más notorias entre ambas especies estuvieron en el orden de Así sus concentraciones superaron a las de *H. dentatum* en un mínimo de 0,3 veces en estado “desechado” a irradianza alta ($p = 0,0$), y en un máximo de 1,8 veces en el estado “rehidratado” ($p = 0,0$) a irradianza óptima (Tablas 1 y 2).

Ácido [mg/gPS]	Hidratado			Desecado			Rehidratado		
	B	I	A	B	I	A	B	I	A
Gálico	-	-	-	-	-	0,3	-1,8	1,8	-
Clorogénico	8	5,1	16,2	13,9	8,4	5,7	12,5	21,2	10,8
Cafeico	-	-	-2,6	-	-	-3	-	2,3	-1,9
Cumárico	11,7	25,9	17,4	20,4	25,3	39,2	18,9	-	18,6
Ferúlico	-	1,4	0,8	1,2	0,7	-	2,9	1,8	1,9

Tabla 2. Cantidad aproximada de veces en que *H. cruentum* supera a *H. dentatum* en los contenidos de los 5 ácidos fenólicos analizados en frondes con distintos estados de hidratación (hidratado, desecado y rehidratado) tras haber sido sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos (B: irradianza baja, I: irradianza alta, A: irradianza alta). Los signos negativos que acompañan a algunos valores indican las situaciones en que *H. cruentum* es superado por *H. dentatum*.

Finalmente, en ninguno de los 5 ácidos analizados fue posible establecer el nivel de interacción entre los factores especie, irradianza y estado hídrico foliar. No obstante, sí se pudo determinar en al menos 3 de ellos y en ambos helechos, la interacción entre luz y estado hídrico foliar. En *H. cruentum* los ácidos analizados fueron el clorogénico, cafeico y cumárico, existiendo interacción significativa en los dos últimos ($p = 0,0008$ y $p = 0,04$, respectivamente); mientras que en *H. dentatum* se hizo lo propio en los ácidos gálico, clorogénico y cumárico, obteniendo interacción significativa en los dos primeros ($p = 0,002$ y $p = 0,001$, correspondientemente). Asimismo se pudo determinar sólo en algunos ácidos, aunque en las 3 irradianzas, el nivel de interacción entre los factores especie y estado hídrico foliar. En condiciones de irradianza baja los ácidos analizados fueron el gálico, cafeico y ferúlico, obteniendo significancia en los dos primeros ($p = 0,01$ y $p = 0,04$, respectivamente). Sin embargo, a irradianza intermedia sólo se pudo evaluar el ácido gálico habiendo en éste una alta interacción ($p = 0,003$); en tanto que a irradianza alta se logró

analizar los ácidos cafeico y ferúlico no obteniendo valores significativos en ninguno de ellos ($p > 0,05$). Por su parte, también fue posible establecer en ciertos ácidos, pero en los 3 estados hídricos foliares, la interacción entre los factores especie e irradianza. En el estado “hidratado” tal relación pudo determinarse en los ácidos gálico y ferúlico, no siendo significativa en ninguno de los dos ($p > 0,05$); en el “desechado” sólo pudo ser evaluada en el ácido gálico no obteniendo significancia ($p > 0,05$); y en el “rehidratado” pudo ser constatada en los ácidos cafeico y ferúlico, siendo significativa sólo en el primero ($p = 0,02$).

V.5.2. Flavonoides

Al analizar el efecto de cada factor de manera intraespecífica, se obtuvo que el estado hídrico foliar incide sólo a las irradianzas intermedia y alta en los contenidos de miricetina y kaempferol de *H. dentatum*. A intensidad intermedia, los contenidos de miricetina en estado “rehidratado” fueron 1 vez más altos que el estado “hidratado” y 2,4 veces mayores que los del “desechado” ($p = 0,0004$); en tanto que los de kaempferol mostraron el patrón inverso al disminuir 2,2 veces en estado “rehidratado” en relación a los del “hidratado” y 2,4 veces en comparación con los del “desechado” ($p = 0,02$) (Tabla 3, panel inferior). A intensidad alta, sin embargo, tanto los contenidos de miricetina como de kaempferol disminuyeron con la reincorporación de agua en las frondes. Los valores en estado “rehidratado” de la miricetina fueron 1,2 veces más bajos que los del “desechado” ($p = 0,04$); al mismo tiempo que los del kaempferol decayeron 2,8 veces con respecto a los del “hidratado” ($p = 0,04$) (Tabla 3, panel inferior).

<i>Hymenoglossum cruentum</i>									
Flavonoide [mg/gPS]	Hidratado			Desecado			Rehidratado		
	B	I	A	B	I	A	B	I	A
Rutina	157 ± 12	193 ± 35	160 ± 28	149 ± 10	148 ± 28	144 ± 19	111 ± 20	105 ± 37	178 ± 31
Miricetina	4,2 ± 0,1	5,1 ± 1,3	4,1 ± 0,8	4,9 ± 0,3	5,0 ± 0,6	5,2 ± 0,7	3,9 ± 1,1	4,7 ± 1,4	5,5 ± 0,8
Quercetina	5,2 ± 0,2	7,2 ± 1,5	5,8 ± 0,9	5,2 ± 0,5	6,5 ± 0,5	6,2 ± 0,5	4,2 ± 0,4	5,1 ± 0,6	6,4 ± 0,5
Kaempferol	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	2,9 ± 0,9	0,04 ± 0,0	0,1 ± 0,0

<i>Hymenophyllum dentatum</i>									
Flavonoide [mg/gPS]	Hidratado			Desecado			Rehidratado		
	B	I	A	B	I	A	B	I	A
Rutina	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Miricetina	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Quercetina	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Kaempferol	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Tabla 3. Contenidos de los cinco flavonoides analizados en frondes de *H. cruentum* (panel superior) y *H. dentatum* (panel inferior) con distintos estados de hidratación (hidratado, desecado y rehidratado) tras haber sido sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos (B: irradianza baja, I: irradianza alta, A: irradianza alta). $n = 5$; $p = 0,05$.

Al igual que como se hizo con el estado de hidratación foliar, también se determinó la incidencia de la irradianza en la concentración de flavonoides de ambos helechos. En *H. cruentum* se constató efectos sólo en el estado “rehidratado” al incrementar los contenidos de rutina y quercetina conforme aumentaba la disponibilidad lumínica. En la primera, se observó un aumento de la concentración a irradianza alta de alrededor de 0,6 veces con respecto a la baja e intermedia ($p = 0,01$); mientras que en la segunda sólo se observó diferencias entre la irradianza más alta y la más baja al registrar en la primera concentraciones que fueron en promedio 0,5 veces mayores que las registradas en irradianza baja ($p = 0,04$) (Tabla 3, panel superior). Diferentemente, *H. dentatum* exhibió

efectos de la irradianza en los 3 estados de hidratación. En el “hidratado” se detectaron concentraciones de rutina a irradianza baja e intermedia $\pm 2,3$ veces más altas que a irradianza alta ($p = 0,01$); en tanto que en el “desechado” los contenidos de miricetina a las 2 intensidades lumínicas extremas estuvieron en promedio 1,5 veces por encima de los obtenidos a intensidad intermedia ($p = 0,003$). A su vez, en el estado “rehidratado” se detectaron diferencias en el kaempferol al disminuir sus contenidos en alrededor de 2,3 veces a irradianza intermedia y 3,2 veces a irradianza alta, ambos con respecto a la irradianza más baja ($p = 0,0007$) (Tabla 3, panel inferior).

Posteriormente, y al igual que como ocurrió con los ácidos fenólicos, en los flavonoides también se constataron diferencias evidentes entre los contenidos de ambas himenofiláceas. No obstante, en este tipo de fenoles siempre fue *H. cruentum* el que presentó las mayores concentraciones. En concreto, los análisis interespecíficos demuestran que el factor especie fue determinante para las concentraciones de rutina, en primera instancia, quercetina, en segunda, y miricetina, en tercera. Esto debido a que los contenidos de rutina registrados en *H. cruentum* fueron superiores a los de *H. dentatum* en aproximadamente 182 veces en estado “desechado” ($p = 0,0003$), y en alrededor de 704 veces en estado “hidratado”, ambos a la irradianza más alta ($p = 0,01$) (Tabla 3 y 4). Al analizar la quercetina, las menores y mayores diferencias entre las concentraciones de ambas especies se hallaron en el estado “hidratado” en las irradianzas baja e intermedia, respectivamente, al exhibir *H. cruentum* valores que superaban a los de *H. dentatum* en alrededor de 34 veces en la primera ($p = 0,01$) y 132 veces en la segunda ($p = 0,01$) (Tabla 3 y 4). Luego, y en tercer lugar en cuanto a niveles de discrepancia se refiere, las concentraciones de miricetina de *H. cruentum* superaron a las de *H. dentatum* en un promedio mínimo de 15 veces a intensidad lumínica intermedia en estado “rehidratado” (p

= 0,01) y alrededor de un máximo de 57 veces en la misma irradiación, pero en estado “desechado” ($p = 0,01$) (Tabla 3 y 4). Por último, el cuarto flavonoide considerado en los análisis, es decir, el kaempferol, sólo exhibió diferencias entre ambos helechos a irradiación alta en estado “rehidratado”. En este caso, *H. cruentum* nuevamente alcanzó contenidos más altos que *H. dentatum* teniendo valores aproximadamente 2 veces mayores que contraparte ($p = 0,01$) (Tabla 3 y 4).

Flavonoide [mg/gPS]	Hidratado			Desechado			Rehidratado		
	B	I	A	B	I	A	B	I	A
Rutina	201,3	255,3	703,6	282,8	303,8	181,8	209,9	226,9	294,4
Miricetina	29	33,3	22,1	25,4	57,2	20,8	20,3	14,9	25,2
Quercetina	34,4	131,5	79,2	87,9	121,2	112,5	41,5	42,8	114,4
Kaempferol	-	-	-	-	-	-	-	-	2,1

Tabla 4. Cantidad de veces aproximada en que *H. cruentum* supera a *H. dentatum* en los contenidos de los cuatro flavonoides analizados en las respectivas frondes en distintos estados de hidratación (hidratado, desechado y rehidratado) tras haber sido sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos (B: irradiación baja, I: irradiación alta, A: irradiación alta). Los signos negativos que acompañan a algunos valores indican las situaciones en que *H. cruentum* es superado por *H. dentatum*.

Finalmente, tampoco fue posible establecer el nivel de interacción entre especie, irradiación y estado hídrico foliar en ninguno de los 4 flavonoides considerados en este trabajo. Sin embargo, sí se pudo determinar en algunos de ellos la relación entre al menos dos de los factores en cuestión. Para la irradiación y el estado hídrico foliar, sólo se pudo analizar dos flavonoides en cada especie coincidiendo entre ambas la quercetina. El otro flavonoide examinado en *H. cruentum* fue la rutina, mientras que en *H. dentatum* fue la miricetina. Este último fue el único que arrojó interacción entre los factores con un valor p

igual a 0,0003. Por su parte, la relación entre especie y estado hídrico foliar sólo pudo ser determinada a intensidad lumínica baja y para el kaempferol, no existiendo interacción entre los factores ($p > 0,05$). Asimismo, la interacción entre especie e irradiación sólo pudo ser evaluada en el estado “rehidratado” y únicamente para el kaempferol, obteniendo una interacción significativa ($p = 0,01$).

V.6. Contenidos de tococromanoles

V.6.1. Tocoferoles

De los tocoferoles detectados en ambos helechos, sólo se constató efectos del estado hídrico foliar en los contenidos de α -tocoferol de *H. cruentum* (Fig. 23). Dichos efectos ocurrieron a las tres irradianzas, pero no siempre en el mismo estado de hidratación. En condiciones lumínicas baja y alta se obtuvo una disminución de casi el 50% en frondes rehidratadas con respecto a las desecadas ($p = 0,015$; $p = 0,047$, respectivamente); mientras que a irradiación intermedia se observó un incremento de alrededor del 200% en frondes desecadas con respecto a las hidratadas ($p = 0,038$) (Fig. 23A). Verificando luego la incidencia de la intensidad lumínica, ésta se halló en ambas especies, pero sólo en frondes hidratadas. Además, el tipo de tocoferol afectado no coincidió entre los helechos. *H. cruentum* exhibió a irradiación alta, y con respecto a la baja e intermedia, un decaimiento del 46% en las concentraciones de α -tocoferol ($p = 0,014$; Fig. 23A); en tanto que *H. dentatum* a la misma condición lumínica, pero únicamente en relación a la irradiación más baja, lo hizo en alrededor de un 37% en las de α -tocoferol ($p = 0,011$; Fig. 23B).

Al analizar luego las diferencias desde el punto de vista interespecífico, éstas se obtuvieron tanto en los tipos como en los contenidos de tocoferoles presentes en cada una de las especies. De los 4 tocoferoles analizados (α -, β -, γ - y δ -tocoferol), en *H. cruentum* se

detectó α - y γ -tocoferol; mientras que en *H. dentatum* se halló sólo el primero de ellos (Fig. 23). De esto se desprende que las diferencias en contenidos entre las especies fueron obtenidas en dicho antioxidante. En estado desecado, *H. cruentum* superó a *H. dentatum* en un 37% a irradiación baja ($p = 0,033$) y en un 30% a irradiación alta ($p = 0,030$) (Fig. 23). A su vez *H. dentatum* superó a *H. cruentum* sólo en estado hidratado a irradiación intermedia ($p = 0,016$), arrojando contenidos que superaban en un 40% a los de su contraparte (Fig. 23A y B).

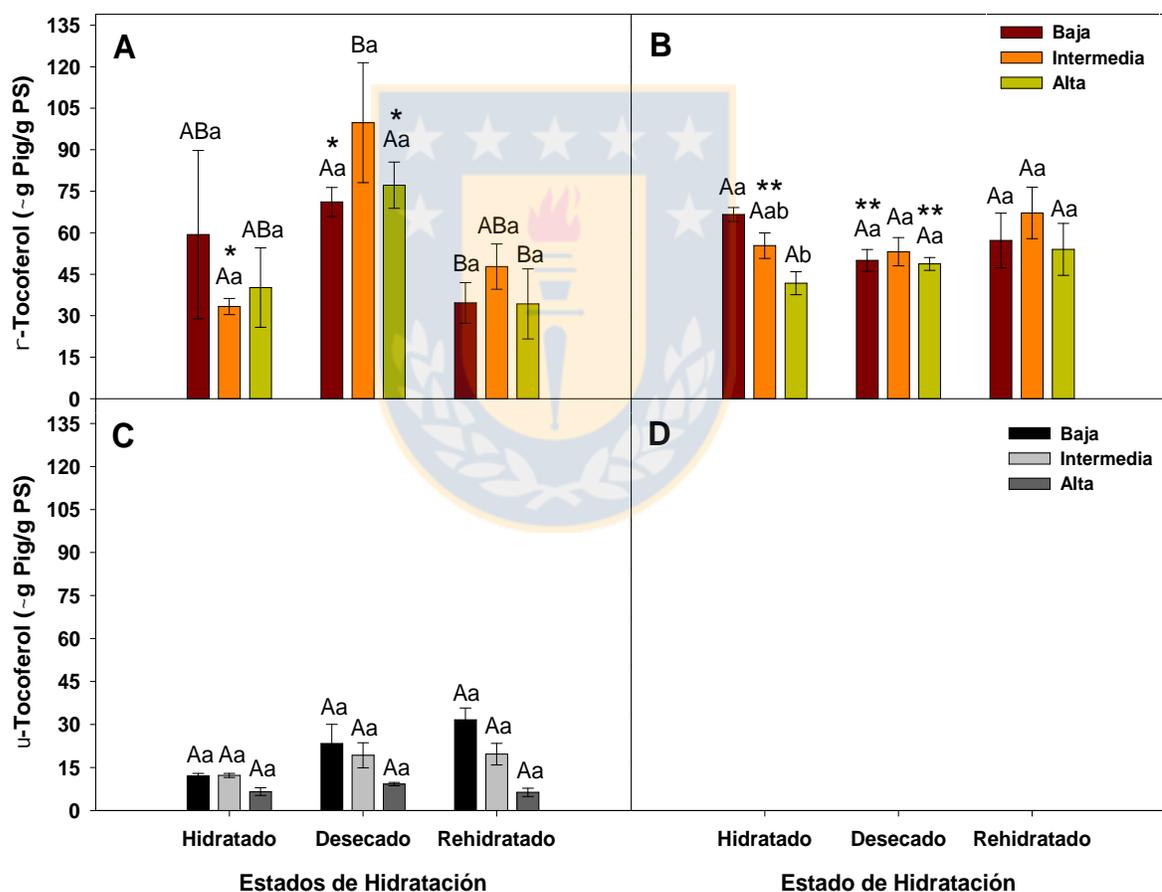


Figura 23. Contenidos de α - y γ -Tocoferol, expresados como μg de pigmento ($\mu\text{g Pig}$) por gramo de peso seco (g PS), en extractos foliares de *H. cruentum* (A) y *H. dentatum* (B) cuyas frondes fueron sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. Las letras y símbolos sobre las barras indican los resultados de los análisis estadísticos (Letras

mayúsculas: comparación entre estados de hidratación, Letras minúsculas: comparación entre intensidades lumínicas, Asteriscos: comparación entre especies.). Diferentes letras y cantidad de asteriscos reflejan discrepancias entre los valores bajo comparación ($n = 5$; $p < 0,05$).

V.6.2. Plastocromanol-8 (PC-8)

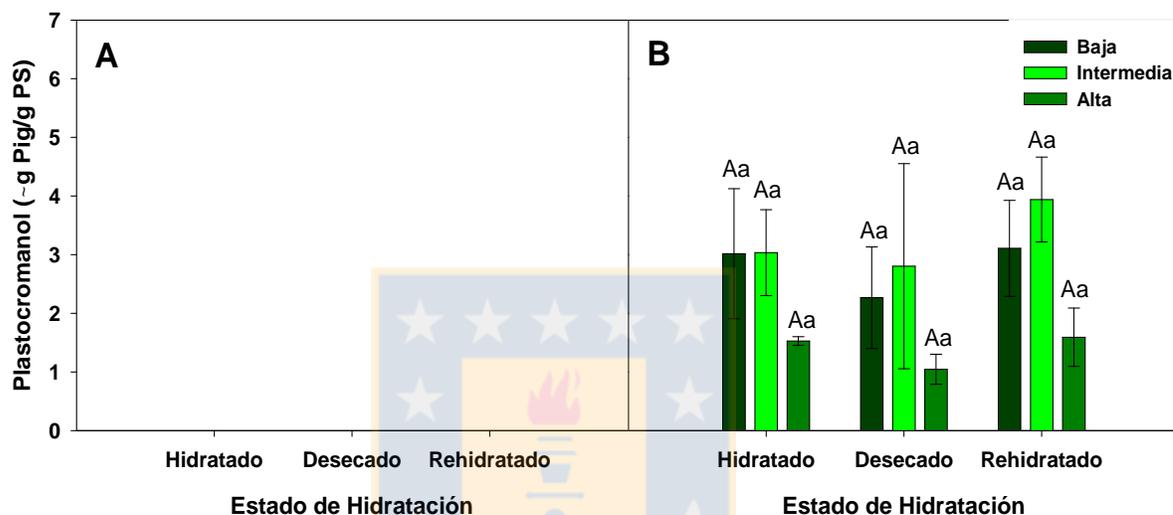


Figura 24. Contenidos de plastocromanol-8 (PC-8) (expresados como μg de pigmento por gramo de peso seco (g PS)) en frondes de *H. cruentum* (A) y *H. dentatum* (B) sometidas a tres tratamientos hídricos y lumínicos. Las letras y símbolos sobre las barras indican los resultados de los análisis estadísticos (Letras mayúsculas: comparación entre estados de hidratación, Letras minúsculas: comparación entre intensidades lumínicas, Asteriscos: comparación entre especies.). Diferentes letras y cantidad de asteriscos reflejan discrepancias entre los valores bajo comparación ($n = 5$; $p < 0,05$).

Como se observa en la figura 24, el principal resultado en este tococromanol fue su presencia sólo en *H. dentatum*. Aun cuando se encontraba presente en esta especie, las concentraciones fueron en general bastante bajas. No superaron los $5\mu\text{g Pig/g PS}$ en ninguna de las situaciones experimentales. En cuanto a efectos sobre ellas del estado

hídrico foliar y/o de la irradianza, los análisis no demuestran incidencia de ninguno de estos factores. Por último, y como en todos los parámetros anteriores, tampoco fue posible determinar el nivel de interacción entre los mismos debido a que los datos no cumplieron con los supuestos estadísticos.

VI. DISCUSIÓN

La mayoría de los trabajos que han abordado los mecanismos de protección antioxidante de plantas tolerantes a la desecación, se han centrado en estudiar las respuestas enzimáticas y no enzimáticas más típicamente asociadas a la prevención del estrés oxidativo (Navari-Izzo, 1997a, b; Farrant, 2000; Augusti *et al.*, 2001; Kranner *et al.*, 2002; Kranner, 2009; Sherwin & Farrant, 1998). Así la capacidad antioxidante como un todo, y en especial los compuestos fenólicos (Sgherri *et al.*, 2004; Bagniewska-Zadworna *et al.*, 2008), y tococromanoles distintos al tocoferol, han sido rara o nulamente incluidos. Lo mismo ha ocurrido con los helechos de la familia Hymenophyllaceae, los que además de tener una anatomía foliar única (en cuanto a plantas terrestres se refiere) y ser desde hace ya mucho tiempo reconocidos como plantas de resurrección (Shreve, 1911; Iwatsuki, 1990; Proctor, 2003), son también uno de los componentes epífitos principales de los bosques tropicales y templados-lluviosos de alrededor del mundo. De acuerdo con esto, el presente trabajo de tesis contribuye al conocimiento de los mecanismos fisiológicos implicados en la tolerancia a la desecación de los helechos película; los cuales, a pesar de su anatomía foliar tan simple, son altamente eficientes en la preservación de los tejidos fotosintéticos que sufren ciclos de desecación y rehidratación bajo condiciones lumínicas diversas.

VI.1. *Hymenoglossum cruentum* v/s *Hymenophyllum dentatum*

Los resultados obtenidos apoyan lo propuesto en cuanto a que dos de las Hymenophyllaceae que difieren en sus preferencias de microhábitat a causa de sus grados de tolerancia a la desecación y requerimientos lumínicos distintos, difieren también en sus capacidades de protección antioxidante. Esto quedó de manifiesto al constatar que *H. cruentum*, especie modelo de hábito más restringido, posee siempre alrededor de un 20% menos capacidad de remoción de radicales libres (DPPH[•]) que *H. dentatum*, especie más ampliamente distribuida (Fig. 16). Estas discrepancias en capacidad antioxidante (CAOX) fueron respaldadas por los respectivos niveles de peroxidación lipídica, pero no sustentadas por las correspondientes acumulaciones de EROs. *H. cruentum* fue el helecho que tendió a exhibir siempre los contenidos más altos de MDA (Fig. 19). Sin embargo, la nula acumulación de O₁[•] y la inferior depositación de H₂O₂ en el mismo, se escapan totalmente de lo esperado y del patrón de respuesta mostrado por *H. dentatum* (Fig. 17 y 18). A pesar de tal discordancia entre los resultados, los niveles de MDA y los valores de F_v/F_m en las tres irradianzas demuestran efectos negativos de la intensidad lumínica más alta en la tolerancia de *H. cruentum* a situaciones de déficit hídrico extremo (Fig. 19 y 20). Por lo tanto, también se confirma que la CAOX inferior de este helecho efectivamente compromete su tolerancia a la desecación bajo condiciones lumínicas que superan sus óptimos fotosintéticos, aceptándose así en su totalidad la primera de las hipótesis. Al analizar un poco más los resultados, se puede inferir que los niveles de peroxidación lipídica relativamente más altos de *H. cruentum*, así como también, el decaimiento notorio de sus F_v/F_m tras la rehidratación a las irradianzas mayores, se deberían más al estrés oxidativo ejercido, por ejemplo, por el ¹O₂ producido a nivel de la cadena transportadora de electrones cloroplastidial (Krieger-Liszkay, 2005), que al OH[•] generado por la

transformación del H₂O₂ a través de la reacción de Fenton (Edreva, 2005). Esta suposición cobra valor al considerar que los complejos cosechadores de luz y los centros de reacción de los fotosistemas de plantas poiquiloclorofílicas (dentro de las que se encuentran los helechos en cuestión), siguen absorbiendo energía lumínica aún en estado desecado (Heber *et al.*, 2006). Y si a esto se le suman los puntos de saturación lumínica más bajos de *H. cruentum* (Parra *et al.*, en preparación), y una posible disminución en su capacidad para disipar térmicamente el exceso de energía bajo situaciones de déficit hídrico, es muy probable que en él se generen concentraciones más altas de ¹O₂. De ser así, no es de extrañar que entre los blancos del ataque oxidativo hayan estado la proteína D₁ del FSII y los lípidos constituyentes de la membrana plasmática de los cloroplastos (Aro *et al.*, 1993; Niyogi, 1999), lo cual coincide en plenitud con los valores de F_v/F_m y los contenidos de MDA de ambas especies. De lo anterior se desprende que las CAOxs distintas entre las Hymenophyllaceae influyen en los grados de tolerancia al estrés provocado por déficit hídrico extremo e irradiación, lo cual repercute a su vez en la distribución y amplitud ecológica de estos helechos al interior del bosque.

A las diferencias interespecíficas ya especificadas, se suma también el efecto que el estado de hidratación ejerce sobre la CAOx de ambos helechos. Puntual y efectivamente, el déficit hídrico extremo sólo afecta de forma negativa la CAOx de *H. cruentum* (Fig. 16). No obstante, las disminuciones en dicho parámetro no muestran un patrón claro y consistente que permita decir fehacientemente que tal grado de déficit hídrico influye en las frondes al desecarse y más aún luego al rehidratarse, pues, aunque se observaron cambios en ambos estados de hidratación, éstos no ocurrieron bajo la misma condición lumínica (en el caso de las primeras se observó sólo a irradiación baja, mientras que en las segundas se detectó sólo a irradiación alta) (Fig. 16A). Además, la CAOx de estas últimas fue sólo

menor que la de sus pares desecados, por lo que al no diferir de las permanentemente hidratadas bajo la misma condición lumínica y tampoco ser, en proporción, inferiores a la de las frondes desecadas en la irradianza más baja, no se puede aseverar que el déficit hídrico extremo disminuye en mayor medida la CAOX de frondes rehidratadas que de desecadas. Así la segunda hipótesis puede ser aceptada sólo parcialmente, pues aunque el déficit hídrico extremo efectivamente induce una disminución de la CAOX de *H. cruentum*, no provoca durante la rehidratación un decaimiento superior al inducido durante la desecación.

Al examinar, por otro lado, una posible relación entre los contenidos de fenoles y tococromanoles con el pardeamiento exhibido con anterioridad en frondes rehidratadas de *H. cruentum* (Parra *et al.*, datos sin publicar), los resultados reflejan que tal correspondencia sí existe. No obstante, se debe tener cuidado con esta aseveración. Aunque existen tales coincidencias, los experimentos del presente trabajo no confirman que sea el estrés por desecación/rehidratación el que induce tal nivel de oxidación de los fenoles al cumplir con su labor como antioxidantes durante tales condiciones. De hecho, y aun cuando se observó una disminución de los CFT en estado desecado conforme aumentaba la irradianza incidente, en ninguno de los tratamientos se observó pardeamiento alguno (Fig. 21). Esto hace pensar que aunque efectivamente existen diferencias importantes entre los tococromanoles protectores de membrana de *H. cruentum* y *H. dentatum* (las cuales indican que el primero posee menos protección antioxidante en sus membranas tilacoidales), éstas no tienen relación directa con los niveles de pardeamiento observados con anterioridad. Asimismo, y aun cuando *H. cruentum* no es precisamente el que posee concentraciones constitutivas y/o inducidas más altas de CFT (Fig. 22), el tener notoriamente más ácido clorogénico y otros fenoles potencialmente oxidables (Tabla 1), indica que el pardeamiento

en cuestión sería el resultado de la oxidación y consecuente transformación de éstos en o-quinonas (compuestos que por polimerización espontánea generan melaninas). Considerando tales resultados, la manipulación constante a la que fueron sometidas las frondes de ambas especies en experimentos anteriores y la escasa realización de la misma en los presentes, se puede inferir que el pardeamiento de *H. cruentum* sería el resultado de la oxidación de los compuestos fenólicos (principalmente ácido clorogénico) por acción de la(s) enzima(s) polifenol oxidasa (PPO) y/o peroxidasas (POD). Se cree que la manipulación excesiva de las frondes en trabajos anteriores, así como también, las características foliares de *H. cruentum* (fronde entera) tuvieron como consecuencia la exposición de dichos tejidos a estrés mecánico severo. Esto se tradujo en la pérdida de la integridad celular y, por ende, de la compartimentalización de tales fenoles y enzimas, quedando éstos libres y en contacto en el espacio intracelular. Consecuentemente, se produjeron las reacciones de oxidación y generación de o-quinonas pertinentes, lo cual dio paso al pardeamiento de los tejidos foliares.

Por último, y dada la trascendencia que pueden llegar a tener estos resultados, es importante recalcar las diferencias en contenidos y tipos de tococromanoles detectados en ambos helechos. El que *H. cruentum* posea α - y γ -tocoferol, pero carezca en su totalidad de PC-8, pueden ser parte de las razones que lo hagan más sensible al estrés foto-oxidativo sufrido durante la desecación de sus frondes bajo condiciones lumínicas que superen sus óptimos fotosintéticos. Esto a razón de que el PC-8 posee características físicas muy similares al α -tocoferol (Lushchak & Semchuk, 2012), tococromanol que a su vez se asemeja al α -tocoferol en cuanto a actividad antioxidante se refiere (Bergmüller *et al.*, 2003; Abbasi *et al.*, 2007). De esta manera, la falta de PC-8 no puede ser suplida a cabalidad por el α -tocoferol, por lo que las membranas tilacoidales de *H. cruentum* quedan

más expuestas a daños oxidativos.

VI.2. Hymenophyllaceae v/s otras plantas de resurrección

Al comparar los resultados de ambos helechos con los exhibidos por otras plantas de resurrección, se obtienen tanto similitudes como discrepancias. En el primero de los casos, la CAOX de las himenofiláceas es inferior a la reportada para los brotes del arbusto *Myrothamnus flavellifolius* (Motlhanka & Mathapa, 2012). Con sólo 25µg/ml de estos brotes se alcanza un 66% de disminución de la absorbancia del DPPH[•]; en tanto que con 80-100µg/ml de tejido foliar de *H. cruentum* y *H. dentatum* se consigue, respectivamente, sólo alrededor de un 40% y un 60% (Fig. 16). Sin embargo, es importante destacar que, al momento de los análisis, las alícuotas de *H. dentatum* estabilizaron dicho radical antes de los 10 minutos de reacción. Esto podría estar indicando que con un extracto menos concentrado se pueden alcanzar las mismas inhibiciones de la absorbancia aquí señaladas, quedando así éstas más cercanas en eficiencia a las reportadas para *M. flavellifolius*. Por su parte, las variaciones en protección antioxidante en *H. cruentum* discrepan con lo exhibido por *Haberlea rhodopensis*, quien presentó alrededor de un 40% más CAOX en hojas desecadas que en hidratadas (Berkov *et al.*, 2011). No obstante, se debe tener cuidado con esta comparación ya que, al haber sido los experimentos de desecación realizados en oscuridad en la dicotiledónea, las diferencias entre sus hojas hidratadas y desecadas podrían deberse sólo a que las primeras presentaban mayor sobreproducción de EROs y menor CAOX por haber sido procesadas directamente desde condiciones lumínicas de invernadero (exposición a fotoperiodo). Tal observación se basa en que al analizar la incidencia de la luz en los tratamientos de desecación y rehidratación de los helechos película, se pudo constatar que ésta en ningún caso provoca un incremento de la CAOX de frondes desecadas

con respecto a las hidratadas (Fig. 16). De hecho, los únicos cambios inducidos por deshidratación extrema ocurrieron a la intensidad lumínica más baja y sólo en *H. cruentum*, siendo éstos de disminución (Fig. 16A). Cotejando luego los niveles de peroxidación lipídica con aquellos de *Ramonda nathaliae*, se obtienen respuestas bastante similares entre ésta y *H. dentatum*, pero algo distintas con las de *H. cruentum*. Los contenidos de MDA en hojas desecadas y rehidratadas de la “Ramonda de Natalie” son ligeramente inferiores a los de su control hidratado (Jovanovic *et al.*, 2011). Esto coincide con frondes de *H. dentatum* desecadas y rehidratadas a irradianza intermedia, y con aquellas rehidratadas a irradianza alta. En cambio, las frondes de *H. cruentum* con distintos CRA no exhibe diferencias entre sí bajo ninguna de las 3 condiciones lumínicas (Fig. 19). Ahora si también se compara la concentración de MDA de frondes desecadas y rehidratadas de los helechos con la de los dos morfos de la hepática *Jamesoniella colorata* (Hooijmaijers, 2008), se obtiene marcadas diferencias. Los contenidos máximos de MDA de las frondes permanentemente hidratadas de los helechos son casi 16 veces inferiores a los de los morfos control de la hepática ($\pm 78 \text{ nmol/gPS}$); en tanto que las frondes desecadas y rehidratadas poseen como mínimo, y respectivamente, unas 8 y 12 veces menos MDA que los morfos desecados ($\pm 82 \text{ nmol/gPS}$) y rehidratados ($\pm 100 \text{ nmol/gPS}$) de *J. colorata*. Por otro lado, la falta de depositación de formazán en *H. cruentum* y la acumulación excesiva del mismo en *H. dentatum*, coinciden y discrepan, respectivamente, con la acumulación de EROs reportada para la ya mencionada *R. nathalie*. Durante y tras los episodios de desecación y rehidratación bajo condiciones lumínicas naturales (condiciones de invernadero según los autores), no se detectó en ésta depósitos de formazán que indiquen que la generación de $\text{O}_1^{\cdot -}$ en sus hojas haya sobrepasado significativamente la capacidad de su detoxificación por

parte del sistema antioxidante (Jovanovic *et al.*, 2011). No obstante, la depositación ligera del compuesto rojizo-café (indicativo de presencia de H₂O₂) en *H. cruentum* y la acumulación evidente del mismo en *H. dentatum*, son completamente opuestas a lo exhibido por la fanerógama. Aunque las hojas de esta última presentaron una acumulación notoria de H₂O₂ en las fases tempranas y medias de la desecación, ésta desaparece por completo tanto en sus pares completamente desecadas como en aquellas analizadas 24 horas después de la rehidratación (Jovanovic *et al.*, 2011). En cuanto a los CFT, el que las himenofiláceas contengan concentraciones iguales o incluso mucho más altas que las hasta ahora reportadas para otras plantas tolerantes a la desecación (Tabla 5), fue sin duda uno de los aspectos que más llamó la atención. Esto debido a que la anatomía foliar tan simple (monolaminar) de estos helechos hace suponer, en principio, que poseen concentraciones bastante más bajas.

Plantas de resurrección	Fenoles totales (mg EAG/g PS)
<i>H. cruentum</i>	269 (36,3)
<i>H. dentatum</i>	341 (47,4)
<i>M. flabellifolious</i>	247,1 (15,9)
<i>C. wilmsii</i>	47,9 (1,3)
<i>C. plantagineum</i>	43,4 (5,1)
<i>C. pumilum</i>	41,5 (2,3)
<i>X. humilis</i>	38,9 (0,6)
<i>X. viscosa</i>	39,6 (1,5)
<i>X. schlechterii</i>	45,8 (5,1)
<i>E. nindensis</i>	10,5 (1,1)
Plantas sensibles	
<i>E. curvula</i>	6,8 (1)

Tabla 5. Concentración de compuestos fenólicos totales en hojas normalmente hidratadas

de distintas plantas de resurrección y una planta sensible a la desecación (extraído y modificado de Farrant *et al.* 2007).

Otro aspecto que también destacó, fue la falta de variación de las concentraciones de *H. cruentum* y *H. dentatum* conforme lo hacía el estado de hidratación de sus frondes (Fig. 22). En vista de lo reportado para *H. rhodopensis*, en la cual la desecación foliar induce incrementos de hasta 4,5 veces en la síntesis de CFT (Georgieva *et al.*, 2007; Djilianov *et al.*, 2011), así como de los niveles de pardeamiento evidenciados con anterioridad en las frondes rehidratadas de *H. cruentum* (Parra *et al.*, datos sin publicar), se esperaba que al menos en este último la desecación provocara un aumento en las concentración total de dichos compuestos (esto con el objeto de obtener mayor protección antioxidante durante la rehidratación). Aunque los resultados efectivamente demostraron variaciones en los fenoles totales de frondes desecadas de *H. cruentum*, éstos no fueron de incremento si no que de disminución. Además, no dependieron sólo de la pérdida de agua, sino que también de irradianzas iguales o superiores a $30\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fig. 22). Esto hace inferir que la deshidratación extrema en esta especie no induce por sí sola la utilización de estos compuestos como antioxidantes. Lo anterior a razón de que necesita de irradianzas que superen sus óptimos fotosintéticos y, por ende, generen mayor presión de excitación sobre su aparato fotosintético, activando (o sobreactivando) recién allí este mecanismo de protección antioxidante.

Junto con las concentraciones altas de CFT en los 2 helechos película ambas himenofiláceas, también sobresalen en ellos los contenidos de algunos ácidos fenólicos y flavonoides. De los 5 ácidos analizados, el más abundante fue siempre el clorogénico; mientras que de los 4 flavonoides lo fue la rutina (Tablas 2 y 3). La predominancia de dicho

ácido en ambas himenofiláceas concuerda con lo reportado para *Asplenium ceterach* (Živkovi *et al.*, 2010) y *Ramonda serbica* (Sgherri *et al.*, 2004). Con la primera de las especies, *H. cruentum* y *H. dentatum* coinciden también en la presencia de ácido cafeico; mientras que con la segunda lo hacen además con los ácidos gálico y ferúlico. No obstante, no pueden descartarse más similitudes, a razón de que los respectivos trabajos no utilizaron exactamente los mismos estándares de polifenoles. Ahora si se comparan entre sí las concentraciones, se tiene que ambas himenofiláceas sobrepasan a *A. ceterach* en los contenidos de los 2 ácidos; en tanto que con *R. serbica* lo hacen sólo en uno de ellos. De los dos helechos película, es con *H. cruentum* con el que se detectan las diferencias mayores. Con éste, *A. ceterach* (helecho doradilla) difiere en los contenidos de ácido clorogénico de frondes hidratadas en aproximadamente 5 veces, mientras que con las desecadas lo hace en unas 6 veces. Haciendo el mismo ejercicio con el ácido cafeico, se tiene que *A. ceterach* posee concentraciones alrededor de 0,18 mg/g PS inferiores en frondes hidratadas y 0,06 mg/g PS menores en las desecadas (Živkovi *et al.*, 2010). Con *R. serbica*, por el otro lado, las discrepancias en los contenidos de ácido clorogénico se hacen mucho más grandes. *H. cruentum* posee (como promedio de las tres irradianzas) 52, 125 y 41 veces más que la dicotiledónea en los tejidos foliares hidratados, desecados y rehidratados, respectivamente. Si se efectúa ahora el mismo tipo de comparaciones, pero con los datos disponibles sólo para las hojas desecadas de *H. rhodopensis*, se tiene que en éstas el ácido más abundante no es el clorogénico, sino que el sinápico (Mihaylova *et al.*, 2011). Esta forma de ácido cinámico (Vermerriis & Nicholson, 2006), no fue analizada en los helechos, lo cual hace imposible efectuar comparaciones más directas. En cambio, éstas si pueden llevarse a cabo con los ácidos cafeico, clorogénico, ferúlico y gálico; así como también, con los flavonoides rutina, miricetina, quercetina y kaempferol (considerando para este propósito

sólo las frondes desecadas de los helechos). Todos estos se encontraron en concentraciones mucho menores en *H. rhodopensis* (Mihaylova *et al.*, 2011). Las diferencias más grandes en los ácidos estuvieron en el gálico, el cual no está presente en ella y sí en ambas himenofiláceas, y en el clorogénico, que se encuentra más abundante en alrededor de 22,6 veces en *H. cruentum* y 1,5 veces en *H. dentatum*. En cuanto a los flavonoides, el más abundante en las 3 especies fue la rutina. No obstante, el primer lugar lo sigue teniendo *H. cruentum* con un promedio (nuevamente entre las 3 irradianzas) de 62,7 mg/g PS, seguido por *H. dentatum* con 6,6 mg/g PS, y por *H. rhodopensis* con 2,22 mg/gPS. Además de las diferencias en las concentraciones de polifenoles, se tienen también las discrepancias en el efecto que ejerce el estado hídrico foliar sobre las mismas según sea la especie de resurrección. Por ejemplo, en *Selaginella lepidophylla* y *H. rhodopensis* la desecación induce, respectivamente, la acumulación de fenólicos como el cafeato, flavonoles como la apigenina y la naringenina, y fenilpropanoides como el alcohol coniferílico (Yobi *et al.*, 2013), o un incremento en la concentración de fenoles totales (Djilianov *et al.*, 2010). En cambio en *R. serbica* ocurre la respuesta opuesta, pues los ácidos fenólicos disminuyen en hojas desecadas (Sgherri *et al.*, 2004; Veljovic-Jovanovic *et al.*, 2008). Para el caso específico de las himenofiláceas, los cambios en el estado de hidratación de sus frondes no produjeron mayores variaciones en la concentración de los polifenoles de *H. cruentum*, pero sí lo hicieron en mayor medida con los de *H. dentatum*. De hecho, en el último se detectó siempre (bajo todas las irradianzas) variaciones en al menos uno de los ácidos y casi siempre (en las dos irradianzas más altas) en al menos 2 de los flavonoides. Los cambios evidenciados fueron, en su mayoría, en la condición desecada respecto a la hidratada, siendo principalmente de disminución en las irradianzas baja e intermedia, y de incremento en la más alta (Tabla 2 y 3). Estas respuestas de disminución en al menos uno

de los ácidos de los helechos película, se asemejan más a las de *R. serbica*. Esto sugiere que en estas tres especies tales compuestos podrían tener un rol importante en la protección contra el estrés oxidativo al funcionar como sustratos para las PPOs y/o PODs (Hadzi-Taskovic Sukalovic *et al.*, 2003, Sgherri *et al.*, 2003; Sgherri *et al.*, 2004). Un punto importante a destacar en favor de este estudio, y que lo distingue de los otros trabajos con plantas de resurrección en el tópic, es la inclusión de condiciones lumínicas distintas en los tratamientos hídricos. Gracias a esto se puede decir que las respuestas de incremento o disminución de los contenidos de polifenoles, no necesariamente son las mismas si los episodios de desecación/rehidratación ocurren bajo condiciones de irradianza diferentes a las experimentales. Evidencia clara de esto es lo que ocurre con *H. cruentum* y *H. dentatum*, en los cuales el ácido cafeico disminuye en estado desecado respecto al hidratado bajo condiciones de $\pm 30 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$, pero aumenta bajo irradianzas de $\pm 150 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Tabla 2 y 3). Esto demuestra que aun cuando la concentración de polifenoles puede depender del estado hídrico foliar, bajo condiciones naturales de campo las respuestas estarían mayormente moduladas por la interacción entre éste y la intensidad lumínica incidente.

Por otro lado, y contrario a lo hasta ahora realizado, los resultados concernientes a los tococromanoles de ambas himenofiláceas no pueden ser comparados en su totalidad con los de otras plantas de resurrección. Esto a razón de que en el tema aún existen muy pocos estudios que relacionen la presencia y contenidos de estos antioxidantes con la tolerancia a la desecación de tejidos fotosintéticos. De hecho, hasta la fecha existen sólo tres trabajos en donde se analizó la concentración de tocoferoles foliares y la incidencia sobre la misma del estado hídrico de las hojas. Cotejando los resultados de ellos con los obtenidos para los 2 helechos, se tiene que los últimos concuerdan con *Selaginella lepidophylla* en la presencia

de dos formas de tocoferol, pero difieren con *M. flabellifolious* y *Sporobolus stapfianus* que poseen tres. Además se obtuvo que los tipos de tocoferoles en las himenofiláceas no concuerdan del todo con los descritos para las otras tres plantas. Específicamente, el licopodio, el arbusto y la gramínea presentan, respectivamente, α - y β -tocoferol (Yobi *et al.*, 2013), α -, β - y γ -tocoferol (Kranner *et al.*, 2002), y α -, β - y γ -tocoferol (Oliver *et al.*, 2011); en tanto que *H. cruentum* posee α - y β -tocoferol y *H. dentatum* tiene únicamente α -tocoferol. Tales diferencias entre las especies y grupos funcionales, podrían estar explicadas por discrepancias, por ejemplo, en la disponibilidad de sustratos para las tocoferol-ciclasas o en la síntesis y/o actividad de las mismas para utilizar el 2-metil-6-fitol-1,4-benzoquinona (MPBQ) y el 2,3-dimetil-6-fitol-1,4-benzoquinona (DMPBQ), y generar, según corresponda, α - o β -tocoferol. Así, en ciertas ocasiones se puede ver favorecida la síntesis de uno de estos compuestos, lo que junto con una sobreexpresión de la α -tocopherol metiltransferasa (enzima que a partir de α - o β -tocoferol genera β - o α -tocoferol) puede traducirse en su rápida conversión en el consecuente producto y, por ende, la falta de pesquisa del otro (Shintani & DellaPenna, 1998; Porfirova *et al.*, 2002; Collakova & DellaPenna, 2003a, b; Sattler *et al.*, 2003; Kanwischer *et al.*, 2005). Por su parte, cuando se cotejan los efectos del estado hídrico foliar sobre la concentración de los tocoferoles coincidentes entre las plantas mencionadas, se tiene que tanto en *H. cruentum* como en *S. stapfianus* la desecación induce la síntesis de α -tocoferol. A pesar de que existen ciertas diferencias entre ellas en la magnitud de la respuesta, éstas no son tan amplias como podría esperarse si se considera la anatomía foliar tan distinta entre los dos grupos. La relativa cercanía en incremento de contenidos de α -tocoferol es principalmente evidente al comparar las concentraciones de la gramínea con las de *H. cruentum* a irradianza

intermedia (Fig. 23A). En ésta, las frondes desecadas del helecho exhiben concentraciones 2 veces superiores a las hidratadas; en tanto que las pares desecadas de *S. stapfianus* superan en 2,8 veces a aquellas hidratadas (Oliver *et al.*, 2011). Opuesto a dichos incrementos, se encuentran el decaimiento de un 75% del α -tocoferol de hojas desecadas de *M. flabellifolius* (con respecto a las hidratadas o control), (Kranmer *et al.*, 2002), y la ausencia de cambios en el mismo en *S. lepidophylla* (Yobi *et al.*, 2013). Estos resultados también llaman la atención debido a que a la irradianza en que se efectuaron los experimentos con el arbusto y el licopodio, y que equivale a la más baja de las aplicadas a los dos helechos, no se detectó variación alguna en estos últimos (Fig. 23A-B). Finalmente, y en cuanto al PC-8, éste es su primer registro en organismos vegetales reconocidos oficialmente como plantas de resurrección. Así la única alternativa de comparación posible es acudir a aquellos trabajos en los que ha sido considerado a modo de herramienta taxonómica (Velasco & Goffman, 2000), cuantificado como parte del sistema antioxidante (Strzalka *et al.*, 2009; Strzalka *et al.*, 2011), o analizado en relación a su rol fisiológico específico en plantas sensibles a la desecación (Mène-Saffrané *et al.*, 2010, Szymanska & Kruk, 2010a, 2010b; Zbierzak *et al.*, 2010). Aun cuando el PC-8 se encuentra presente en *H. dentatum*, los contenidos en él detectados están muy por debajo de lo reportado para formas vegetales superiores que habitan, por ejemplo, la zona sur y Patagonia Chilena: *Araucaria araucana* (132,0 \pm 8,4 μ gPC/g PS), *Fuchsia magellanica* (66,0 \pm 3,3 μ gPC/g PS) y *Nothofagus betuloides* (44,0 \pm 0,6 μ gPC/g PS). Sin embargo, están en el rango de algunas menores, como el briófito *Hypopterygium arbuscula* (3,4 \pm 0,7 μ gPig/g PS) y la asterácea *Mutisia spinosa* (2,8 \pm 0,2 μ gPig/g PS), e incluso superan a otras como el helecho *Blechnum chilense*, el cual, igual que *H. cruentum*, no posee PC-8 en sus frondes (Strzalka *et al.*, 2009). Además de tales similitudes y discrepancias, *H. dentatum* también exhibe

concentraciones parecidas a dos musgos habitantes de la antártica: *Syntrichia magellanica* ($3,6 \pm 1,0 \mu\text{g Pig/gPS}$) y *Warnstrofia sarmentosa* ($3,8 \pm 0,8 \mu\text{gPig/g PS}$), pero difiere con otros tres: *Bryum pseudotrichetrum* ($12,7 \pm 2,2 \mu\text{gPig/g PS}$), *Polytrichastrum alpinum* ($19,1 \pm 0,85 \mu\text{gPig/g PS}$) y *Sanionia georgicouncinata* ($0,0 \mu\text{gPig/g PS}$), al exhibir éstos contenidos por sobre los $10,0 \mu\text{gPig/g PS}$ o la ausencia total del compuesto (Strzalka *et al.*, 2011). Aunque todavía no se ha establecido una relación directa entre la presencia/ausencia de PC-8 y la tolerancia a la desecación de plantas de resurrección, tanto los resultados obtenidos por éste y otros estudios (Olejnik *et al.*, 1997; Gruszka *et al.*, 2008; Szymanska & Kruk, 2010; Nowicka *et al.*, 2013), dejan a la luz que este tococromanol puede ser importante bajo situaciones en que el déficit hídrico extremo y la alta irradianza actúan de manera simultánea. Concretamente, la detección de los productos de oxidación parcial o total del PC-8 en sistemas de experimentación *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*, demostraron que éste es eficiente tanto en la inhibición de la oxidación de lípidos (Olejnik *et al.*, 1997; Nowicka *et al.*, 2013), como en el “apagamiento” del $^1\text{O}_2$ generado fotoquímicamente (Gruszka *et al.*, 2008; Szymanska & Kruk, 2010; Nowicka *et al.*, 2013). Además, el que la ausencia de tocoferoles, pero presencia de PC-8 (mutante *vte2*) haya atenuado o suprimido los efectos que la carencia de tocoferoles, PC-8 y DMPBQ (mutante *vte2 vte1*) tuvo sobre el desarrollo de plántulas, crecimiento de la raíz y adecuación biológica de *Arabidopsis thaliana*, también apoya la teoría de que el PC-8 es un antioxidante lipídico esencial durante la desecación y quiescencia de semillas (Mène-Saffrané *et al.*, 2010). Por lo tanto, la presencia de PC-8 sólo en *H. dentatum*, así como también, en algunos de los briófitos que habitan la Antártica, indica que este antioxidante puede ser muy importante en la complementación de la protección antioxidante de las membranas cloroplastidiales bajo condiciones de deshidratación extrema y alta irradianza. Esto podría ser en un futuro

próximo corroborado por medio de la detección del PC-OH en tejidos vegetativos de éstas u otras especies de resurrección, las cuales hayan sido previamente sometidas a tratamientos similares a los empleados en este trabajo de tesis.

De todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que cuando se comparan los mecanismos de protección antioxidante entre los helechos película y otras plantas tolerantes a la desecación, los primeros exhiben respuestas que se encuentran perfectamente dentro del rango de aquellas reportadas para especímenes tanto menos como más evolucionados (hepáticas y angiospermas, por ejemplo). Así y todo, esto no quiere decir que todas las plantas de resurrección presentan el mismo patrón de respuesta (mecanismos de protección y/o niveles de daño) frente a ciclos de desecación/rehidratación bajo condiciones de irradiación, sino más bien que pueden compartir sólo parte de él, o que de hacerlo completamente, lo hacen en grados distintos. Por último, y dentro del contexto de cambio climático, los resultados obtenidos en este trabajo indican que de cumplirse las predicciones de descenso del 25-40% en las precipitaciones y de incremento de 3-4°C en la temperaturas de la zona centro-sur de Chile (37-45°S) hacia el año 2100 (Conama, 2006), los helechos película más sensibles a la desecación podrían verse mucho más afectados que aquellos más tolerantes. Esto no necesariamente por un efecto directo del déficit hídrico sobre ellos (pues no se debe olvidar que son plantas tolerantes a la desecación), si no que más bien por las consecuencias que éste traerá sobre sus forófitos y vegetación vecina sensibles a la desecación y que funcionan como huésped y/o protección contra el exceso de luz solar incidente. Por lo tanto, y como una predicción no muy alentadora, es probable que en los próximos años comiencen a observarse cambios negativos en la diversidad y abundancia de las Hymenophyllaceae del centro-sur de Chile, al tener que restringir algunas de éstas su distribución a zonas de más al sur en donde tanto la disponibilidad de sustrato como de

protección frente a la intensidad lumínica incidente no estén siendo afectadas por el cambio climático local.

VI. CONCLUSIONES FINALES

1. Las discrepancias en los grados de tolerancia a la desecación de los helechos película con diferentes preferencias de microhábitat en un bosque del sur de Chile, coinciden también con diferencias en sus respectivas capacidades de protección antioxidante. Así, aquellas especies de hábito más restringido y que poseen menor capacidad de remoción de radicales libres, son más sensibles a la desecación de sus frondes bajo condiciones lumínicas que exceden sus óptimos fotosintéticos.
2. Los efectos leves que el estado hídrico foliar y la intensidad lumínica tienen en la mayoría de las respuestas antioxidantes evaluadas en *H. cruentum* y *H. dentatum*, indican que la tolerancia a la desecación de la familia Hymenophyllaceae es más bien de tipo constitutivo que inducido por la deshidratación y/o rehidratación de sus frondes.
3. Los niveles de pardeamiento exhibidos por *H. cruentum* en experimentos previos se deberían efectivamente a la oxidación de polifenoles, siendo el ácido clorogénico el principal sustrato. No obstante, tal reacción sería provocada por el estrés mecánico ejercido durante la manipulación permanente de sus frondes para la determinación de ciertos parámetros fisiológicos (peso y eficiencia fotoquímica máxima), y no por su utilización excesiva como moléculas antioxidantes durante la rehidratación de las mismas.

VII. REFERENCIAS

ABBASI AR, HAJIREZAEI M, HOFIUS D, SONNEWALD U & LM VOLL (2007) Specific Roles of α - and γ -Tocopherol in Abiotic Stress Responses of Transgenic Tobacco. *Plant Physiology* 143: 1720-1738.

AHMAD P, SARWAT M & S SHARMA (2008) Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. *Journal of Plant Biology* 51: 167-173.

AINSWORTH EA & KM GILLESPIE (2007) Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols* 2: 875-877.

ALASALVAR C, GRIGOR JM, ZHANG D, QUANTICK PC & F SHAHIDI (2001) Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 1410-1416.

ALI A & F ALQURAINY (2006) Activities of antioxidants in plants under environmental stress. <http://faculty.ksu.edu.sa/AkramAli/Documents/Research%20papers/akk28.pdf>

ALLEN RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* 107: 1049-1054.

ALPERT P (2000) The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. *Plant Ecology* 151: 5-17.

ALPERT P & MJ OLIVER (2002) Drying without dying. En: BLACK M & HW PRITCHARD, eds. *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom, 3-43.

ALSCHER RG, ERTURK N & LS HEATH (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.

ANDRADE J & P NOBEL (1997) Microhabitats and water relations of epiphytic cacti and ferns in a lowland neotropical forest. *Biotropica* 29: 261-270.

ANDRADE J, GRAHAM E & G ZOTZ (2004) Determinantes morfofisiológicos y ambientales de la distribución de epifitas en el dosel de bosques tropicales. En: CABRERA M, eds. *Fisiología Ecológica en Plantas*. Ediciones Universitarias de Valparaíso, Chile, 139-156.

APEL K & H HIRT (2004) Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.

ARÉVALO R (2006) Vertical distribution of vascular epiphytes in four forest types of the Serranía de Chiribiquete, Colombian Guayana. *Selbyana* 27: 175-185.

ARO EM, VIRGIN I & B ANDERSSON (1993) Photoinhibition of photosystem II: inactivation, protein damage and turnover. *Biochimica et Biophysica Acta* 1143: 113-134.

ARORA A, SAIRAM RK & GC SRIVASTAVA (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.

ARVE LE, TORRE S, OLSEN JE & TANINO KK (2011) Stomatal Responses to Drought Stress and Air Humidity, *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*, Prof. Arun Shanker, ed. ISBN: 978-953-307-394-1, InTech, DOI: 10.5772/24661. Available from: <http://www.intechopen.com/books/abiotic-stress-in-plants-mechanisms-and-adaptations/stomatal-responses-to-drought-stress-and-air-humidity>

ASADA K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601-639.

ASADA K (2000) The water-water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society, London-England B* 355: 1419-1431.

ASADA K (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* 141: 391-396.

ASADA K & M TAKAHASHI (1987) Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: KYLE DJ, OSMOND CB & CJ ARNTZEN, Eds. Photoinhibition: Topics of Photosynthesis. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 227-287.

AUGUSTI A, SCARTAZZA A, NAVARI-IZZO F, SGHERRI CL, STEVANOVIC B & E BRUGNOLI (2001) Photosystem II photochemical efficiency, zeaxanthin and antioxidant contents in the poikilohydric *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Photosynthesis Research* 67: 79-88.

AUSTIN JR, FROST E, VIDI PA, KESSLER F & LA STAEHELIN (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *The Plant Cell* 18: 1693-1703.

BAGNIEWSKA-ZADWORNIA A, ZENKTELER E, KAROLEWSKI P & M ZADWORNIA (2008) Phenolic compound localization in *Polypodium vulgare* L. rhizomes after mannitol-induced dehydration and controlled desiccation. *Plant Cell Reports* 27: 1252-1259.

BAGCI E, BRUEHL L, AIZETMULLER K & Y ALTAN (2004a). Fatty acid and tocochromanol patterns of some Turkish Boraginaceae: A chemotaxonomic approach. *Nordic Journal of Botany* 22: 719-726.

BAGCI E, VURAL M, DIRMENCI T, BRUEHL L & K AITZETMULLER (2004b) Fatty acid and tocochromanol patterns of some *Salvia* L. (Lamiaceae) sp. from Turkey. *Zeitschrift Fur Naturforsch* 59: 305-309.

BAKER A & AI GRAHAM (2002) *Plant Peroxisomes: Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

BALASUNDRAM N, SUNDRAM K & S SAMMAN (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* 99: 191-203.

BARRS HD & PE WEATHERLEY (1962) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological*

Sciences15: 413-28.

BAUER H, ACHE P, LAUTNER S, FROMM J, HARTUNG W, AL-RASHEID KA, SONNEWALD S, SONNEWALD U, KNEITZ S, LACHMANN N, MENDEL RR, BITTNER F, HETHERINGTON AM & R HEDRICH (2013) The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Current Biology* 23: 53-57.

BERGMÜLLER E, POFIROVA S & P DÖRMANN (2003) Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in -tocopherol methyltransferase. *Plant Molecular Biology* 52: 1181-1190.

BERKOV SH, NIKOLOVA MT, HRISTOZOVA NI, MOMEKOV GZ, IONKOVA II & DL DJILIANOV (2011) GC-MS profiling of bioactive extracts from *Haberlea rhodopensis*: an endemic resurrection plant. *Journal of Serbian Chemistry Society* 76: 211-220.

BEWLEY JD (1979) Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annual Reviews of Plant Physiology* 30: 195-238.

BEWLEY JD & JE KROCHKO (1982) Desiccation-tolerance. En: LANGE OL, NOBEL PS, OSMOND CB & H ZIEGLER, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology, Vol. 12 B, Physiological Ecology II*. Springer-Verlag, Berlín, 325-378.

BJÖRKMAN O & B DEMMIG (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.

BLOIS MS (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.

BLOKHINA O, VIROLAINEN E & KV FAGERSTED (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91: 179-194.

BLOKHINA O & KV FAGERSTEDT (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in

plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum* 138: 447-462.

BORS W, HELLER W, MICHEL C & K STETTMAIER (1996) Flavonoids and polyphenols: chemistry and biology. En: CADENAS E & L PAKER, eds. *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, New York, 409-466.

BRAVO L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56: 317-333.

BUTLER WL (1978) Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 29: 345-78.

CAHOON E, HALL S, RIPP K, GANZKE T, HITZ W & S COUGHLAN (2003) Metabolic redesign of vitamin E Biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nature Biotechnology* 21: 1082-1087.

CARTER CM, GHEYASUDDIN S & KF MATILL (1972) The effect of chlorogenic, caffeic and quinic acids on the solubility and color of protein isolates, especially from sunflower seed. *Cereal Chemistry* 49: 508-514.

CLARK WL, MONDY N, BEDROSIAN K, FERRARI RA & CA MICHON (1957) Polyphenolic and enzyme activity of two varieties of potato. Preliminary report. *Food Technology* 11: 297-301.

COLLAKOVA E & D DELLAPENNA (2003a) Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 632-42.

COLLAKOVA E & D DELLAPENNA (2003b) The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiology* 133: 930-940.

CONAMA (2006) Estudio de la variabilidad climática en Chile para el Siglo XXI. Informe Final. Santiago de Chile, Universidad de Chile, Departamento de Geofísica de la Facultad de Ciencias, Físicas y Matemáticas. 63pp.

CORNIC G (2000) Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture: not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science* 5: 187-188.

CORPAS FJ, BARROSO JB & LA DEL RÍO (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* 6: 145-150.

CRUZ DE CARVALHO MH (2008) Drought stress and reactive oxygen species. Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3: 156-165.

DARWIN F (1898) Observations on stomata. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 190: 531-621.

DAT J, VENDENABEELE S, VRANOVA E, VAN MONTAGU M, INZÉ D & F VAN BREUSEGEM (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.

D'AMBROSIO N, ARENA C & AVIRZO DE SANTO (2006) Temperature response of photosynthesis, excitation energy dissipation and alternative electron sinks to carbon assimilation in *Beta vulgaris* L. *Environmental and Experimental Botany* 55: 248-257.

DEL RÍO LA, CORPAS FJ, SANDALIO LM, PALMA JM, GÓMEZ M & JB BARROSO (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1255-1272.

DEL RÍO LA, SANDALIO LM, CORPAS FJ, PALMA JM & JB BARROSO (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141: 330-335.

DEELL JR, VAN KOOTEN O, PRANGE RK & DP MURR (1999) Applications of chlorophyll fluorescence techniques in postharvest physiology. *Horticulture Review* 23: 69-107.

DELLAPENNA D & BJ POGSON (2006) Vitamin Synthesis in Plants: Tocopherols and Carotenoids. *Annual Reviews of Plant Biology* 57: 11-38.

DICKINSON KJM, MARK AF & B DAWKINS (1993) Ecology of lianoid/epiphytic communities in coastal podocarp rain forest, Haast Ecological District, New Zealand. *Journal of Biogeography* 20: 687-705.

DIETZ KJ (2003) Plants peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 93-107.

DISMUKES GC, KLIMOV VV, BARANOV SV, KOZLOV YN, DASGUPTA J & A TYRYSHKIN (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: The innovation of oxygenic photosynthesis. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 98: 2170-2175.

DINAKAR C, DJALIANOV D & D BARTELS (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Science* 182: 29-41.

DIXON RA & NL PAIVA (1995) Stress-induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085-1097.

DJILIANOV D, IVANOV S, MOYANKOVA D, MITEVA L, ALEXIEVA V, JOUDI M, PESHEV D & W VAN DEN ENDE (2011) Sugar ratios, glutathione redox status and phenols in the resurrection species *Haberlea rhodopensis* and the closely related non-resurrection species *Chirita eberhardtii*. *Plant Biology* 13: 767-776.

DOKE N (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology* 23: 345-357.

DUBUISSON JY (1997) rbcL sequences: a promising tool for the molecular systematics of the fern genus *Trichomanes* (Hymenophyllaceae)? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 128-138.

DUBUISSON JY, S HENNEQUIN, F RAKOTONDRAINIBE & H SCHNEIDER (2003) Ecological diversity and adaptative tendencies in the tropical fern *Trichomanes* L. (Hymenophyllaceae) with special reference to climbing and epiphytic habits. *Botanical Journal of the Linnean Society* 142: 41-63.

DUNPHY PJ, WHITTLE JK & JF PENNOCK (1966) Plastochromanol. In: GOODWIN TW, ed. Biochemistry of Chloroplasts, Vol. 1. Academic Press, London, 165-171.

EDREVA A (2005) Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. Agriculture, Ecosystems and Environment 106: 119-133.

ELSTNER EF (1987) Metabolism of activated oxygen species. In: Davies DD, ed. Biochemistry of plants, Vol. 11. Academic Press, London, 253-315.

ENGWALD S (1999) Diversitat und Okologie der vaskulären Epiphyten eines Berg- und eines Tieflandregenwaldes in Venezuela. Books on Demand, Hamburg. 390pp.

EVANS GB (1964) Studies on the autecology of the British species of *Hymenophyllum*, *H. wilsonii* Hk and *H. tunbrigense* (L.) Sm. PhD Thesis, University of Wales.

FAKUMOTO LR & G MAZZA (2000) Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 3597-3604.

FALK J & S MUNNÉ-BOSCH (2010) Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. Journal of Experimental Botany 61: 1549-1566.

FARRANT JM (2000) A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plants species. Plant Ecology 151: 29-39.

FAROOQ M, WAHID A, KOBAYASHI N, FUJITA D & SMA BASRA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development 29: 185-212.

FARRANT JM (2000) A Comparison of Mechanisms of Desiccation Tolerance among Three Angiosperm Resurrection Plant Species. Plant Ecology 151: 29-39.

FARRANT JM, BRANDT W & GG LINDSEY (2007) An Overview of Mechanisms of Desiccation Tolerance in Selected Angiosperm Resurrection Plants. Plant Stress 1: 72-84.

FARRANT JM, LEHNER A, COOPER K & S WISWEDEL (2009) Desiccation tolerance in the vegetative tissues of the fern *Mohria caffrorum* is seasonally regulated. The Plant

Journal 57: 65-79

FOYER C & G NOCTOR (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.

FREIBERG M (1996) Spatial distribution of vascular epiphytes on three emergent canopy trees in French Guiana. *Biotropica* 28: 345-355.

FRIDOVICH I (1998) Oxygen Toxicity: A Radical Explanation. *The Journal of Experimental Botany* 201: 1203-1209.

FRYER MJ (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin-E (α -tocopherol). *Plant, Cell and Environment* 15: 381-392.

FRYER MJ, OXBOROUGH K, MULLINEAUX PM & NR BAKER (2002) Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany* 53: 1249-1254.

GAFF DF (1971) Desiccation tolerant flowering plants in Southern Africa. *Africa Science*: 174: 1033-1034.

GEORGIEVA K, SZIGETI Z, SARVARI E, GASPAR L, MASLENKOVA L, PEEVA V, PELI E & Z TUBA (2007) Photosynthetic activity of homoiochlorophyllous desiccation tolerant plant *Haberlea rhodopensis* during dehydration and rehydration. *Planta* 225: 955-964.

GEORGIEVA K, SÁRVÁRI E & A KERESZTES (2010) Protection of thylakoids against combined light and drought by a luminal substance in the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Annals of Botany* 105: 117-126.

GESSNER F (1940) Die Assimilation der Hymenophyllaceen. *Protoplasma* 34: 102-116.

GILL SS & N TUTEJA (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

GRACE SC & BA LOGAN (2000) Energy dissipation and radical scavenging by the plant

phenylpropanoid pathway. Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series B, Biological sciences 355: 1499-1510.

GRAYUM MH & HW CHURCHILL (1989) The vascular flora of La Selva Biological Station, Costa Rica – Polypodiophyta. Selbyana 11: 66-118.

GRUSAK MA & D DELLAPENNA (1999) Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 133-161.

GRUSZKA J, PAWLAK A & J KRUK (2008) Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers-determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. Free Radical Biology & Medicine 45: 920-928.

HADŽI-TAŠKOVI ŠUKALOVI V, VULETI M. & Ž VU INI (2003) Plasma membrane-bound phenolic peroxidase of maize roots: in vitro regulation of activity with NADH and ascorbate. Plant Science 165: 1429-1435,

HALLIWELL B & JMC GUTTERIDGE (1999) Free Radicals in Biology and Medicine, third edition. Oxford University Press, Oxford.

HARBORNE J. 1993. Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London.

HÄRTEL O (1940b) Physiologische studien an Hymenophyllaceen. II. Wasserhaushalt und Resistenz . Protoplasma 34: 489-514.

HAVAUX M, EYMERY F, PORFIROVA S, REY P & P DÖRMAN (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 17: 3451-3469.

HEBER U, LANGE OL & VA SHUVALOV (2006) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. Journal of Experimental Botany 57: 1211-1223

HERNÁNDEZ-ROSAS J (1999) Diversidad de grupos funcionales de plantas del dosel de un bosque húmedo tropical del alto Orinoco, Estado Amazonas, Venezuela. *Ecotropicos* 12: 33 - 48.

HIETZ P & U HIETZ-SEIFERT (1995) Structure and ecology of epiphyte communities of a cloud forest in central Veracruz, Mexico. *Journal of Vegetation Science* 6: 719-728.

HODGES DM, DELONG JM, FORNEY CF & RK PRANGE. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.

HOEKSTRA FA, GOLOVINA EA & J BUITINK (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431- 438.

HOLLOWAY JE (1923) Studies in the New Zealand Hymenophyllaceae. Part 1. The distribution of the species in Westland, and their growth forms. *Transactions of the New Zealand Institution* 54: 577-618.

HOOIJMAIJERS CAM (2008) Desiccation tolerance in red and green gametophytes of *Jamesoniella colorata* in relation to photoprotection. *Planta* 227: 1301-1310.

HOUGHTON PJ (2002) Chromatography of the chromone and flavonoid alkaloids. *Journal of Chromatography A* 967: 75-84.

HSIAO TC (1973) Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 519-570.

HUANG AHC, TRELEASE RN & TS MOORE (1983) *Plant Peroxisomes*. Academic Press, New York, NY.

HUNER NPA, ÖQUIST G & F SARHAN (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3: 224-230.

IWATSUKI K (1990) Hymenophyllaceae. In: KUBITZKI K, ed. *The families and genera of vascular plants, Vol. I. Pteridophytes and gymnosperms*. Berlin: Springer-Verlag, 157-

163.

JALEEL CA, MANIVANNAN P, WAHID A, FAROOQ M, AL-JUBURI HJ, SOMASUNDARAM R & RP VAM (2009) Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology* 11: 100-105.

JANERO DR (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 515-540.

JOHNSON GN, YOUNG AJ, SCHOLES JD & P HORTON (1993) The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant, Cell and Environment* 16, 673-679.

JOHNSON GN, RUMSEY FJ, HEADLEY AD & E SHEFFIELD (2000) Adaptations to extreme low light in the fern *Trichomanes speciosum*. *New Phytologist* 148: 423-431.

JOVANOVIC Z, RABIC T, STEVANOVIC B & S RADOVIC (2011) Characterization of oxidative and antioxidative events during dehydration and rehydration of resurrection plant *Ramonda nathalie*. *Plant Growth Regulation* 64: 231-240.

KAISER WM (1987) Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum* 71: 142-149.

KAISER S, DIMASCIO P, MURPHY ME & H SIES (1990) Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 277: 101-108.

KAMAL-ELDIN A & L APPELQVIST (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 31: 671-701.

KANWISCHER M, PORFIROVA S, BERGMULLER E & P DORMANN (2005) Alterations in tocopherols cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affects tocopherol content, tocopherol composition, and oxidative stress. *Plant Physiology* 137: 713-23.

KAPPUS H (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. En: SIES H, ed. Oxidative stress. Academic Press, London, UK, 273-310.

KARUPPANAPANDIAN T, WANG HW, PRABAKARAN N, JEYALAKSHMI K, KWON M, MANOHARAN K & W KIM (2011) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 168-177.

KELLY DL (1985) Epiphytes and climbers of a Jamaican rain forest: vertical distribution, life form and life histories. *Journal of Biogeography* 12: 223-241.

KELLY DL, DONOVAN G, FEEHAN J, MURPHY S, DRANGEID S & L MARCANO-BERTI (2004) The epiphyte communities of a montane rain forest in the Andes of Venezuela: Patterns in the distribution of the flora. *Journal of Tropical Ecology* 20: 643-666.

KENRICK P & P CRANE (1997) The origin and early diversification of land plants, a Cladistic study. Smithsonian Institution Scholarly Press, Washington DC, USA. 441 pp.

KHADEM S & RJ MARLES (2010) Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules* 15: 7985-8005.

KING A, GOTTLIEB E, BROOKS DG, MURPHY MP & JL DUNAIEF (2004) Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochemistry and Photobiology* 79: 470-475.

KIRBY TW & I FRIDOVICH (1982) A picomolar spectrophotometric assay for superoxide dismutase. *Annals of Biochemistry* 127: 435-440.

KNOX JP & AD DODGE (1985) Singlet oxygen and plants. *Phytochemistry* 24: 889-893.

KRANNER I, BECKETT RP, WORNIK S, ZORN MARGRET & PFEIFHOFER HW (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *The Plant Journal* 31: 13-24.

KRANNER I (2009) Glutathione Status Correlates with Different Degrees of Desiccation Tolerance in Three Lichens. *New Phytologist* 154: 451-460.

KRIEGER-LISZKAY A (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* 56: 337-346.

KRÖMER T & M KESSLER (2006) Filmy ferns (Hymenophyllaceae) as high-canopy epiphytes. *Ecotropica* 12: 57-63.

KRUK J, HOLLÄNDER-CZYTKO H, OETTMEIER W & A TREBST (2005) Tocopherol as singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Journal of Plant Physiology* 162: 749-757.

KUDA T, TSUNEKAWA M, HISHI T & Y ARAKI (2005) Antioxidant properties of dried 'kayamo-nori', a brown alga *Scytosiphon lomentaria* (Scytosiphonales, Phaeophyceae). *Food Chemistry* 89: 617-622.

KUMAR R, RACLARU M, SCHÜBELER T, GRUBER J, SADRE R, LÜHS W, ZARHLOUL KM, FRIEDT W, ENDERS D, FRENTZEN M & D WEIER (2005) Characterization of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic *Brassica napus* seeds. *FEBS Letters* 579: 1357-1364.

LASS A & RS SOHAL (1998) Electron transport-linked ubiquinone-dependent recycling of alpha-tocopherol inhibits auto-oxidation of mitochondrial membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 352: 229-236.

LAWLOR DW (2002) Limitation to Photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the Role of ATP. *Annals of Botany* 89:871-885.

LAWLOR DW & G CORNIC (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 24: 275-294.

LE TN & SJ McQUEEN-MASON (2006) Desiccation-tolerant plants in dry environments. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 5: 269-279.

- LELLINGER DB (1994) Hymenophyllaceae. En: RIJN ARAG, ed. Flora of the Guineas. Königstein. Series. B, Fasc. 3; 1-66.
- LEVITT J (1980) Responses of plants to environmental stresses. 2nd ed. Academic Press, New York.
- LICHTENTHALER H & A WELLBURN (1983) Determination of total carotenoids and chlorophyll *a* and *b* of leaf extract in different solvents. Biochemical Society Transactions 603: 591-592.
- LIEBLER DC (1993) The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Critical Reviews in Toxicology 23: 147-169.
- LISAR SYS, MOTAFAKKERAZAD R, HOSSAIN MM & IMM RAHMAN (2012). Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. In: RAHMAN IMM, Ed. ISBN: 978-953-307-963-9, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/water-stress/water-stress-inplants-causes-effects-and-responses>
- LIU X, HUA X, GUO J, QI D, WANG D, LIU Z, JIN Z, CHEN S & G LIU (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. Biotechnology Letters 30: 1275–1280.
- LUSHCHAK VI & NM SEMCHUK (2012) Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. Acta Physiologia Plantarum 34: 1607-1628.
- MAEDA H & D DELLAPENNA (2007) Tocopherol Functions in Photosynthetic Organisms. Current Opinion in Plant Biology 10: 260-265.
- MAYER H, METZGER J & O ISLER (1967) Die Stereochemie von natürlichen "7-Tocotrienol (Plastochromanol-3), Plastochromanol-8 and Plastochromenol-8. Helvetica Chimica Acta 50: 1376-1393.
- MCKERSIE BD & YY LESHEM (1994) Oxidative stress. In: MCKERSIE BD & YY LESHEM, eds. Stress and Stress Coping in Cultivated Plants. Kluwer, Dordrecht, 15-54.

MEHLER AH (1957) Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 33: 65-77.

MÈNE-SAFFRANÉ, JONES D & D DELLAPENNA (2010) Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 17815-17820.

MIHAYLOVA D, BAHCHEVANSKA S & V TONEVA (2011) Examination of the antioxidant activity of *Haberlea rhodopensis* leaf extracts and their phenolic constituents. *Journal of Food Biochemistry* 37: 255-261.

MISHRA N, MISHRA R & G SINGHAL (1993) Changes in the Activities of Anti-Oxidant Enzymes during Exposure of Intact Wheat Leaves to Strong Visible Light at Different Temperatures in the Presence of Protein Synthesis Inhibitors. *Plant Physiology* 102: 903-910.

MISHRA KB, IANNACONE R, PETROZZA A, MISHRA A, ARMENTANO N, LA VECCHIA G, TRTÍLEK M, CELLINI F & L NEDBAL (2012) Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Science* 182: 79-86.

MITTLER R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.

MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M & F VAN BREUSEGEM (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.

MÖLLER IM (2001) Plant Mitochondria and Oxidative Stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561-591.

MOLYNEUX P (2004) The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26: 211-219.

MOTLHANKA DMT & G MATHAPA (2012) Antioxidant activities of crude extracts from medicinal plants used by diabetic patients in Eastern Botswana. *Journal of Medicinal Plant Research* 6: 5460-5463.

MÜLLER P, LI XP & KK NIYOGI (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* 125: 1558-1566.

MUNNÉ-BOSCH S & L ALEGRE (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Science* 21: 31-57.

MUNNÉ-BOSCH S & L ALEGRE (2003) Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of Labiatae plants differing in carnosic acid contents. *Plant Physiology* 131: 1816-1825.

MUNNÉ-BOSCH S & J FALK (2004) New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta* 218: 323-326.

MUNNÉ-BOSCH S, SCHWARZ K & L ALEGRE (1999) Enhanced formation of α -tocopherol and highly oxidized abietane diterpenes in water stressed rosemary plants. *Plant Physiology* 121: 1047-1052.

MUÑOZ A, CHACÓN P, PÉREZ F, BARRER E & J ARMESTO (2003) Diversity and host tree preferences of vascular epiphytes and vines in a temperate rainforest in southern Chile. *Australian Journal of Botany* 51: 381-391.

MURPHY MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417: 1-13.

NAVARI-IZZO F, MENEGUZZO S, LOGGINI B, VAZZANA C & CLM SGUERRI (1997a) The role of glutathione system during dehydration of *Boea hygroskopica*. *Physiologia Plantarum* 99: 23-30.

NAVARI-IZZO F, QUARTACCI MF & CLM SGUERRI (1997b) Desiccation Tolerance in Higher Plants Related to Free Radical Defenses. *Phyton (Austria) Special issue* 37: 203-214.

NAVROT N, ROUHIER N, GELHAYE E & JP JACQUOT (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 185-195.

NEELY WC, MARTIN M & SA BARKER (1988) Products and relative reaction rates of the oxidation of tocopherols with singlet molecular oxygen. *Photochemistry & Photobiology* 48: 423-428.

NIYOGI KK (1999) Photoprotection Revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 333-359.

NOCTOR G & C FOYER (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Reviews of Plant Biology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.

NOCTOR G, VELJOVIC-JOVANOVIC S, DRISCOLL S, NOVITSKAYA L & CH FOYER (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* 89: 841-850.

NOCTOR G, DE PAEPE R & CH FOYER (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 12: 125-134.

NOWICKA B, GRUSZKA J & J KRUK (2013) Function of plastochromanol and other biological prenyl lipids in the inhibition of lipid peroxidation - A comparative study in model systems. *Biochimica et Biophysica Acta* 1828: 233-240.

OLEJNIK D, GOGOLEWSKI M & M NOGALA-KAIUCKA (1997) Isolation and some properties of plastochromanol-8. *Molecular Nutrition & Food Research* 41: 101-104.

OLIVER MJ & JD BEWLEY (1997) Desiccation-Tolerance of Plant Tissues: A Mechanistic Overview. *Horticultural Reviews* 18: 171-213.

OLIVER MJ, WOOD AJ & P O'MAHONY (1998) "To dryness and beyond" – preparation for the dried state and rehydration in vegetative desiccation-tolerant plants. *Plant Growth Regulation* 24: 193-201.

OLIVER MJ, TUBA Z & BD MISHLER (2000) The evolution of desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecology* 151: 85-100.

OLIVER MJ, VELTEN J & BD MISHLER (2005) Desiccation Tolerance in Bryophytes: A Reflection of the Primitive Strategy for Plant Survival in Dehydrating Habitats? *Integrative and Comparative Biology* 45: 788-799.

OLIVER MJ, GUO L, ALEXANDER D, RYALS J, WONE B & JC CUSHMAN (2011) A sister group metabolomic contrast using untargeted global metabolomic analysis delineates the biochemical regulation underlying desiccation tolerance in *Sporobolus stapfianus*. *Plant Cell* 23: 1231-1248.

ÖQUIST G, CHOW WS & JM ANDERSON (1992) Photoinhibition of photosynthesis represents a mechanism for the long-term regulation of photosynthesis. *Planta* 186: 450-460.

ORT DR (2001) When There Is Too Much Light. *Plant Physiology* 125: 29-32.

ORT DR & NR BAKER (2002) A photoprotective role for O₂ as an alternative electron sink in photosynthesis? *Current Opinion in Plant Biology* 5: 193-198.

OSMOND B, BADGER M, MAXWELL K, BJÖRKMAN O & RC LEEGOOD (1997) Too many photons: photorespiration, photoinhibition and photooxidation. *Trends in Plant Science* 2: 119-121.

OSMOND CB, BJORKMAN O & DJ ANDERSON (1980) Physiological processes in plant ecology. Towards a synthesis with *Atriplex*. *Ecological Studies*, Vol. 36. Heidelberg: Springer-Verlag, 315pp.

ÖQUIST G, ANDERSON S McCAFFERY & W CHOW (1992) Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta* 199: 422-431.

PALATNIK JF, CARRILLO N & EM VALLE (1999) The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase. *Plant Physiology* 121: 471-478.

PARRA MJ, ACUÑA K, CORCUERA LJ & A SALDAÑA (2009) Vertical distribution of Hymenophyllaceae species among host tree microhabitats in a temperate rainforest in Southern Chile. *Journal of Vegetation Science* 20: 588-595.

PARRA MJ, ACUÑA KI, CORCUERA LJ & LA BRAVO (2008) Tolerancia a la desecación en dos Hymenophyllaceae con distribución contrastante en un bosque templado lluvioso del sur de Chile. Trabajo presentado a la Sociedad de Botánica de Chile en su XX Reunión Anual realizada en Olmué entre el 25 y el 27 de septiembre de 2008.

PARRA MJ, ACUÑA KI, CORCUERA LJ & R. RODRÍGUEZ (2012) Presencia de la familia Hymenophyllaceae (Pteridophyta) en el Parque Katalapi, Cordillera de Quillaipe, Provincia de Llanquihue, Chile. *Gayana Botanica* 69: 384-387.

PEÑUELAS J & S MÜNNÉ-BOSCH (2005) Isoprenoids: An evolutionary pool for photoprotection. *Trends in Plant Science* 10: 166-169.

POREMBSKI S & W BARTHLOTT (2000) Granitic and gneissic outcrops (Inselbergs) as a center of diversity for desiccation tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151: 19-28.

PORFIROVA S, BERGMÜLLER E, TROPF S, LEMKE R & P DÖRMANN (2002) Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis. [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America](#) 99: 12495-12500.

PROCTOR MCF (2003) Comparative ecophysiological measurements on the light responses, water relations and desiccation tolerance of the filmy fern *Hymenophyllum wilsonii* Hook. and *H. Tunbridgense* (L.) Smith. *Annals of Botany* 91: 717-727.

PROCTOR MCF (2012) Light and desiccation responses of some Hymenophyllaceae (filmy ferns) from Trinidad, Venezuela and New Zealand: poikilohydry in a light-limited but low evaporation ecological niche. *Annals of Botany* 109:1019-1026.

PROCTOR MCF & VC PENCE (2002) Vegetative Tissues: Bryophytes, vascular resurrection plants, and vegetative propagules. In: BLACK M & HW PRITCHARD, eds. *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*. Wallingford, Oxon. United

Kingdom, CABI Publishing, 207-237.

PRYER K, A SMITH, JE SKOG (1995) Phylogenetic relationships of extant ferns based evidence from morphology and *rbcL* sequences. *American Fern Journal* 85: 205-282.

RANDHIR R, LIN YT & K SHETTY (2004) Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13: 295-307.

RAO MV, GOPINADHAN P & DP ORMROD (1996) Ultraviolet-B- and Ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110: 125-136.

RASCIO N & N LA ROCCA (2005) Resurrection Plants: The Puzzle of Surviving Extreme Vegetative Desiccation. *Critical Reviews in Plant Science* 24: 209-225.

RASTOGI A, YADAV DK, SZYMÁNSKA R, KRUK J, SEDLÁ OVÁ M & P POSPÍŠIL (2014) Singlet oxygen scavenging activity of tocopherol and plastochromanol in *Arabidopsis thaliana*: relevance to photooxidative stress. *Plant, Cell & Environment* 37: 392-401.

RICE-EVANS CA & NJ MILLER (1998) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and isoflavonoids. En: RICE-EVANS CA & C PACKER, eds. *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker Press, New York, NY, 199-219.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ & G PAGANGA (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical and Biological Medicine* 20: 933-956.

RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2:152-159.

RICHARDS PW & GB EVANS (1972) Biological Flora of the British Isles. *Hymenophyllum*. *Journal of Ecology* 60: 245-268.

RHOADS DM, UMBACH AL, SUBBAIAH CC & JN SIEDOW (2006) Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiology* 141:357-366.

ROBBINS MP, PAOLOCCI F, HUGHES JW, TURCHETTI V, ALLISON G, ARCIONI S, MORRIS P & F DAMIANI (2003). Sn, a maize bHLH gene, modulates anthocyanin and condensed tannin pathways in *Lotus corniculatus*. *Journal of Experimental Botany* 54: 239-248.

ROBERTS NR, DALTON PJ & JJ JORDAN (2005) Epiphytic ferns and bryophytes of Tasmanian tree ferns: a comparison of diversity and composition between two host species. *Austral Ecology* 30: 146-154.

RODRÍGUEZ R (1995) Pteridophyta. En: MARTICORENA C & R RODRÍGUEZ, eds. *Flora de Chile*, Vol. 1. Editora Aníbal Pinto S.A. Concepción, Chile, 119-309.

ROGINSKY V & EA LISSI (2005) Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235-254.

ROSENQVIST E & O VAN KOOTEN (2003) Chlorophyll Fluorescence: A general description and nomenclature. En: DEELL JR & PMA TOIVONEN, eds. *Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology*, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/London, 31-77.

RUHLAND CT & TA DAY (2000) Effects of ultraviolet-B radiation on leaf elongation, production and phenylpropanoid concentrations in *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis* in Antarctica. *Physiologia Plantarum* 109: 244-251.

SALDAÑA A, PARRA MJ FLORES-BAVESTRELLO A, CORCUERA LJ & LA BRAVO (2013) Effects of forest successional status on microenvironmental conditions, diversity, and distribution of filmy fern species in a temperate rainforest. *Plant species biology* 29: 253-262.

SATTLER SE, CAHOON EB, COUGHLAN SJ & D DELLAPENNA (2003) Characterization of tocopherol cyclases from higher plants and cyanobacteria. *Evolutionary*

implications for tocopherol synthesis and function. *Plant Physiology* 132: 2184-2195.

SATTLER SE, GILLILAND LU, MAGALLANES-LUNDBACK M, POLLARD M & D DELLAPENNA (2004) Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell* 16: 1419-1432.

SCANDALIOS JG (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995-1014.

SCHICKLER H & H CASPI (1999) Response of Antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyper-accumulator plants of the genus *Alyssum*. *Physiologia Plantarum* 105: 39-44.

SCHNEIDER C (2005) Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 7-30.

SCOTT P (2000) Resurrection Plants and the Secrets of Eternal Leaf. *Annals of Botany* 85: 159-166.

SGHERRI C, COSI E & F NAVARI-IZZO (2003) Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum* 118: 21-28.

SGHERRI C, STEVANOVIC B & F NAVARI-IZZO (2004) Role of phenolics in the antioxidative status of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum* 122: 478-485.

SHARMA P, BHUSHAN JHA A, SHANKER DUBEY R & M PESSARAKLI (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012: 26.

SHERWIN HW & JM FARRANT (1998) Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regulation* 21: 203-210.

SHINTANI D & D DELLAPENNA (1998) Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science* 282: 2098-2100.

SHREVE F (1911) Studies on Jamaican Hymenophyllaceae. *Botanical Gazette* 51: 184-209.

SIEGEL D, BOLTON EM, BURR JA, LIEBLER DC & D ROSS (1997) The reduction of alphotocopherolquinone by human NAD(P)H: quinone oxidoreductase: the role of alphotocopherolhydroquinone as a cellular antioxidant. *Molecular Pharmacology* 52: 300-305.

SMIRNOFF N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and dessication. *New Phytologist* 125: 27-58.

SOLECKA D (1997) Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 257-268.

SPYCHALLA PJ & Y DESBOROUGH (1990) Superoxide dismutase, catalase, and -tocopherol content of stored potato tubers. *Plant Physiology* 94: 1214-1218

SROKA Z & W CISOWSKI (2003) Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 41: 753-758.

STRATIL P, KLEJDUS B & V KUBÁN (2006) Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of agricultural and food chemistry* 54: 607-616.

STRZALKA K, SZYMANSKA R, WIE EWSKA E, SKORUPI SKA-TUDEK K & M SUWALSKY (2009) Tocochromanols, plastoquinone and polyprenols in selected plant species from Chilean Patagonia. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51: 39-44.

STRZALKA K, SZYMANSKA R & M SUWALSKY (2011) Prenyllipids and pigments content in selected antarctic lichens and mosses. *Journal of the Chilean Chemical Society* 56: 808-811.

SZYMANSKA R & J KRUK (2010a) Identification of hydroxy-plastochromanol in *Arabidopsis* leaves. *Acta Biochimica Polonica* 57: 105-108.

SZYMANSKA R & J KRUK (2010b) Plastoquinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase. *Plant and Cell Physiology* 51:537-545.

TANAKA R, OSTER U, KRUSE E, RUDIGER W & B GRIMM (1999) Reduced activity of geranylgeranyl reductase leads to loss of chlorophyll and tocopherol and to partially geranylgeranylated chlorophyll in transgenic tobacco plants expressing antisense RNA for geranylgeranyl reductase. *Plant Physiology* 120: 695-704.

THORDAL-CHRISTENSEN H, ZHANG Z, WEI Y & DB COLLINGE (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11: 1187-1194.

TIJSKENS LMM, OTMA EC & O VAN KOOTEN (1994) Photosystem II quantum yield as a measure of radical scavengers in chilling injury in cucumber fruits and bell peppers. A static, dynamic and statistical model. *Planta* 194: 478-486.

TORRES AM, MAU-LASTOVICKA T & R REZAAIYAN (1987) Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 921-925.

TOUCHETTE BW, IANNACONE LR, TURNER GE & AR FRANK (2007) Drought tolerance versus drought avoidance: A comparison of plant-water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands* 27: 656-667.

TRYON RM & AF TRYON (1982) Fern and allied plants, with special reference to tropical America. Springer-Verlag, New York. 857 pp.

VAN LEERDAM A, ZAGT RJ & EJ VENEKLAAS (1990) The distribution of epiphyte growth-forms in the canopy of a Colombian cloud-forest. *Vegetation* 87: 59-71.

VELASCO L & FD GOFFMAN (2000) Tocopherol, plastochromanol and fatty acids

patterns in the genus *Linum*. Plant Systematics and Evolution 221: 77-88.

VELJOVIC-JOVANOVIC S, KUKAVICA B & F NAVARI-IZZO (2008) Characterization of polyphenol oxidase changes induced by desiccation of *Ramonda serbica* leaves. Physiologia Plantarum 132: 407-416.

VELLOSILLO T, VICENTE J, KULASEKARAN S, HAMBERG M & C CASTRESANA (2010) Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. Plant Physiology 154: 444-448.

VENISSE JS, GULLNER G & MN BRISSET (2004) Evidence for the Involvement of an Oxidative Stress in the Initiation of Infection of Pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125: 2164-2172.

VERMERRIS W & R NICHOLSON (2008) Phenolic Compound Biochemistry. Springer; Dordrecht, The Netherlands.

VERSTRAETEN S, KEEN CL, SCHMITZ HH, FRAGA CG & P OTEIZA (2003) Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. Free Radical Biology & Medicine 34: 84-92.

VIDI PA, KANWISCHER M, BAGINSKY S, AUSTIN JR, CSUCS G, DORMANN P, KESSLER F & C BREHELIN (2006) Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. Journal of Biological Chemistry 281: 11225-11234.

VRANOVA E, INZÉ D & F VAN BREUSEGEM (2002) Signal transduction during oxidative stress. Journal of Experimental Botany 53: 1227-1236.

WANG X & PJ QUINN (1999) Vitamin E and its function in membranes. Progress in Lipid Research 38: 309-336.

WITTLE KJ, DUNPHY PJ & JF PENNOCK (1965) Plastochromanol in the leaves of *Hevea brasiliensis*. Biochemistry Journal 96: 17c.

YOBI A, WONE BWM, XU W, ALEXANDER DC, GUO L, RYALS JA, OLIVER M & JC CUSHMAN (2013). Metabolic profiling in *Selaginella lepidophylla* at various hydration states provides new insights into the mechanistic basis of desiccation tolerance. *Molecular Plant* 6: 369-385.

YUAN S, LIU WJ, ZHANG NH, WANG MB, LIANG HG & HH LIN (2005) Effects of water stress on major photosystem II gene expression and protein metabolism in barley leaves. *Physiologia Plantarum* 125: 464-473.

ZBIERZAK AM, KANWISCHER M, WILLE C, VIDI PA, GIAVALISCO P, LOHMANN A, BRIESEN I, PORFIROVA S, BRÉHÉLIN C, KESSLER F & P DÖRMANN (2010) Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobuli. *Biochemical Journal* 425: 389-399.

ZHANG S, WENG J, PAN J, TU T, YAO S & CH XU (2003) Study on the photogeneration of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynthesis Research* 75: 41-48.

ZHAO S & E BLUMWALD (1998) Changes in oxidation-reduction state and antioxidant enzymes in the roots of jack pine seedlings during cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 104:134-142.

ZBIERZAK AM, KANWISCHER M, WILLIE C, VIDI PA, GIAVALISCO P, LOHMAN A, BRIESEN I, PORFIROVA S, BRÉHÉLIN C, KESSLER F & P DÖRMAN (2010) Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochemical Journal* 425: 389-399.

ZIVKOVIC S, POPOVIC M, DRAGISIC-MAKSIMOVIC J, MOMCILOVIC I & D GRUBISIC (2010) Dehydration-related changes of peroxidase and polyphenol oxidase activity in fronds of the resurrection fern *Asplenium ceterach* L. *Archives of Biological Science Belgrade* 62: 1071-1081.

ZOTZ G & M BUCHE (2000) The epiphytic filmy ferns of a tropical lowland forest-species occurrence and habitat preferences. *Ecotropica* 6: 203-206.

