TESIS DEFENDIDA POR **María Florencia Colombo Pallotta** Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dr. Ernesto García Mendoza

Co-Director de tesis

Dra. Lydia Betty Ladah Co-Director de tesis

Dra. Maria Tereza Cavazos Pérez

Miembro del Comité

Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte *Miembro del Comité*

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera

Coordinador del programa de posgrado en Ecología Marina *Dr. Edgar Gerardo Pavía López* Director de Estudios de Posgrado

30 de noviembre de 2006

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MARINA

FOTOSÍNTESIS Y FOTOPROTECCIÓN EN *Macrocystis pyrifera* EN LA ESCALA ESPACIAL Y TEMPORAL

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

MARÍA FLORENCIA COLOMBO PALLOTTA

Ensenada, Baja California, México, noviembre del 2006.

RESUMEN de la tesis de MARÍA FLORENCIA COLOMBO PALLOTTA, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México, Noviembre 2006.

FOTOSÍNTESIS Y FOTOPROTECCIÓN DE *Macrocystis pyrifera* EN LA ESCALA ESPACIAL Y TEMPORAL

Dr. Ernesto García Mendoza

Dra. Lydia Betty Ladah

Co-Director de tesis

Co-Director de tesis

Macrocystis pyrifera es una macroalga que ocupa toda la columna de agua desde profundidades de 30 metros. Presenta tejido fotosintético a lo largo de todo el organismo por lo que sus hojas están expuestas a un amplio rango de factores ambientales, especialmente en relación a la cantidad y calidad de luz. Estas condiciones convierten a esta especie en un modelo único para el estudio de la expresión diferencial de los mecanismos de fotoaclimatación y fotoprotección. El objetivo de esta tesis fue caracterizar la respuesta fisiológica indiuvidual ante diferentes condiciones ambientales con el fin de comprender la regulación de la actividad fotosintética en la escala espacial y temporal en organismos adultos de Macrocystis pyrifera La respuesta más importante en función de la profundidad fue la gran capacidad fotoprotectora en las hojas de la superficie, en donde además se detectó la mayor acumulación de compuestos que absorben luz ultravioleta, carotenoides fotoprotectores, pigmentos del ciclo de las xantofilas y capacidad de disipación térmica. Estas características le permiten a estas hojas presentar las mayores tasas fotosintéticas y de transporte de electrones y generar la mayor contribución a la producción de fotosintetato. Las hojas basales mostraron el patrón opuesto pero podrían ser importantes para otras funciones como la absorción de nutrientes. Al comparar la fisiología de estos organismos durante primavera y verano no se detectaron cambios en la composición elemental, concentración de pigmentos constitutivos y accesorios, en las tasa de transportes de electrones o en la eficiencia cuántica operativa del fotosistema II. Sin embrago, su capacidad fotosintética y fotoprotectora se vieron reducidas un 30-40% durante el verano, lo cual sugiere que el "síndrome de verano" podría estar relacionado con una reducción en la capacidad fotoprotectora y posiblemente con una limitación en las reacciones de la etapa oscura de la fotosíntesis. Debido a los altos valores de disipación térmica encontrados en esta especie se caracterizó el mecanismo de control de NPQ, encontrándose que a diferencia del modelo propuesto para plantas superiores, el gradiente de protones no induce por sí mismo el NPQ y por lo tanto depende principalmente de la síntesis de zeaxantina. Por lo tanto, M. pyrifera puede expresar respuestas aclimatativas diferenciales según la posición del tejido fotosintético en la columna de agua. Esta capacidad les permite ser organismos ecológicamente exitosos en ambientes altamente variables.

Palabras clave: Macrocystis pyrifera, Fotoprotección, Fotosíntesis, NPQ.

ABSTRACT of the thesis presented by **María Florencia Colombo Pallotta** as a partial requirement to obtain the DOCTOR OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. November 2006.

PHOTOSYNTHESIS AND PHOTOPROTECTION OF *Macrocystis pyrifera* IN SPATIAL AND TEMPORAL SCALES

Macrocystis pyrifera is a canopy-forming species that occupies the entire water column. The photosynthetic tissue of this alga is exposed to a broad range of environmental factors, particularly related to light quantity and quality. These characteristics make this species a unique model for the study of the differential expression of the photosynthesis and photoprotection mechanisms. The objective of this thesis was to characterize the individual physiology responses at different environmental conditions with the purpose of understanding the regulation of the photosynthetic activity in adult organisms of *Macrocystis pyrifera*. The most important response was the high photoprotective capacity in surface blades, which also had the highest accumulation of UV absorbing compounds, photoprotective carotenoids, xanthophylls pigments pool and NPQ. These characteristics were important responses that allow surface blades to present the highest maximum photosynthesis and the highest photosystem II electron transport rate. Therefore, surface blades made the highest contribution to algae production. In contrast, basal blades presented the opposite trend but they might be important for other functions, like nutrient uptake. When comparing the physiology of these organisms during spring and summer, no changes were found in constitutive or accessory pigment composition, electron transports rates or in the operative quantum yield of photosystem II. Nevertheless photosynthetic and photoprotective capacity was reduced 30-40% during the summer, which suggests the "summer syndrome" could be related to a reduction in the photoprotective capacity and possibly to a limitation in the dark reactions. Due to the high values of thermal dissipation found in this species, the control mechanism of NPQ induction was characterized, being that unlike the model proposed for higher plants, the proton gradient alone does not induce the NPQ and therefore it depends mainly on the zeaxanthin synthesis. Therefore, M. pyrifera can differentially express acclimation responses according to the position of the photosynthetic tissue on the water column. This capacity allows this species to become ecologically successful organisms in a highly variable environment.

Key words: *Macrocystis pyrifera*, photoprotection, photosynthesis, NPQ.

"El reto es trazarse metas los suficientemente grandes como para no perderlas de vista en el camino"

A mi madre, con cariño y gratitud.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi comité de tesis por su apoyo. Al Dr. Ernesto García-Mendoza por su dedicación y ayuda tanto en la fase experimental como de escritura de la tesis y de los artículos científicos derivados de este trabajo. A la Dra. Lydia Ladah por la beca y el financiamiento económico (proyecto CONACyT J37689-V), y al Dr. Eugenio Carpizo y a la Dra. Tereza Cavazos por sus buenos consejos, su apoyo y su tiempo.

Al Posgrado de Ecología Marina del CICESE por la beca terminal, y a los investigadores que contribuyeron en mi formación académica y personal, especialmente a la Dra. Sharon Herzka, al Dr. Juan Carlos Herguera, al Dr. Oscar Sosa y al M.C. Vicente Ferreira.

A los investigadores que me permitieron hacer uso de sus laboratorios. Al Dr. Jorge de la Roza Vélez, por abrirme la puerta del laboratorio de Ecología Molecular de la UABC para desarrollar algunas ideas moleculares y por las valiosas discusiones metodológicas y técnicas. Al Dr. Axayacatl Rocha Olivares por el uso de los termocicladores del laboratorio de Ecología Molecular del CICESE, y al Dr. Helmut Maske por el uso del espectrofotómetro del laboratorio de Ecología de Microbios Marinos del CICESE y sus valiosos comentarios y sugerencias en seminarios y manuscritos.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Algal: futuros doctores Nadine Schubert y Antonio Almazán y a los del laboratorio de Oceanografía Satelital José Luis Peña y Jushiro Cepeda por sus valiosas criticas y ayuda a lo largo del camino.

A Jonathan Sandoval por su ayuda y compañía en los buceos, en el laboratorio y en todo momento. Cada uno de los teatritos guiñol fueron dedicados a vos! Y a ver si algún día te das cuenta de que mis alguitas son más chidas que tus tiburoncitos...jajaja.

A mis amigos de siempre: Lourdes Blandini, Andrea Devis, Unai Markaida, Linda Palomino y Lilliana Vázquez, por haber estado conmigo, aún en la distancia, en las buenas y en las malas. Y los amigos de ahora: Silvia Cachón, Vanesa Francisco, Miguel Tenreiro, Paula García, Sarita Frontana, Rodrigo Beas, Alicia Abadía, Iris Segura y Edgar Escalante.

A mis padres por la formación, el cariño y los buenos consejos, y a mi Tía Guadalupe por ser el ejemplo de rectitud, tenacidad y lucha en la vida.

A mi segunda familia, el clan Selva-Hubsher, por el amor que me han brindado siempre.

A mis ahijadas Alma y Eva, y a mis sobrinas Catalina y Margarita, porque cada una de sus sonrisas fueron parte de la inspiración para lograr llegar a la meta.

Y a todos los que de una u otra forma me acompañaron en esta etapa de la vida.

GRACIAS TOTALES!

CONTENIDO

I. CAPÍTULO 1. Introducción general: fisiología fotosintética de	
Macrocystis pyrifera en relación a su ambiente	
I. 1. Introducción	
I. 2. Generalidades sobre el proceso fotosintético	
I. 3. Fotoinhibición y fotoprotección	1
I. 4. Ecología de Macrocystis pyrifera	1
I. 5. Variabilidad ambiental dentro de un manto de M. pyrifera	1
I. 6. Deterioro de verano	2
I.7. Planteamiento del problema	2
I. 7.1 Objetivo	2
I. 7.2 Hipótesis general	2
I. 7.3 Hipótesis particulares	2
II. CAPÍTULO 2. Regulación diferencial de los mecanismos de fotosíntesis	
y fotoprotección de <i>Macrocystis pyrifera</i> en la escala espacial	2
II. 1. Resumen	2
II. 2. Introducción	2
II. 3. Materiales y Métodos	2
II 4. Resultados.	3
II 5. Discusión	5
II 6. Conclusión	e
III. CAPÍTULO 3. Fisiología de Macrocystis pyrifera en verano: Fotosín-	
tesis y fotoprotección	6
III. 1. Resumen	6
III. 2. Introducción	6
III. 3. Materiales y Métodos	6
III. 4. Resultados	7
III. 5. Discusión	8
III. 6. Conclusión	9
IV. CAPÍTULO 4. Caracterización del mecanismo que controla la	
disipación no fotoquímica en <i>Macrocystis pyrifera</i>	Ģ
IV. 1. Resumen	ć
IV 2 Introducción	ć
IV 3 Materiales v Métodos	c
1	,

CONTENIDO (continuación)

IV. 4. Resultados	
IV. 5. Discusión	
IV. 6. Conclusión	
V. CAPÍTULO 5. Discusión general	
V. 1. Hipótesis de diferenciación de funciones en Macrocystis pyrifera	
V.1.1. Transportadores de nutrientes	
V.1.2. Componentes estructurales del aparato fotosintético	
V.1.3. Enzimas de la etapa oscura	
V. 2. Posibles causas de la disminución de la capacidad fotoprotectora en	
Verano	
V. 3. Conclusiones Generales	

VI. BIBLIUGKAFIA	VI. BIBLIOGRAFÍA	135
------------------	------------------	-----

Anexo 1: Expressión y actividad de NR en M. pyrifera	148
--	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema Z de la transferencia lineal de electrones durante la etapa clara de la fotosíntesis.	6
2	Curva P-E idealizada para una especie adaptada a sol y para una especie adaptada a sombra	8
3	Representación esquemática de la conversión de los pigmentos involucrados en ciclo de las xantofilas, según haya alta o baja luz	12
4	Representación de un organismo adulto de 1-2 años de edad de <i>Macrocystis pyrifera</i> donde se muestran las distintas partes que conforman un organismo	15
5	Temperatura superficial del mar (SST) e índice de surgencias (PFEL upwelling) para la localidad de Campo Kennedy, Baja California, México	19
6	Descriptores de biomasa para hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante los dos muestreos en primavera. A) peso húmedo y peso seco [.] 10. B) Carbono elemental como % de peso seco. C) Nitrógeno elemental como % de peso seco.	38
7	Relación carbono/nitrógeno (C:N) para hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante los dos muestreos de primavera	39
8	Absorbancia espectral relativa (normalizada por la absorbancia a 675 nm) de hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante los dos muestreos de primavera	41

Figura

9	Absorción de luz en <i>M. pyrifera</i> . A) Absorción relativa a 310 nm (Abs _{310nm}) de hojas colectadas a diferentes profundidades. La línea continua representa el ajuste al modelo de decaimiento exponencial ($\mathbf{R}^2 = 0.98$). B) Relación entre la absortancia promedio en la región PAR y el contenido de Chl <i>a</i> . C) Relacion entre el coeficiente especifico de absorción y el contenido de Chl <i>a</i> .	42
10	Tasa fotosintética (P-E) y tasa de transporte de electrones para hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades. A) Curvas P-E a distintas irradiancias. B) Curvas ETR-E a distintas irradiancias	48
11	Máxima eficiencia quántica operativa del PSII medido como la relación entre la fluorescencia basal y la variable (F_v/F_m) en hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante dos muestreos de primavera	50
12	Relación entre ETR y evolución de oxígeno para irradiancias menores a 500 μ mol fotones•m ⁻² •s ⁻¹ . La línea representa el ajuste a una regresión lineal (R ² =0.91)	51
13	Disipación no fotoquímica de la fluoresencia de la clorofila <i>a</i> (NPQ) en hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante primavera del 2005	52
14	Estado nutricional de discos de tejido de <i>Macocystis pyrifera</i> de hojas colectadas a diferentes profundidades. A) Contenido de carbono (%C); B) Contenido de Nitrógeno (%N) como % de peso seco en primavera (símbolo cerrado) y verano (símbolo abierto) del 2005.	73
15	Absorbancia espectral relativa (normalizada a la absorbancia a 675 nm) de hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas en primavera y en verano	74

Figura

16	Descriptores de absorción de luz en <i>Macrocystis pyrifera</i> en primavera y verano	76
17	Concentración de pigmentos constitutivos en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades en primavera 2005 y en verano 2005. A) Concentración de clorofila a . B) Concentración de β -caroteno	77
18	Concentración de pigmentos accesorios en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades en primavera 2005 y en verano 2005. A) Concentración de clorofila <i>c</i> . B) Concentración de fucoxantina	79
19	Concentración de pigmentos fotoprotectores y DPS en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades en primavera 2005 y en verano 2005. A) Pigmentos del ciclo de las xantofilas normalizados por la concentración de clorofila <i>a</i> . B) Estado de de-epoxidación.	80
20	Curvas P-E de hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades. A) Primavera 2005; B) Verano 2005	83
21	Curvas ETR-E de hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades. A) Primavera 2005; B) Verano 2005	84
22	Máxima eficiencia cuántica operativa del PSII medida como F_v/F_m en primavera y en verano	85

Figura

23	Relación entre ETR y evolución de oxígeno para irradiancias menores a 500 μ moles fotones•m ⁻² •s ⁻¹ en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades en primavera y en verano.	86
24	Inducción de NPQ en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades. A) Primavera 2005. B) Verano 2005.	87
25	Concentración de proteínas totales en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante primavera y durante verano	91
26	Análisis de disipación de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades A) Muestra colectada en superficie. B) Muestra colectada a 6 m de profundidad. C) Muestra colectada a 18m de profundidad.	106
27	Relación entre NPQ y la concentración de Zea en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante el periodo de alta luz en experimentos realizados con muestras colectadas en primavera y verano	109
28	Efecto del DTT en la capacidad de realizar NPQ en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades durante el verano. A) Tratamiento control. B) tratamiento con DTT	111
29	Efecto del desacoplador NH ₄ Cl en la capacidad de realizar NPQ en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades. A) Hojas de superficie. B) Hojas de 6 m C) Hojas de 18m	112

Figura

 31 Epoxidación de la Zea en oscuridad luego de exponer las hojas de <i>M. pyrifera</i> de superficie durante 20 minutos a alta luz	30	A): Efecto de la adición de NH ₄ Cl antes de iniciar el periodo de alta luz en la capacidad de realizar NPQ en hojas superficiales de <i>Macrocystis pyrifera</i> . B) Efecto del doble tratamiento de discos de tejido aclimatados durante 1 hora a DTT y que adicionalmente recibieron NH ₄ Cl a la mitad del tratamiento con alta luz.	114
 Recuperación de la máxima eficiencia quántica operativa del PSII luego del estrés con alta luz para muestras control y para las muestras tratadas con DTT. A) Muestras de superficie. B) Muestras de 6 m. C) Muestras de 18 m	31	Epoxidación de la Zea en oscuridad luego de exponer las hojas de <i>M. pyrifera</i> de superficie durante 20 minutos a alta luz	115
 Regulación hipotética de los genes que codifican para los transportadores y reductores de nutrientes (T y R), para los componentes estructurales del aparato fotosintético (PSU, Chl c y Fuco) y para las enzimas de la etapa oscura en <i>Macrocystis pyrifera</i>	32	Recuperación de la máxima eficiencia quántica operativa del PSII luego del estrés con alta luz para muestras control y para las muestras tratadas con DTT. A) Muestras de superficie. B) Muestras de 6 m. C) Muestras de 18 m	117
pyrifera	33	Regulación hipotética de los genes que codifican para los transportadores y reductores de nutrientes (T y R), para los componentes estructurales del aparato fotosintético (PSU, Chl c y Fuco) y para las enzimas de la etapa oscura en <i>Macrocystis</i>	
		pyrifera	126

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Concentración pigmentaria, razones molares de clorofila <i>c</i> y fucoxantina a clorofila <i>a</i> y DPS en hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades	44
Π	Parámetros fotosintéticos de las hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades normalizados en base a área. La respiración (R) se midió en oscuridad antes de exponer las muestras a la luz. P _{max} es la tasa máxima fotosintética, α es la pendiente inicial de la relación Fotosíntesis vs. Irradiancia, E ₀ es la irradiancia de compensación y E _K es la irradiancia de saturación.	46
III	Parámetros obtenidos de las curves de transporte de electrones en hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades y calculadas como se describe en materiales y métodos	47
IV	Estimación de la máxima productividad por estrato, asumiendo un K_d = 0.3 y una dosis de irradiancia de 50 E m ⁻² dia ⁻¹ en superficie durante primavera	59
V	Características pigmentarias en relación a la fotoprotección en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades.	108

LISTA DE ABREVIATURAS

α: eficiencia fotosintética

 α ETR: eficiencia en el transporte de electrones

AC: Anhidrasa carbónica

ANOVA: Análisis de varianza

Ant: Anteraxantina

ATP: adenosin-tri-fosfato

β-caro: β- caroteno

βETR: parámetro relacionado con la disminución en la tasa de transporte de electrones

Chl *a*: clorofila *a*

Chl c: clorofila c

Curvas ETR-E: curvas que describen la tasa de transporte de electrones a diferentes irradiancias

Curvas P-E: curvas que describen la tasa de fotosíntesis a diferentes irradiancias

DPS: estado de de-epoxidacion de ΣXC

DTT: dithiothreitol

E_k: irradiancia de saturación

ETR_{max}: tasa máxima de transporte de electrones

Fuco: fucoxantina

F_v/F_m: máxima eficiencia cuántica operativa del PSII

NH₄Cl: cloruro de amonio

NPQ: disipación no fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila a

Pmax: fotosíntesis máxima

PSI: Fotosistema I

PSII Fotosistema II

PSU: unidad fotosintética

R: tasa de respiración en oscuridad

RC: centro de reacción del PSI o PSII

Rubisco: ribulosa 1,5 bi-fosfato carboxilasa

VDE: Violaxantina de-epoxidasa

Vio: violaxantina

XC: ciclo de las xantofilas

Zea: zeaxantina

 ΔpH : gradiente de protones

 ΣXC / Chl *a*: grupo de pigmentos del ciclo de las xantofilas normalizados por la concentración de clorofila *a*

 Σ XC: grupo de pigmentos del ciclo de las xantofilas (Vio, Ant y Zea)

Capítulo 1

Introducción general: fisiología fotosintética de *Macrocystis pyrifera* en relación a su ambiente.

I.1. Introducción

Macrocystis pyrifera es la macroalga dominante en las costas rocosas del sistema de la Corriente de California (North 1971a) y es la base para mantener uno de los ecosistemas marinos más productivos (Valiela 1995). Esta especie ocupa toda la columna de agua, desde profundidades de 30 metros hasta la superficie, formando densas agregaciones conocidas como bosques o mantos de sargazo gigante, las cuales sirven de hábitat, refugio y alimento a un gran número de vertebrados e invertebrados marinos. Su tejido fotosintético se presenta a lo largo de todo el organismo y por lo tanto, a través de un gradiente de irradiancia, temperatura y concentración de nutrientes ya que estos parámetros varían en función de la profundidad (Jackson 1977, Dean 1985, Clark et al. 2004). Si bien existe información sobre la variación en las características fotosintéticas de macroalgas aclimatadas a un régimen particular de luz (Silva et al. 1998, Rodrigues et al. 2000, 2002, Gevaert et al. 2002, Carr y Björk 2003) poco se conoce sobre la plasticidad de la fisiología fotosintética de organismos que están expuestos a un gradiente tan amplio de condiciones ambientales. Por lo tanto, Macrocystis pyrifera es un modelo interesante para este estudio debido no sólo a que se desarrolla en un ambiente altamente dinámico, sino que además presenta las mayores tasas de crecimiento de las especies algales conocidas (Gerard 1982). La hipótesis general sobre la que se desarrolla este trabajo es que esta especie tiene una gran plasticidad ya que necesita expresar diferencialmente mecanismos de fotoaclimatación y fotoprotección de acuerdo a la posición de su tejido fotosintético en la columna de agua. Así mismo estos organismos deben mostrar cierta plasticidad fisiológica a lo largo del año en respuesta a los cambios ambientales estacionales y especialmente durante el verano que es cuando se presentan las condiciones ambientales más estresantes y los organismos se deterioran (Gerard 1984, North y Zimmerman 1984). El objetivo de esta tesis es caracterizar la respuesta fisiológica individual ante diferentes condiciones de aclimatación ambiental con el fin de comprender la regulación de la actividad fotosintética en la escala espacial y temporal en organismos adultos de Macrocystis pyrifera. La metodología consistió en la medición de algunas variables fisiológicas durante primavera y verano del 2005 en una población del norte de Baja California. Debido a los altos valores de disipación térmica medidos como disipación no fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila a (Non Photochemical Quenching -NPQ) encontrados en los estratos superficiales y a la falta de información sobre el mecanismo que permite la formación de NPQ en macroalgas se realizó un análisis comparativo en hojas de diferentes profundidades para comprender el mecanismo que permite la formación de NPQ. La información generada en este trabajo permite comprender cómo se regula la actividad fotosintética en espacio y tiempo en Macrocystis pyrifera y plantear algunas hipótesis sobre la posible diferenciación de funciones de su tejido fotosintético, la posible causa fisiológica del deterioro de verano así como el mecanismo que controla la formación de NPQ en esta especie.

I.2. Generalidades sobre el proceso fotosintético*

La fotosíntesis es el proceso biológico mediante el cual plantas, algas y bacterias fotosintéticas utilizan la energía solar para sintetizar compuestos orgánicos. En los organismos fotosintéticos eucariotas, los organelos en donde se realiza la fotosíntesis se denominan cloroplastos. Dentro de éstos, existe un extenso sistema de membranas lipoprotéicas denominadas tilacoides y asociadas a ellas los complejos proteico-pigmentarios involucrados en la captura de la luz y los proceso de transferencia de la energía de excitación. Los elementos básicos necesarios para la fotosíntesis oxigénica son la luz, el carbono inorgánico y el agua, los cuales generan moléculas orgánicas según:

$CO_2 + 2H_2O + energía luminosa \rightarrow [CH_2O] + O_2 + H_2O$

Aunque parece una reacción simple, el proceso fotosintético involucra a un gran número de moléculas que cumplen funciones específicas en las diferentes etapas del proceso conocidas como etapa clara y etapa oscura. La etapa clara involucra: (1) la absorción de la luz y la distribución de la energía mediante los sistemas de antenas; (2) la transferencia primaria de electrones en los centros de reacción; (3) la estabilización de la energía por procesos secundarios. La etapa oscura incluye la secuencia de reacciones mediante las cuales el potencial químico generado en la etapa clara (ATP y NADPH) se usa para fijar y reducir el carbono inorgánico.

^{*} Esta sección es una recopilación de información obtenida de libros que tratan sobre el proceso fotosintético como: Green y Parson 2003, Blankenship 2002, Rai y Gaur 2001, Falkowski y Raven 1997, Baker 1996.

El primer paso del proceso fotosintético consiste en la absorción de luz por medio de alguno de los pigmentos asociados con el aparato fotosintético. La absorción de un fotón crea un estado excitado que eventualmente permite que se realice la separación de cargas en el centro de reacción, donde se realiza la fotoquímica. Este proceso involucra la migración de estados excitados de una molécula a otra. Los pigmentos ubicados en la parte periférica de los complejos colectores de luz absorben a longitudes de onda más corta, y por lo tanto más energéticas que los que están en el centro. A medida que se realiza la transferencia de energía, la energía de excitación se mueve desde los pigmentos más energéticos a los menos energéticos, y al mismo tiempo hacia el centro de reacción. Los sistemas de antena incrementan la probabilidad de absorber energía al aumentar la sección transversal de absorción. Bajo muchas circunstancias esto es una ventaja ya que la luz es una fuente de energía relativamente diluida. Pero si la cantidad de energía absorbida es mayor a la energía utilizable pueden producirse importantes daños celulares. Por lo tanto, los sistemas de antena están sujetos a importantes mecanismos de regulación, reparación y protección.

La transformación de la energía de los estados excitados a cambios químicos en las moléculas se realiza en los centros de reacción, que son complejos multiprotéicos embebidos en la membrana tilacoide. Allí, una clorofila (P680) es llevada a un estado electrónico excitado, tanto sea por absorción directa de un fotón, o más comúnmente mediante transferencia de energía por resonancia desde los sistemas pigmentarios. El pigmento en estado excitado es un agente altamente reductor, el cual rápidamente dona un electrón a una molécula aceptora, formando el par P680⁺Pheo⁻. Esta es la reacción primaria de la fotosíntesis, ya que la energía ha sido transformada de excitación electrónica a

potencial redox. Si el electrón es simplemente transferido de Pheo⁻ a P680⁺ el resultado neto es que la energía se convierte en calor y se pierde. Para evitar estos eventos existe una serie de rápidas reacciones secundarias que separan espacialmente las cargas positivas y negativas, lo cual reduce en varios órdenes de magnitud la posibilidad de recombinación.

El esquema integrado de la etapa clara de la fotosíntesis se presenta en la Figura 1, tomando en cuenta sólo la ruta lineal de transferencia de electrones, también conocido como diagrama Z. La fotosíntesis comienza con la excitación de 2 moléculas de clorofila, P680 en el fotosistema II (PSII) y P700 en el fotosistema I (PSI). La separación de cargas dá como resultado la oxidación de P680 y P700. El potencial redox generado permite oxidar una molécula de H₂O en el PSII, generando 1/2O₂, 2H⁺ y 2e⁻. Estos electrones son transferidos del P680⁺ a la feofitina (Pheo). Las reacciones posteriores previenen la recombinación ya que cuando QA es reducida por la Pheo la energía puede usarse para realizar fotoquímica. Posteriormente el electrón de QA^T es transferido a QB, otra quinona. Cuando QB recibe 2 electrones se convierte en parte del pool de plastoquinonas (PQH2). Este pool es posteriormente oxidado por el complejo del citocromo b_6f . La molécula mediadora entre el citocormo $b_6 f y$ el PSI es la plastocianina (PC), que dona un electrón a la forma oxidada del P700, presente luego de que la luz provoca la separación de cargas en el PSI. El producto final del transporte de electrones por el PSI es la reducción de la ferrodoxina (Fd), que dependiendo de las necesidades celulares puede ser usado para la reducción de NADP⁺ vía la ferrodoxina-NADP⁺ reductasa o para la reducción de nitrato por la nitrato reductasa. La generación de adenosin-tri-fosfato (ATP) se produce mediante el bombeo de H⁺ acumulados desde el lumen hacia el estroma del tilacoide mediante la ATP sintetasa.



Figura 1: Esquema Z de la transferencia lineal de electrones durante la etapa clara de la fotosíntesis en los organismos fotótrofos oxigénicos eucariotas. El diagrama superior muestra el esquema energético, mientras que el inferior muestra la interacción con los diferentes complejos protéicos involucrados en el proceso.

La regulación de estos procesos es compleja y generalmente involucra 3 vías: la velocidad de las reacciones (las cuales dependen del pH, de la concentración de producto y de la concentración de sustrato), la presencia o ausencia de enzimas reguladoras o cofactores, y el control genético de la velocidad de síntesis de dichas enzimas. Esta regulación determina el grado de flexibilidad que posee la maquinaria fotosintética, lo cual genera que algunos organismos puedan vivir en un gradiente lumínico amplio mientras que otros estén restringidos a vivir exclusivamente en ambientes de alta o baja luz.

De acuerdo a lo anterior, las plantas y algas pueden ser clasificadas en dos categorías de acuerdo a la cantidad de luz necesaria para saturar su aparato fotosintético (Salisbury y Ross 1969). El aparato fotosintético de las especies adaptadas a sol se satura a irradiancias una quinta parte o más de la luz solar directa mientras que en las especies adaptadas a sombra se satura a intensidades equivalentes a una décima parte o menos de la luz solar directa. Estos organismos presentan diferencias tanto en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (Eichelmann et al. 2005), las cuales se reflejan en las curvas fotosíntesis vs. irradiancia (curva P-E; Figura 2). La eficiencia fotosintética (α) medida como la pendiente inicial de la curva P-E es mayor en especies adaptadas a sombra, aunque la tasa máxima de fotosíntesis (P_{max}) es mayor en las especies adaptadas a sol. Debido a lo anterior, la irradiancia de saturación (E_k) es mayor en la especie adaptada a sol (Ting 1982). Otras características de las especies adaptadas a sol son cambios en la estequiometría de los fotosistemas (mayor número de PSI en comparación con PSII), menor concentración de pigmentos asociados a los centros de reacción, mayor punto de

compensación de CO₂ y la expresión de eficientes mecanismos fotoprotectores (Ting 1982, Fujita et al. 2001).



Figura 2: Curva P-E idealizada para una especie adaptada a sol (línea punteada- subíndices 1) y una especie adaptada a sombra (línea continua- subíndices 2). La línea gruesa representa la pendiente inicial (α), que es mayor en la especie adaptada a sombra, mientras que su P_{max} y su E_k son menores.

Los procesos que le permiten a la célula sentir la cantidad de luz que llega a su aparato fotosintético y que están involucrados en la regulación de su maquinaria fotosintética son al menos tres: 1) el proceso mediante el cual se monitorea el régimen de luz, el cual se monitorea indirectamente por el estado redox del sistema de transporte de electrones; 2) el proceso de transducción de señales, que en muchos casos se ha demostrado que es del tipo fosforilación-de fosforilación; 3) el proceso de regulación de la trascripción, traducción o actividad de ciertas proteínas mediante factores *cis-acting*, *trans-acting* o cofactores (Fujita et al. 2001). Estos mecanismos les permiten a los organismos tener cierta flexibilidad en la etapa clara del proceso fotosintético.

Dentro de la etapa oscura la limitación generalmente está relacionada con la disponibilidad de carbono inorgánico, que depende de la actividad de las enzimas anhidrasa carbónica (AC) Rubisco y Rubisco activasa. La limitación por carbono inorgánico disminuye las tasas de fotosíntesis y de crecimiento, mientras que provoca sobreexcitación del aparato fotosintético. En algas existen principalmente dos mecanismos para evitarla: 1) mejorar la incorporación de carbono inorgánico (por ejemplo usar no sólo CO_2 sino otras fuentes de carbono inorgánico); 2) mejorar la eficiencia de los transportadores internos de carbono inorgánico como la AC (revisado en Axelsson y Beer 2001).

Otro factor que afecta la eficiencia del proceso fotosintético es la disponibilidad de nutrientes, ya que aunque la fijación de carbono es indispensable para la construcción de los esqueletos carbonados, para la formación de macromoléculas además se necesita la incorporación de otros macro y micro nutrientes. El nitrógeno es un elemento indispensable en macromoléculas estructurales y funcionales como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos. Dependiendo de la especie algal puede constituir entre el 1 y el 10% del peso seco del organismo, mientras que en macroalgas como *Laminariales y Fucales* generalmente constituye entre el 1 y el 6% del peso seco (Wheeler y North 1980). El efecto de la limitación por nitrógeno puede manifestarse en bajas tasas fotosintéticas junto con una considerable disminución en la concentración de clorofila *a* y un aumento de la concentración de carotenoides (Falkowski y Raven 1997).

La temperatura es otro factor clave dentro del proceso fotosintético por dos razones: 1) siendo la fotosíntesis un proceso enzimático, la velocidad de las reacciones va a depender de la temperatura; 2) el estado físico de la matriz lipídica de las biomembranas celulares depende de la temperatura. Por lo tanto, las reacciones químicas y físicas entre las proteínas unidas a membranas van a estar influenciadas por la temperatura, no sólo por la dependencia intrínseca de la reacción a la temperatura sino también por el estado físico de la membrana. Esto afecta tanto a las proteínas que intervienen en la etapa clara de la fotosíntesis (especialmente las de la cadena de transporte de electrones), a las de la etapa oscura de la fotosíntesis (especialmente a las del ciclo de Calvin) y a las proteínas involucradas en la asimilación de nutrientes. A su vez la temperatura afecta otros procesos físicos como la solubilidad de gases en el agua. A mayor temperatura menor disolución de gases como CO_2 lo que puede provocar una baja disponibilidad de este gas y llevar a limitación por carbono inorgánico. Por lo tanto, la temperatura es un factor que desencadena una serie de respuestas que directa o indirectamente afectan a la maquinaria fotosintética (revisado en Peschek y Zoder 2001).

I.3. Fotoinhibición y fotoprotección

La luz es un recurso necesario en el proceso fotosintético y la adquisición de este recurso ocurre de manera pasiva. La absorción de un exceso de luz provoca por un lado la acumulación de pigmentos en estados excitados, y por otro la acumulación de transportadores electrónicos reducidos como la plastoquinona, lo que dificulta la separación de cargas en el PSII y provoca que se incremente el tiempo de vida medio del centro de reacción excitado (Krause y Weis 1991). La permanencia de la excitación en el centro de reacción permite la formación de radicales altamente tóxicos, ya que este proceso necesita más tiempo en comparación con la separación de cargas. Estos radicales son potencialmente peligrosos para la célula ya que pueden degradar proteínas con la consecuente inactivación del transporte de electrones en el PSII (Aro et al. 1993, Fujita et al. 2001).

Evolutivamente, los organismos fotosintéticos han desarrollado mecanismos fotoprotectores para minimizar la degradación de proteínas del aparato fotosintético en presencia de alta luz. Algunos mecanismos fotoprotectores disminuyen la absorción de energía en el PSII mientras que otros favorecen la disipación de la energía ya absorbida. El ciclo de las xantofilas (XC) es un mecanismo para proteger al PSII de alta luz mediante la activación de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) vía acidificación del lumen de los tilacoides y la presencia de ascorbato. La VDE cataliza la conversión de los pigmentos carotenoides violaxantina (Vio) a zeaxantina (Zea) vía el intermediario anteraxantina (Ant; Figura 3). La Zea de manera directa o indirecta disipa el exceso de energía en las moléculas de clorofila *a* de los sistemas colectores de luz. Como es un ciclo, la Zea puede volver a convertirse en Ant mediante la activación de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZEP), siendo necesaria la presencia de oxígeno molecular y NADPH. Es importante destacar que la conversión de Vio a Zea es más rápida que la de Zea a Vio (ver la revisión de Pfündel y Bilger 1994).



Figura 3: Representación esquemática de la conversión de los pigmentos involucrados en ciclo de las xantofilas, según haya alta o baja luz.

La asociación entre el ciclo de las xantofilas y la fotoprotección se basa en la correlación que existe entre la disipación del exceso de energía en forma de calor en el PSII y la formación de Zea (Demmig Adams 1990). Una manera de medir esta disipación térmica es mediante la reducción de la fluorescencia del PSII, proceso que se conoce como disipación no fotoquímica de la fluorescencia (NPQ). Los procesos fisiológicos que forman parte del NPQ son complejos y heterogéneos. En general, estos procesos se agrupan en tres categorías: 1) "quenching" dependiente de la energía (q_E), regulado en gran medida por el

pH del lumen de los tilacoides; 2) "quenching" fotoinhibitorio (q_I) relacionado con la depresión de la tasa fotosintética a luz saturante; 3) estados de transición (q_T) que reducen la fluorescencia máxima mediante la excitación preferencial del PSII o PSI (Owens 1996).

Al menos en plantas, bajo condiciones normales de crecimiento se cree que q_E es el componente más importante del NPQ total (revisado en Horton y Ruban 2005) mientras que bajo condiciones severas de estrés (luz en exceso) q_I se vuelve el proceso dominante (Owens 1996). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos que controlan la inducción de NPQ, para plantas superiores se sabe que tanto el gradiente del pH (Δ pH), la concentración de Zea y la presencia de la subunidad PsbS juegan un papel importante (Gilmore 1997, Horton et al. 1996, Horton y Ruban 2005). El mecanismo propuesto más simple se basa en que la Zea tiene la capacidad de desactivar el estado de excitación de la clorofila a vía transferencia de energía singulete-singulete (Frank et al. 1994). Otro mecanismo se basa en la protonación de algunas de las subunidades del PSII, lo que promueve una alteración en la organización de la antena y provoca la disipación térmica (Horton et al. 1996). En macroalgas café no se conoce con exactitud el mecanismo que controla el NPQ total, pero la falta de evidencia bioquímica de la presencia de la subunidad PsbS (Müller et al. 2001) y la ausencia del mecanismo q_T (Owens y Wold 1986, Fork et al. 1991) permiten hipotetizar que el mecanismo podría ser diferente al propuesto para plantas superiores.

I.4. Ecología de Macrocystis pyrifera

Macrocystis pyrifera (L. Agardh) es la macroalga dominante en la zona submareal de las costas rocosas de la corriente de California (Dayton 1985). Se clasifica en la división *Heterokontophyta*; clase *Phaeophyceae*; orden *Laminariales*; familia *Lessoniaceae*; género *Macrocystis*; especie *Macrocystis pyrifera*. En el Hemisferio Norte se distribuye en las costas del Océano Pacifico desde Point Conception, U.S.A., hasta la zona de Bahía Asunción, México (North 1971a), zona de biotransición geográfica donde encuentra su límite sur de distribución en el Hemisferio Norte. Esta especie también se encuentra en la costa oeste de América del Sur (incluyendo las costas de la Patagonia Argentina y las Islas Malvinas) y en el sur de África y de Australia (North 1971a). Las características físicas más importantes que comparten estos sitios es que la temperatura del agua no suele superar los 20 °C y sus regimenes oceanográficos están caracterizados por presentar frecuentes eventos de surgencias costeras (North 1971a)

Morfológicamente en *M. pyrifera* (Figura 4) pueden distinguirse las hojas, los pneumatocistos (órganos de flotación que se encuentran en la base de cada hoja), los estipes (análogo a los tallos de las plantas superiores), los esporofilos (tejido reproductivo que se encuentra en la base de los organismos adultos) y el grampón, que es el órgano de fijación al sustrato y a diferencia de las raíces en las plantas superiores, no se ha demostrado que tenga función de absorción de nutrientes. La fronda es el conjunto de todas las hojas que con sus pneumatocistos crecen a partir de un mismo estipe. Un organismo adulto puede tener alrededor de 40 frondas en varios estadios de crecimiento y hasta unas 300 hojas a lo largo de cada estipe (North 1971a).



Figura 4: Representación de un organismo adulto de 1-2 años de edad de *Macrocystis pyrifera* donde se muestran las distintas partes que conforman un organismo. Tomado de Neushul y Haxo 1968.

La profundidad a la que se encuentra el grampón generalmente no excede los 30 metros de profundidad aunque una planta puede crecer hasta 60 metros de longitud, y en algunos sitios particulares como las Islas Malvinas hasta 100 m (Van Tussenbroek 1989). Por lo tanto, una proporción importante de los organismos se extiende sobre la superficie del mar formando el dosel. La tasa de elongación de frondas varía estacionalmente, con un máximo en primavera de hasta 0.5 m por día (Gerard 1982). Aunque esta especie es perenne (hay registro de grampones de hasta 30 años de edad, North 1971b), las frondas viven en promedio 6-9 meses y una hoja vive en promedio 4 meses (North 1971b).

Si bien no es una planta vascular, esta especie ha desarrollado al menos dos estrategias para evitar sufrir limitación nutricional. Una estrategia es la capacidad de translocar tanto iones como compuestos orgánicos e inorgánicos (Manley 1981, Manley 1984). La síntesis de compuestos orgánicos y la rápida absorción de compuestos inorgánicos provocan altas concentraciones de solutos en el interior de la macroalga, lo que a su vez genera tendencia para absorber agua del exterior y movilizarla junto con esos solutos a través de túbulos hacia las regiones apicales donde la concentración de solutos generalmente es menor pero la irradiancia es adecuada para el proceso de fotosíntesis (Manley 1984). La otra estrategia es la incorporación de lujo de nitrógeno y fósforo, la cual ocurre durante las épocas en que estos elementos se encuentran en abundancia (por ejemplo durante eventos de surgencia), mientras que las reservas las utilizan cuando las fuentes externas son inadecuadas (Gerard 1982, Manley North 1984).

Los principales factores ecológicos que afectan la supervivencia de las poblaciones de esta especie incluyen: el movimiento del agua, la disponibilidad de nutrientes (especialmente de nitrato), la temperatura del agua, la competencia por el sustrato con otras especies algales, el pastoreo por peces e invertebrados marinos, la iluminación y la sedimentación, más o menos en ese orden de importancia (North 1971a, Dayton 1985). Sin embrago otros autores establecen que la distribución y abundancia de muchas especies algales se ve principalmente afectada por la temperatura del agua (van den Hoek et al. 1995).

La fisiología de esta especie ha sido pobremente caracterizada tomando en cuenta la complejidad estructural de los organismos y la variabilidad del ambiente en el que viven (ver la siguiente sección). Arnold y Manley (1985) caracterizaron la variabilidad en los procesos de fotosíntesis y respiración en diferentes tejidos de M. pyrifera encontrando que las hojas son las que tienen la mayor capacidad para realizar fotosíntesis neta (3.07 mgC• g peso húmedo⁻¹• hora⁻¹), seguida por los esporofilos y los estipes, mientras que el grampón no presentó actividad fotosintética. Con respecto al efecto de la edad, Wheeler (1980) reporta que la máxima tasa de fotosíntesis neta decrece con la edad del tejido tanto en base al área como a la concentración de clorofila a y que la concentración de pigmentos (clorofila a, clorofila c y fucoxantina) fue constante a lo largo de la mayor parte de las frondas. Sin embrago, Smith y Melis (1987) reportan un aumento en la concentración de pigmentos accesorios en hojas colectadas a 20 m de profundidad con respecto a la composición pigmentaria de las hojas de superficie. Con respecto al efecto de la temperatura, entre 14 y 18 °C la tasa de crecimiento es constante, mientras que por encima de esa temperatura esta tasa disminuye fuertemente (Zimmerman y Kremer 1984), al igual que su capacidad fotosintética (Clendening 1971). Para esta especie se considera que la temperatura crítica es de 20 °C, aunque las poblaciones del límite sur de distribución del Hemisferio Norte parecen estar adaptadas a temperaturas mayores (Ladah et al. 1999). Con respecto al efecto de la concentración de nitratos, la tasa de crecimiento aumenta de manera exponencial en el rango de 0 a 3 µM, concentración a la cual alcanza su tasa máxima de crecimiento (Zimmerman y Kremer 1984).

I.5. Variabilidad ambiental dentro de un manto de M. pyrifera

La luz que llega a la superficie del mar varía estacionalmente, con irradiancias y dosis máximas durante el verano, no sólo de radiación fotosintéticamente activa (PAR) sino también de radiación ultra violeta (UV; Villafañe et al. 2004). La irradiancia que llega a la superficie del mar disminuye exponencialmente con la profundidad debido a procesos de atenuación en la columna de agua, asimismo existen cambios en la calidad espectral (Kirk 1992). La irradiancia en la columna de agua dentro de un manto de *Macrocystis pyrifera* puede variar desde un máximo de 2000 µmol fotones•m⁻²•s⁻¹ en la superficie a irradiancias de alrededor 20 µmol fotones•m⁻²•s⁻¹ a 13 metros de profundidad durante el verano, siendo entre los 0 y los 3 metros de profundidad la zona donde hay mayor atenuación de luz (Dean 1985).

La temperatura en la columna de agua presenta una clara variación estacional y depende de la profundidad. Durante la primavera en Baja California la diferencia de temperatura entre la superficie y 16 m de profundidad es mucho menor a la que se presenta durante el verano, donde la amplitud entre superficie y 16 m de profundidad puede alcanzar hasta 7 °C (Ladah et al. 2005). En la localidad de Campo Kennedy, Baja California, durante el verano se alcanzan temperaturas superficiales máximas de alrededor de 20 °C, aunque durante eventos de "El Niño" la temperatura puede superar los 22 °C (Figura 5; Ladah y Zertuche-González 2004).

Con respecto a los nutrientes en el Sistema de la Corriente de California el fósforo raramente es un recurso limitante, mientras que el nitrógeno lo es más comúnmente (Manley y North 1984) y su concentración se encuentra negativamente relacionada de manera lineal con la temperatura del agua hasta que ésta llega a 15.5 °C, temperatura a la cual su concentración es menor a 1 μ M (Jackson 1977, Zimmerman y Kremer 1984, Zimmerman y Robertson 1985).



Figura 5: Temperatura superficial del mar (SST) e índice de surgencias (PFEL upwelling) para la localidad de Campo Kennedy, Baja California, México. El periodo de estudio comprendió desde 1995 a 1999, mientras que el promedio de 9 años comprendió desde 1991 hasta 1999. Tomado de Ladah y Zertuche-González 2004.

La concentración de nutrientes en la zona aledaña a un manto de *Macrocystis pyrifera* cerca de San Diego, USA, presenta una clara variación estacional y también depende la profundidad. La concentración de nitrato en superficie es baja la mayor parte del

año (< 0.5μ M), mientras que por debajo de los 4.5 m de profundidad generalmente excede este valor. La máxima concentración de nitrato se ha reportado en primavera y la mínima en verano (Jackson 1977). En la localidad de Campo Kennedy, Baja California, el índice de surgencias muestra durante todo el año valores positivos, siendo los mayores transportes de abril a junio y los menores de diciembre a enero (Ladah y Zertuche-González 2004; Figura 5).

Durante el verano no sólo hay una mayor amplitud térmica entre superficie y fondo sino que además puede presentarse el fenómeno de estratificación de la columna del agua. Esto provoca dos tipos de ambientes: por encima de la termoclina la temperatura del agua es alta y la concentración de nutrientes es baja, mientras que por debajo de la termoclina la temperatura del agua es baja y la concentración de nutrientes es alta. Esto genera que bajo condiciones de estratificación, el deterioro del manto sea más notorio en el dosel y las áreas superficiales que en las porciones del manto que se encuentran por debajo de la termoclina, las cuales pueden sobrevivir prácticamente sin sufrir pérdidas o daños (North y Zimmerman 1984). En casos extremos en donde toda la columna de agua se encuentra bajo concentraciones de nitratos muy bajas (menores a 1 μ M) los organismos pueden sobrevivir hasta por tres semanas utilizando las reservas de nitrógeno que almacenan (Gerard 1982).

I.6. Deterioro de verano

Muchas especies algales tienen un ciclo de crecimiento estacional, comenzando a crecer en invierno y reduciendo o deteniendo su crecimiento en verano. Este es el caso para *Macrocystis pyrifera., Laminaria* sp. y *Pterygophora californica* (Lüning 1993). El
deterioro del dosel de *Macrocystis pyrifera* ocurre frecuentemente durante el verano en los mantos del Sur de California y Baja California (North 1971a) y es denominado "síndrome del verano". Este incluye pérdida de coloración en los tejidos, lesiones en las frondas, mayor fragilidad y posibilidad de rotura o desprendimiento, aumento de la cobertura de organismos incrustantes, perforación de pneumatocistos y pérdida de zonas apicales (North 1971a). A nivel fisiológico, la capacidad fotosintética disminuye al igual que la concentración de clorofila *a* (Gerard 1984) y la concentración de nitrógeno en el tejido (North y Zimmerman 1984). Mientras que algunos de estos síntomas se presentan por la escasez de nutrientes, por ejemplo la pérdida del color, otros pueden ser efectos indirectos del aumento de la temperatura, por ejemplo las lesiones causadas por aumento de la actividad microbiana (North 1971a).

I.7. Planteamiento del problema

La fisiología fotosintética en *Macrocystis pyrifera* ha sido pobremente documentada y en algunos casos la información es confusa y hasta contradictoria debido a la falta de homogeneidad en la colecta de material (profundidad de la cual proviene el tejido) y a la falta de información sobre la variación de su fisiología bajo diferentes condiciones ambientales. Esto genera información fragmentada que es difícil de interpretar. Así mismo, hasta la fecha no se ha reportado cuál es el grado de capacidad fotoprotectora que alcanza en superficie ni cómo se modifica ésta en función de la profundidad o la estacionalidad.

Esta especie es interesante para el estudio de su fisiología debido principalmente a dos factores: su tejido fotosintético se desarrolla a través de un gradiente de luz,

temperatura y concentración de nutrientes, y alcanza las mayores tasas de crecimiento entre las especies algales conocidas, lo cual implica que esta especie debe ser capaz de alcanzar altas tasas fotosintéticas (revisado en Arnold y Manley 1985) para poder producir grandes cantidades de fotosintetato necesarias para generar el tejido nuevo. Estas características hacen de *M. pyrifera* una especie única para el estudio de su fisiología ya que un sólo organismo, al estar expuesto a diferentes condiciones ambientales, debe poder expresar diferencialmente mecanismos de fotoaclimatación, fotoprotección y absorción de nutrientes de acuerdo a su posición en la columna de agua. Esta tesis trata sobre la regulación de la actividad fotosintética en la escala espacial (diferencias en relación a la profundidad a la que crece el tejido fotosintético) y temporal (fisiología de primavera versus fisiología de verano) en organismos adultos de *Macrocystis pyrifera*.

En el capítulo 2 de esta tesis se presenta un análisis detallado sobre la capacidad fotosintética y fotoprotectora de hojas provenientes de diferentes profundidades de organismos adultos. El objetivo fue caracterizar la respuesta fisiológica individual ante diferentes condiciones de aclimatación por luz con el fin de comprender la regulación de la actividad fotosintética en la escala espacial de organismos adultos. El análisis fue realizado en base a diferencias en cuanto a absorción de luz, composición pigmentaria, composición elemental, peso seco y peso húmedo, máxima eficiencia cuántica operativa del PSII (Fv/Fm), características fotosintéticas derivadas de las curvas fotosíntesis-irradiancia (P-E) y de transporte de electrones (ETR-E) durante la estación de primavera del 2005 en la localidad de Campo Kennedy, Baja California.

En el capítulo 3 se compararon los parámetros fisiológicos obtenidos en primavera con los obtenidos en verano. El objetivo fue caracterizar las diferencias fisiológicas entre ambas estaciones y relacionarlo con los síntomas del deterioro de verano con el fin de comprender la regulación de los mecanismos fotosintéticos en la escala temporal, tomando en cuanta primavera y verano como estaciones extremas dentro de su ciclo de vida. Se encontró que la composición elemental entre ambas estaciones fue similar pero las tasas fotosintéticas y la capacidad de fotoprotección fueron menores en verano.

Debido a los altos valores de disipación térmica encontrados en las hojas de superficie y cercanas a la superficie (Capítulos 2 y 3) y a la falta de información sobre el mecanismo que permite la formación de NPQ en macroalgas, se investigó sobre los mecanismos que permite la formación de NPQ en esta especie. Los resultados se discuten en el contexto de las diferencias encontradas con el modelo propuesto para plantas superiores (Capítulo 4).

Finalmente en el capítulo 5 se presenta una discusión general sobre los resultados obtenidos y sobre las hipótesis generadas con los datos obtenidos en este trabajo.

I.7.1. Objetivo general

Caracterizar la respuesta fisiológica individual ante diferentes condiciones ambientales con el fin de comprender la regulación de la actividad fotosintética en la escala espacial y temporal en organismos adultos de *Macrocystis pyrifera*.

*I.*7.2. Hipótesis general

Macrocystis pyrifera es una especie con una gran plasticidad fisiológica en cuanto a fotoaclimatación y fotoprotección, dado que su tejido fotosintético se desarrolla en un amplio gradiente ambiental tanto en la escala espacial como temporal.

I.7.3. Hipótesis particulares

- (Capítulo 2) Un sólo organismo, al ocupar toda la columna de agua, debe expresar diferencialmente sus mecanismos de fotoaclimatación y de fotoprotección de acuerdo a la posición que ocupa el tejido fotosintético en la columna de agua.
- (Capítulo 3) Durante el verano, la reducción en las tasas fotosintéticas está relacionada con la reducción en la capacidad fotoprotectora en organismos adultos de *Macrocystis pyrifera*.
- 3. (Capítulo 4) El mecanismo que controla NPQ en cromofitas y especialmente en heterokontofitas, es diferente al modelo propuesto para plantas superiores.

Capítulo 2

Regulación diferencial de los mecanismos de fotosíntesis y fotoprotección de Macrocystis pyrifera en la escala espacial

II. 1. RESUMEN

Macrocystis pyrifera (L) C. Agardh es una macroalga formadora de dosel que ocupa toda la columna de agua, por lo que su tejido fotosintético está expuesto a un amplio rango de factores ambientales, especialmente en relación a la cantidad y calidad de luz. En el presente trabajo se estudió la capacidad fotosintética, la capacidad de absorción de luz, la composición pigmentaria y la capacidad de disipación térmica en hojas de diferentes estratos de organismos adultos, durante la estación de primavera ya que es cuando los organismos alcanzan la máxima tasa de elongación de frondas. El objetivo fue caracterizar las respuestas fotoaclimatativas y fotoprotectoras de M. pyrifera de acuerdo a la posición del tejido fotosintético en la columna de agua. La respuesta más importante fue la gran capacidad fotoprotectora en las hojas de la superficie, en donde además se detectó la mayor acumulación de compuestos que absorben luz ultravioleta, carotenoides fotoprotectores, pigmentos del ciclo de las xantofilas y capacidad de disipación térmica. Estas características le permiten a las hojas de la superficie presentar las mayores tasas fotosintéticas y de transporte de electrones. Por lo tanto, las hojas superficiales hacen la mayor contribución a la producción total mientras que las hojas basales, que mostraron el patrón opuesto, no contribuyen significativamente a la producción de fotosintetato pero podrían ser importantes para otras funciones, como la incorporación de nutrientes.

II.2. INTRODUCCIÓN

Los organismos autótrofos necesitan de la luz solar para dirigir el proceso de fotosíntesis. Sin embargo, la luz no es un recurso constante y los organismos fotoautótrofos tienen que enfrentarse a variaciones en la escala tanto temporal como espacial de este recurso. En el transcurso de la evolución, algunas especies han eficientizado su metabolismo para vivir en condiciones de luz intensa o de sombra, mientras que otros han desarrollado estrategias para poder vivir en un gradiente de irradiancias, como es el caso de las especies formadoras de dosel (Eichelmann et al. 2005).

Las plantas y las algas pueden ser clasificadas en dos categorías de acuerdo a la cantidad normal de luz requerida para saturar su aparato fotosintético. La tasa de fotosíntesis en las especies de sol se satura a intensidades 1/5 de la luz solar directa, mientras que en especies de sombra la tasa de fotosíntesis se satura a intensidades más bajas que 1/10 de la luz solar directa (Salisbury y Ross 1969). Así mismo, la fisiología y la morfología de las especies de sol presentan diferentes características. Las especies de sol tienen menos pigmentos asociados a los centros de reacción y menor eficiencia fotosintética (α), mayor tasa máxima fotosintética (P_{max}), mayores mecanismos fotoprotectores, mayor punto de compensación de CO₂ y mayor punto de compensación de luz (E_K) que las especies de sombra (Ting 1982, Fujita et al. 2001 ver Figura 2). Por lo tanto, los organismos de luz y sombra han adaptado su metabolismo a vivir en condiciones de alta o baja luz, respectivamente (Lichtenthaler y Babani 2004, Eichelmann et al. 2005).

En el ambiente acuático, una fuente extra de variabilidad es que la intensidad de la luz disminuye exponencialmente con la profundidad debido a los procesos de atenuación de la luz en la columna de agua, lo cual también provoca cambios en la calidad espectral (Kirk 1992). La luz es un factor importante que determina la zonación de algas (Lünning 1990). Algunas especies proliferan en ambientes de alta irradiancia, mientras que otras están confinadas a aguas profundas y a su vez entre ellas difieren en sus requerimientos nutricionales, en sus rangos óptimos de temperatura y en su capacidad para colectar luz (Lüning 1990, Lobban y Harrison 1994, Rodrigues *et al.* 2002).

Por ejemplo *Laminaria abyssalis* una especie restringida a ambientes profundos (hasta 60 m de profundidad), es altamente susceptible a la fotoinhibicion pero es muy eficiente en absorber luz cuando es comparada con *L. digitata*, una especie somera (Rodrigues *et al.* 2000, 2002). Otro elemento clave en la zonación algal es la plasticidad de cada especie. El rango de profundidad de algunas especies está asociado a su capacidad para aclimatarse a diferentes condiciones lumínicas. *Ecklonia radiata* se distribuye desde los 3 hasta los 12 metros ya que el ajuste de su aparato fotosintético les permite alcanzar tasas fotosintéticas óptimas en este rango de profundidades (Fairhead y Cheshire 2004). Pero poco se conoce sobre la respuesta fisiológica que tienen organismos que al ocupar toda la columna de agua viven en un gradiente de irradiancias, temperaturas y concentración de nutrientes, como es el caso de *Macrocystis pyrifera*. Esta especie puede experimentar irradiancias desde 2000 µmol fotones•m⁻²•s⁻¹ en la superficie mientras que a 13 m de profundidad la intensidad lumínica es aproximadamente 20 µmol fotones•m⁻²•s⁻¹ dentro de un manto de sargazo (Dean 1985).

Macrocystis pyrifera (Phaeophyceae, Laminariales), comúnmente llamado Sargazo Gigante, es una de las más grandes algas marinas conocidas, y un importante productor primario en la zona costera templada (Dayton, 1985). Un organismo adulto puede tener 40 ó más frondas en varios estadios de crecimiento adosadas a su grampón, el órgano de fijación al sustrato rocoso, y cada una de ellas puede medir unos 25 metros y contener unas 300 hojas a lo largo de su estipe (North, 1971a). Debido a que ocupa toda la columna de agua, desde profundidades de 40 metros hasta la zona submareal somera y en algunos casos la intermareal (Ladah, 1999), sus frondas crecen a lo largo de un gradiente de irradiancias, temperatura y concentración de nutrientes (North, 1971a), y desde el punto fotobiológico, esta especie ocupa un gran número de nichos microclimatológicos (Wheeler, 1980). Probablemente es el único organismo fotoautótrofo que experimenta una variación tan amplia en factores ambientales, especialmente en los relacionados con cambios en la cantidad y calidad de luz. Por lo tanto, un organismo debe tener la plasticidad de vivir en este gradiente de ambientes mediante la expresión diferencial en sus respuestas fotoaclimatativas y fotoprotectivas de acuerdo a la posición del tejido fotosintético en la columna de agua.

El presente capítulo presenta los resultados obtenidos de mediciones de ciertos aspectos fotobiológicos en función de la posición de su tejido en la columna de agua. El objetivo fue caracterizar la respuesta de un sólo organismo a diferentes condiciones de luz. Así mismo, se realizaron mediciones de la capacidad para inducir quenching no fotoquímico de la clorofila *a* (NPQ) como un estimador de la capacidad de fotoprotección en la especie, para contestar la pregunta de qué tan grande es la capacidad de disipar el exceso de energía en forma de calor, y si esta capacidad varía con la profundidad.

II.3. MATERIALES Y MÉTODOS:

Material de estudio. Las muestras de *Macrocystis pyrifera* fueron colectadas de la zona submareal del manto ubicado en la localidad Campo Kennedy (31°41.96 N; 116° 40.90 W) cercano a la ciudad de Ensenada, Baja California, México. Esta localidad se encuentra en el rango medio de distribución de la especie en el Hemisferio Norte. Para la zona del Sur de California la temperatura promedio en primavera es de 15.5 °C en la superficie y decrece a 13 °C a 9 m de profundidad, mientras que la concentración de NO₃ varía desde 0.5 μ M en superficie a 6 μ M a 9 m de profundidad (Jackson 1977). En base al diámetro del grampón (North 1971a) se muestrearon organismos adultos de 2 años de edad y 18 m de longitud los días 31 de marzo y 12 de mayo del 2005. En el muestreo del 31 de marzo se colectaron hojas de 3 plantas: una fue muestreada desde la superficie (0 m) hasta el fondo a intervalos de 3 m, mientras que las otras dos solo fueron muestreadas a 0, 3 y 6 m. El 12 de mayo se muestrearon 2 organismos diferentes desde la superficie al fondo a intervalos de 3 m. Por cada profundidad se colectaron 4 hojas diferentes, las cuales fueron etiquetadas, mantenidas en oscuridad y transportadas al laboratorio en hieleras con agua de mar. El tiempo entre la colecta y el procesamiento de las muestras no excedió las 2 horas.

Cuatro discos de tejido de 1.2 cm de diámetro fueron cortados con un sacabocados a unos 10 cm del nematocisto sobre el eje central de cada una de las hojas libres de epifitas visibles. Los discos de las 4 hojas de cada profundidad fueron mezclados y se tomaron al azar para la medición de las diferentes variables. Algunos discos fueron usados inmediatamente mientras que otros fueron mantenidos por menos de 24 hs en matraces de 250 mL con 200 mL de agua de mar filtrada, en un incubador con un foto período 12:12 a 17 ± 0.5 °C con aireación vigorosa y una intensidad lumínica de 75 µmoles de fotones•m⁻ ²•s⁻¹ provistos por una lámpara fluorescente de luz fría de 54 watts (Tecno Life). La irradiancia fue medida con un irradiómetro LI-1000 (LI-COR, Inc.) y expresada en PAR (400- 700 nm).

<u>Composición elemental y determinación de peso y composición pigmentaria.</u> El peso húmedo fue medido inmediatamente después del corte de los discos para evitar la pérdida de agua o alginatos. El peso seco se obtuvo después de mantener los discos por 24 hs en una estufa a 60 °C. En cada caso se analizó la composición elemental para la determinación de carbono y nitrógeno, donde cada disco fue secado a 60 °C por 24 horas, molido en mortero y analizado por el método de combustión completa en Analizador Elemental- 440 (Exeter Analytical Inc, MA, USA). C y N se reportan como porcentaje de peso seco (%C y %N).

La cuantificación de pigmentos se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC), como se describe en Van Heukelem y Thomas (2001), modificado en el perfil de abastecimiento de solventes (%B, min): 5%, 0 min; 5%, 5 min; 95%, 22 min; 95%, 27 min; 5%, 30 min. Las extracciones se realizaron en 3 mL de acetona fría previa molienda del tejido en nitrógeno líquido. Los extractos fueron mantenidos por 1 hora en oscuridad a 4 °C, clarificados por centrifugación a 12000 xg por 5 min y almacenados a -20 °C por menos de 24 horas hasta el análisis por HPLC. El equipo de HPLC (Shimadzu AV-10) estaba equipado con una columna de fase reversa Zorbax ODBC-8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm tamaño de partícula). El protocolo fue calibrado y los factores de calibración se obtuvieron de estándares puros de clorofilas y carotenoides (DHK, Inc. Suiza). El estado de de-epoxidación de los pigmentos involucrados en el ciclo de las xantofilas (DPS) se calculó como:

$$DPS = ([Zea] + 0.5 \bullet [Ant]) / \Sigma XC$$
(1)

donde Ant y Zea representan la concentración de anetarxantina y zeaxantina, respectivamente. ΣXC representa la suma del conjunto de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (XC) conformado por violaxantina (Vio), anteraxantia (Ant) y zeaxantina (Zea). DPS representa el estado fotoprotector de los carotenoides del XC ya que Ant y Zea están involucrados en la disipación de energía en forma de calor que fotoprotege al aparato fotosintético (Pfündel y Bilger 1994).

<u>Mediciones de absorción de luz</u>. La absorción espectral fue medida usando el método de la esfera integradora. La absorción de luz fue medida en una sección de hoja de 1 cm de ancho dentro de una celda de cuarzo de 3 mL llena de agua de mar. La sección de la hoja fue puesta contra la pared de la celda mirando a la esfera integradora y cubriendo completamente el haz de luz. La transmitancia (T) se registró desde 300 a 750 nm a intervalos de 1 nm con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 40. Como referencia (blanco) se utilizó agua de mar. La absorbancia (D) se calculó como se describe en Geider y Osborne (1992):

$$D = -\log_{10}(1 - A) \tag{2}$$

donde A es la absortancia calculada como 1- (R+T). La reflectancia (R) de las muestras fue medida poniendo la cubeta en la parte posterior de la esfera integradora y usando un estándar de referencia de 100% (Labsphere USRS-99-010). Ya que la reflectancia y la dispersión fueron bajas (ver sección de resultados), todos los datos fueron agrupados y

usados para la estimación de absortancia. La corrección de la absorción no relacionada con la composición pigmentaria se realizó normalizando los datos de absortancia a 750 nm. La capacidad de absorber luz se reporta como el promedio de la región PAR (región fotosintéticamente activa, 400-700 nm) y mediante la absorción específica a 675 nm normalizada por la concentración de clorofila *a* (Chl *a*) por unidad de área en mg Chl *a* m⁻² (ρ) como se describe en Enríquez (2005):

$$*a_{chla675} = -\ln(1 - A_{675})/\rho.$$
(3).

Mediciones de fluorescencia de clorofila a. Las mediciones de fluorescencia de clorofila *a* (Chl *a*) para cada disco se realizaron con un fluorómetro de amplitud modulada sumergible (Diving PAM, Walz, Germany), cuya fuente de luz modulada tiene una emisión a 428 nm. La nomenclatura y los parámetros calculados siguen lo reportado por Van Kooten y Snel (1990). Para las determinaciones de máxima eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII), los discos fueron adaptados a oscuridad por 5 minutos y la fluorescencia basal (F₀) se obtuvo al colocar la sonda del fluorómetro a una distancia de 10 mm y prender la luz de medición, mientras que la Fluorescencia máxima (F_m) se determinó dando un pulso de 0.8 segundos de luz actínica saturante (2600 µmol photons•m⁻²•s⁻¹). F₀ se establece cuando todos los centros de reacción están abiertos, es decir que el aceptor primario (Q_A) está totalmente oxidado. F_m se establece cuando todos los centros de reacción están cerrados y Q_A está completamente reducido, lo que provoca que la eficiencia fotoquímica sea 0 y la fluorescencia sea máxima.

La tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes intensidades lumínicas (curvas ETR-E) fue medida en discos de tejido previamente aclimatados a oscuridad por 15 minutos. ETR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ETR = \Phi_{PSII} \bullet E_{PAR} \bullet 0.5 \bullet 0.80 \tag{4}$$

donde Φ_{PSII} es la separación de cargas efectiva del PSII determinada como (F'_m –F)/F'_m = Δ F/F'_m. F'_m y F son la máxima y la mínima fluorescencia en presencia de luz actínica, respectivamente. E_{PAR} es la intensidad lumínica aplicada en µmol fotones•m⁻²•s⁻¹, 0.80 es la fracción de luz incidente absorbida (absortancia promedio) y el factor 0.5 se aplica debido a que para el transporte lineal de electrones se requiera la absorción de un mínimo de 2 fotones (Genty et al. 1989). Las curvas ETR fueron realizadas aplicando 12 intervalos secuenciales de luz de 10 segundos cada una, hasta llegar a una irradiancia máxima de 1560 µmol fotones•m⁻²•s⁻¹. La luz actínica fue provista por la fuente de luz interna del Diving PAM.

La tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}), la eficiencia en el transporte de electrones (α ETR) y la reducción en el transporte en presencia de alta luz (β ETR) se obtuvieron aplicando el siguiente modelo (Platt et al. 1980):

$$ETR = ETR_{max} \bullet (tanh (\alpha_{ETR} / ETR_{max} \bullet E_{PAR})) \bullet exp (-\beta_{ETR} / ETR_{max} \bullet E_{PAR})$$
(5).

La capacidad de disipación no fotoquímico de la clorofila *a* (NPQ) se medió en discos expuestos por 30 minutos a una intensidad lumínica de 1560 μ mol fotones•m⁻²•s⁻¹en un baño de agua a una temperatura constante de 17 °C. NPQ fue monitoreado al colocar la fibra óptica del Diving PAM en un ángulo de 60° en relación a la cara del disco expuesta a la luz. La geometría se mantuvo constante durante cada medición por el lapso de tiempo

expuesto a alta luz, y cada minuto se aplicó un pulso de luz saturante (0.8 seg). NPQ se calculó como:

NPQ =
$$(F_m - F'_m)/F'_m$$
 (6).

Mediciones de Fotosíntesis vs. Irradiancia (curvas P-I). Las tasas fotosintéticas a varias intensidades de luz se midieron como producción de oxígeno. Discos de cada profundidad fueron mantenidos por 30 minutos en oscuridad antes de realizar las mediciones en una cámara de medición de la evolución de oxígeno a 17 °C (Dubinsky et al. 1987). A la cámara se le agregó NaHCO₃ (2mM) para evitar limitación por carbono. La respiración se midió durante 6 minutos antes de exponer los discos a la luz. La cámara fue iluminada y la concentración de oxígeno para cada disco se determinó polarográficamente con un electrodo (Yellow Spring Instruments, modelo 5331) por 3 minutos a 11 diferentes irradiancias. La calibración del electrodo se realizó en agua de mar con 0% O_2 y 100% O_2 . La iluminación fue provista por una lámpara de tungsten (proyector de diapositivas) y la atenuación de la luz se consiguió colocando como filtros atenuadores de luz diferentes grosores de acetato neutro color café. Los datos obtenidos fueron ajustados usando el modelo de la tangente hiperbólica (Jassby y Platt 1976):

$$P = P_{max} \bullet \tanh \left(\alpha \bullet E_{PAR} / P_{max} \right). \tag{7}$$

 E_k representa la irradiancia de saturación (P_{max}/α) y E_0 representa la irradiancia de compensación.

<u>Procesamiento de datos y análisis estadístico</u>. Los cálculos de los diferentes parámetros descritos se obtuvieron ajustando los datos a los modelos propuestos mediante el algoritmo de Marquardt-Levenberg (Sigma Plot software, Jandel SSP scientific). Los análisis

estadísticos paramétricos fueron realizados con el paquete Statistica 6.0, realizando pruebas ANOVA de 1 vía (Zar 1984), luego de corroborar que las muestras cumplían con el supuesto de homogeneidad de varianzas usando la prueba de Cochran (Underwood 1997). En todos los casos el valor de significancia de α fue 0.05. Todos los datos se presentan como la media ± 1 desviación estándar (DS).

*II.***4. RESULTADOS**

<u>Colecta de organismos</u>. Durante el buceo del 31 de marzo se colectaron muestras de un organismo adulto, cuyo diámetro de grampón fue de 69 cm y contaba con 16 frondas a una profundidad de 18 metros. Asimismo, se colectaron hojas de otros 3 organismos en superficie, 3 y 6 metros de profundidad. Debido a que estos 3 últimos organismos no fueron muestreadas en su totalidad, no pudo contarse el número de frondas ni registrarse el diámetro del grampón en el fondo, pero si se registró que el número de frondas a 6 metros fue de 20, 22 y 14 frondas mientras que en superficie fue de 28, 25 y 17 respectivamente.

Durante el buceo del 12 de mayo se colectaron muestras de dos organismos adultos, uno cuyo diámetro de grampón fue de 65 cm con 20 frondas a 18 metros de profundidad y el otro organismo, que resultaron ser dos plantas enredadas entre si, con grampones de 64.5 y 66 cm de diámetro y 90 frondas en conjunto. Se las consideró como un sólo organismo debido a la imposibilidad de separarlas bajo el agua y ya que al tener diámetros de grampón tan similares se puede especular que eran de edad muy parecida y con el mismo estado fisiológico e historia lumínica. También se descarta una respuesta genética diferencial ya que las plantas que se reclutan en un radio pequeño (1 m^2) son de la misma familia debido a que las esporas tienen fototropismo negativo y a su capacidad de dispersión es pequeña (Reed et al. 1992, Santalices 1990, Gaylord et al. 2002).

<u>Descriptores de Biomasa</u>. En la Figura 6 se presentan los resultados obtenidos para las determinaciones de peso seco, peso húmedo, carbono y nitrógeno. El peso húmedo fue significativamente diferente entre profundidades (ANOVA, p< 0.05) encontrándose el mayor valor en superficie (0.11 g•cm⁻²) el cual decrece aproximadamente un 20% en hojas

colectadas a profundidades de 12 m (Figura 6A). En contraste, los valores obtenidos para peso seco no fueron significativamente diferentes en función de la profundidad (ANOVA, p>0.05) y fueron aproximadamente el 10% del peso húmedo (Figura 6A).

El contenido de carbono en los discos de tejido fue aproximadamente el 25% del peso seco y no mostró diferencias significativas en función de la profundidad (ANOVA, p>0.05, Figura 6B). El contenido de nitrógeno más alto y más variable se presentó en las hojas superficiales (Figura 6C) y en general osciló entre 2.5 y 1.1% del peso seco, y tampoco presentó tendencia con la profundidad. La relación C:N fue relativamente constante para las hojas de todas las profundidades analizadas (12.3 en promedio, Figura 7), lo cual sugiere un balance entre proteínas y carbohidratos a lo largo del alga (Raven et al. 2004).

Jackson y colaboradores (1985) reportan que el área y el peso húmedo son medidas cercanamente equivalentes del tejido, aunque no miden la rugosidad de las hojas sino que es una relación que estiman a partir de la densidad de las láminas. Si la relación anterior fuera correcta, debería introducirse un factor de corrección por profundidad en el cálculo del área de cada disco. Sin embargo, los pesos secos oscilaron sobre un valor constante, razón por la cual para la normalización por área en los cálculos de concentración de pigmentos y en las curvas P-E, el área de cada disco se supuso constante.



Figura 6: Descriptores de biomasa para hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades durante los dos muestreos. A) peso húmedo (símbolo cerrado) y peso seco[.] 10 (símbolo abierto). B) Carbono elemental como % de peso seco. C) Nitrógeno elemental como % de peso seco. Se presenta la media de n= 4 para 0, 3 y 6m y n= 3 para 9, 12, 15 y $18m \pm SD$.



Figura 7: Razón C:N para hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades durante los dos muestreos de primavera. Se presenta la media de n=4 para 0, 3 y 6m y n=3 para 9, 12, 15 y 18m ± SD.

Absorción de luz. La atenuación de la luz en el tejido de *M. pyrifera* estuvo dominada por procesos de absorción ya que el tejido refleja una fracción mínima de la luz incidente. El promedio de la relfectancia en la región PAR (400-700 nm) fue de 10% (± 0.7) de la luz incidente y no hubo diferencias en la reflectancia espectral entre muestras de distintas profundidades (datos no mostrados). Por el contrario, la absorción espectral difirió cuantitativa y cualitativamente con la profundidad. Aunque disimilares, no hubo una clara tendencia con la profundidad de la absorbancia a distintas longitudes de onda. La absorbancia espectral normalizada por la absorbancia a 675 nm reflejó una cantidad relativa de pigmentos con absorción diferente a la de la Chl *a*. La absorción espectral normalizada mostró una síntesis diferencial de pigmentos en hojas de diferentes profundidades (Figura 8). Específicamente, las substancias que absorben a longitudes de onda más cortas fueron relativamente más abundantes en muestras colectadas desde la superficie hasta 6 m de profundidad, lo cual fue evidenciado por la alta absorción relativa en la región del UV (300-400 nm) y en la región del par de 400-500 nm (Figura 8).

Los descriptores de la atenuación de la luz se presentan en la Figura 9. La absorción relativa a 310 nm (Abs_{310nm}), la cual puede ser atribuida a la cantidad presente de compuestos que absorben en la región UV, disminuyó exponencialmente con la profundidad (R^2 = 0.98). Por lo tanto, la Abs_{310nm} fue mayor en hojas superficiales y disminuyó abruptamente en los primeros metros y mostrando valores mínimos entre 6 y 9 metros de profundidad (Figura 9A).

Otro importante descriptor de la absorción de luz es la proporción de luz absorbida por el tejido y la eficiencia de la absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos representados por la absortancia PAR (Figura 9A) y por el coeficiente específico de absorción de la clorofila a (* $a_{chla675}$). Ninguno de esos parámetros mostró una tendencia clara con la profundidad (Figura 9B y 9C). La absortancia en la región PAR en promedio fue de 80% y este parámetro no tuvo correlación con la concentración de Chl a (Figura 9B). Por lo tanto, no se detectaron cambios significativos en la absortancia aún con una variación de 4 veces la concentración de Chl a (Figura 9B). En contraste, la eficiencia de la absorción de luz de este parámetro disminuyó linealmente con el incremento del contenido de Chl *a* por unidad de área, ya que las hojas menos pigmentadas tuvieron una eficiencia 3 veces mayor que las hojas más pigmentadas (Figura 9C).



Figura 8: Absorbancia espectral relativa (normalizada por la absorbancia a 675 nm) de hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades durante los dos muestreos de primavera. Cada línea representa la media de n= 5 para 0, 3 y 6m y n= 3 para, 12 y 18m.



Figura 9. Absorción de luz en *M. pyrifera*. **A**) Absorción relativa a 310 nm (Abs_{310nm}) de hojas colectadas a diferentes profundidades. La línea continua representa el ajuste al modelo de decaimiento exponencial ($\mathbb{R}^2 = 0.98$). **B**) Relación entre la absortancia promedio en la región PAR y el contenido de Chl *a*. **C**) Relación entre el coeficiente especifico de absorción y el contenido de Chl *a* (los puntos sombreados representan las mediciones para hojas de mas de 15 m) n=3 organismos para cada profundidad.

<u>Concentración de pigmentos.</u> De acuerdo a la visión clásica de la aclimatación a condiciones de baja luz (Falkowski y LaRoche 1991) era de esperar un evidente incremento en la concentración de pigmentos por unidad de área en las hojas colectadas a mayores profundidades. La concentración de pigmentos entre organismos fue altamente variable, pero se observó un claro incremento en la concentración de pigmentos desde la superficie a las hojas más profundas. La concentración de fucoxantina (Fuc) en hojas provenientes de 18 m de profundidad fue más que el doble de la medida en superficie. La concentración de clorofilas (a y c) también fue mayor en hojas basales, pero el incremento fue menor al reportado para Fuc (Tabla I).

La concentración de los pigmentos normalizados por Chl *a* fue diferente en hojas colectadas a diferentes profundidades. La relación Fuc: Chl *a* cambió de 0.52 a 0.77 de hojas de superficie a hojas de fondo (Tabla I). De manera contraria a esta tendencia, las hojas de mayores profundidades presentaron menor concentración de carotenoides como violaxantina (Vio), anteraxantina (Ant) y zeaxantina (Zea). Estos tres carotenoides están involucrados en uno de los mecanismos fotoprotectivos más importantes conocido como el ciclo de las xantofilas (XC; Yamamoto 1979, Pfündel y Bilger 1994). En *M. pyrifera*, las hojas superficiales presentaron mayor $\Sigma XC/Chl a$ comparada con el resto de las profundidades y el tamaño del pool decreció con la profundidad. La concentración relativa de Vio cambió de 10.5% de la composición pigmentaria total a 3.9% en hojas de 18 m (Tabla I). De manera similar DPS decreció con la profundidad ya que la concentración de

la luz juega un papel importante en la regulación no sólo de la concentración relativa de los pigmentos sino también en el estado específico de conversión bioquímica.

Tabla I: Concentración pigmentaria, razones molares de clorofila *c* y fucoxantina a clorofila *a* y DPS en hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. Los valores se expresan como μ g pigmento cm⁻² y entre paréntesis se muestra el valor de S.D. (n=5 para 0, 3 and 6 metros, and n=3 para 9, 12, 13.5 y 18 m). * n.d.: no detectado

Prof	Chl	Chl	Fuc	β-	Vio	Ant	Zea	Chl	c: Fuc:	ΣΧΟ	/ DPS
(m)	с	а		caro				Chl	a Chla	Chl a	l
0	2.7	20.8	10.9	2.5	4.4	0.36	0.14	0.13	0.52	0.23	0.066
	(1.2)	(3.8)	(2.2)	(0.7)	(1.5)	(0.25)	(0.11)				
3	3.4	26.3	14.0	2.6	3.2	0.12	0.05	0.13	0.53	0.13	0.033
	(1.7)	(7.4)	(4.3)	(1.1)	(1.7)	(0.09)	(0.05)				
6	2.9	20.6	11.6	1.8	2.0	0.05	0.04	0.14	0.56	0.10	0.031
	(1.7)	(5.4)	(4.3)	(0.8)	(0.9)	(0.02)	(0.03)				
9	4.5	29.7	20.8	3.3	2.8	0.04	0.01	0.15	0.70	0.09	0.011
	(1.9)	(7.1)	(9.1)	(1.5)	(1.4)	(0.01)	(0.02)				
12	4.9	29.8	20.6	2.9	2.6	0.03	0.01	0.16	0.69	0.08	0.009
	(1.6)	(2.9)	(1.2)	(0.4)	(0.3)	(0.00)	(0.02)				
13.5	4.5	28.2	20.0	2.9	2.2	0.03	n.d.*	0.16	0.71	0.08	0.006
	(2.0)	(1.3)	(1.2)	(0.2)	(0.3)	(0.01)					
18	4.5	29.6	22.9	2.8	2.4	0.02	n.d.	0.15	0.77	0.08	0.004
	(4.4)	(9.0)	(10)	(1.3)	(1.0)	(0.01)					

Es importante destacar que en todas las muestras se identificó un pico cuyo tiempo de retención coincide con el de la diadinoxantina, que es característico del grupo de las diatomeas y no es un pigmento de la especie en estudio. Su concentración tuvo una variación con la profundidad de entre 0.53 y 0.78% del total de los pigmentos presentes. Esto genera una sobreestimación de los pigmentos que comparten las diatomeas (clorofila *a*, clorofila *c* y Fuc) con la especie en estudio. Sin embargo es difícil calcular la sobreestimación debido a que no fue identificada la especie, y la relación pigmentaria en este grupo varía considerablemente entre especies (Stauber y Jeffrey, 1988). Así mismo, no hubo una clara relación en la concentración de este pigmento con la profundidad, razón por la cual la contaminación con diatomeas no estaría introduciendo un error en función de este parámetro.

Actividad fotosintética en M. pyrifera. La actividad fotosintética se midió como evolución de oxígeno a diferentes intensidades lumínicas (Figura 10A). La respiración en oscuridad y los parámetros fotosintéticos derivados de la relación fotosíntesis vs. Irradiancia (P-E) se presentan en la Tabla II. No hubo diferencias en las tendencias cuando los datos fueron normalizados por la concentración de chl *a* o por área (datos no mostrados). La respiración en oscuridad fue mayor en las hojas basales (Tabla II). La alta tasa de respiración encontrada provocó una alta irradiancia de compensación (E₀) para las hojas basales, especialmente durante marzo. De manera contraria a esta tendencia, la tasa máxima fotosintética (P_{max}) disminuyó exponencialmente (R^2 =0.83) desde las hojas de superficie a las hojas del fondo (Tabla II). La pendiente inicial de la relación P-E (α), la cual refleja la máxima eficiencia fotoquímica fue relativamente constante para las hojas de todas las profundidades (Tabla II). Por lo tanto, la intensidad de saturación (E_K) siguió los cambios descritos para P_{max} , decreciendo exponencialmente con la profundidad (R^2 = 0.91), en el

rango 169 μ mol fotones•m⁻²•s⁻¹ en hojas de superficie a 97 μ mol fotones•m⁻²•s⁻¹ en hojas de 18 m.

Tabla II. Parámetros fotosintéticos de las hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades normalizados en base al área. La respiración (R) se midió en oscuridad antes de exponer las muestras a la luz. P_{max} es la tasa máxima fotosintética, α es la pendiente inicial de la relación Fotosíntesis vs. Irradiancia, E_0 es la irradiancia de compensación y E_K es la irradiancia de saturación.

Prof	R	P _{max}	α	$\mathbf{E}_{\mathbf{k}}$	E ₀
m	µmol O2	µmol O2	µmol O ₂ •m ⁻² •s ⁻¹	μmol	μmol
	$\bullet m^{-2} \bullet s^{-1}$	$\bullet m^{-2} \bullet s^{-1}$	(µmol fotones•m ⁻	fotones	fotones
			² •s ⁻¹) ⁻¹	•m ⁻² •s ⁻¹	•m ⁻² •s ⁻¹
0	1.64 ± 0.5	16.7 ± 2.8	0.098 ± 0.002	169 ± 34	16 ± 5
3	1.36 ± 0. 6	14.7 ± 1.3	0.095 ± 0.04	154 ± 24	13 ± 8
6	1.47 ± 0.6	13.8 ± 2.4	0.12 ± 0.02	116 ± 20	11 ± 7
9	2.11 ± 0.6	12.1 ± 2.8	0.12 ± 0.01	102 ± 48	18 ± 15
18	2.66 ± 0.7	10.4 ± 2.7	0.11 ± 0.01	97 ± 38	22 ± 12

<u>Actividad fotosintética medida como actividad del PSII.</u> La tasa de transporte de electrones a diferentes irradiancias (curvas ETR-E) refleja la aclimatación fisiológica de las células a cierta condición lumínica (Silva et al. 1998, White y Critchley 1999). La forma de las curvas ETR-E fue similar entre todas las profundidades (Figura 10B) excepto para las hojas superficiales, que además tuvieron las máxima tasa de transporte de electrones (ETR_{max}) con una drástica reducción del transporte a altas irradinacias (Figura 10B). ETR_{max} en superficie fue casi el doble del valor medido por debajo de 6 metros, y en los estratos inferiores a esta profundidad se mantuvo constante (Tabla III).

Tabla III. Parámetros obtenidos de las curves de transporte de electrones en hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades y calculadas como se describe en materiales y métodos. Los valores son el promedio \pm SD de n=5 para 0,3 y 6 m y n=3 para 9, 12 y 18m

Prof	ETR _{max}	$\alpha_{\rm ETR}$	$\beta_{\rm ETR}$
m	µmol e ⁻ •m ⁻² •s ⁻¹	µmol e ⁻ •m ⁻² •s ⁻¹	μmol e ⁻ •m ⁻² •s ⁻¹ (μmol
		(µmol fotones	fotones•m ⁻² •s ⁻¹) ⁻¹
		$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1})^{-1}$	···· · · · · · · · · · · · · · · · · ·
0	30.2 ± 4.1	0.20 ± 0.04	0.033 ± 0.013
3	22.3 ± 2.1	0.21 ± 0.02	0.010 ± 0.003
6	16.2 ± 1.6	0.24 ± 0.01	0.010 ± 0.001
9	15.4 ± 1.8	0.22 ± 0.01	0.013 ± 0.001
12	15.2 ± 2.2	0.25 ± 0.04	0.020 ± 0.003
18	15.1 ± 2.6	0.22 ± 0.05	0.020 ± 0.003
0 3 6 9 12 18	30.2 ± 4.1 22.3 ± 2.1 16.2 ± 1.6 15.4 ± 1.8 15.2 ± 2.2 15.1 ± 2.6	•m ⁻² •s ⁻¹) ⁻¹ 0.20 ± 0.04 0.21 ± 0.02 0.24 ± 0.01 0.22 ± 0.01 0.25 ± 0.04 0.22 ± 0.05	0.033 ± 0.013 0.010 ± 0.003 0.010 ± 0.001 0.013 ± 0.001 0.020 ± 0.003 0.020 ± 0.003



 E_{PAR} (µmol fotones·m⁻²·s⁻¹)

Figura 10: Tasa fotosintética (P-E) y tasa de transporte de electrones para hojas de Macrocystis pyrifera colectadas a diferentes profundidades. A) Curvas P-E a distintas irradiancias. B) Curvas ETR-E a distintas irradiancias. n=5 para 0, 3 y 6 m y n=3 para 9 y 18 m. Cada línea representa el ajuste ($R^2 > 0.95$ en todos los casos) al modelo descrito en materiales y métodos. Los datos se generaron a partir de dos muestreos en primavera.

De manera similar al parámetro α en las curvas P-E, la eficiencia en la tasa de transporte (α ETR) no mostró un claro patrón con la profundidad (Tabla III). Por lo tanto, La irradiancia de saturación fue nuevamente una función de ETR_{max} (como en el caso de las curvas P-E donde era función de P_{max}), y el mayor valor (205 µmol fotones •m⁻²•s⁻¹) fue registrado en superficie. De manera similar, β_{ETR} obtuvo sus mayores valores en superficie. Bajos valores de ETR en alta luz pueden estar relacionados con la reducción del Φ_{PSII} asociado a la reducción en la eficiencia del PSII ("down regulation") probablemente a través de vías de disipación de energía. Por lo tanto, la variación en β_{ETR} puede ser interpretada como una gran regulación para disminuir la actividad del PSII en hojas superficiales, probablemente para minimizar la formación de especies reactivas de oxígeno que potencialmente son peligrosas para las células (Krause y Weis 1991).

La máxima eficiencia del PSII (F_v/F_m) en hojas colectadas en superficie fue significativamente menor que para el resto de las profundidades (ANOVA, p<0.05, Figura 11). En promedio, F_v/F_m en superficie fue de 0.57, con valores extremos de 0.45 y 0.70. Para las demás profundidades se registró una dispersión mucho menor, y en todos los casos el valor de F_v/F_m fue similar al reportado para algas café (entre 0.7 y 0.8, Büchel y Wilhelm 1993).



Figura 11. Máxima eficiencia quántica operativa del PSII medido como la relación entre la fluorescencia basal y la variable (F_v/F_m) en hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades durante dos muestreos de primavera. Cada punto es el promedio de n=5 para 0, 3 y 6 m y n=3 para 9, 12, 15 y 18m. Las barras de error muestran la desviación estándar.

Comparación entre evolución de oxígeno y la tasa de transporte de electrones. La relación

entre la tasa de transporte de electrones medida usando el protocolo de *rapid light curves* (RLC) y la tasa de evolución de oxígeno a la misma irradiancia se presenta en la Figura 12. Una fuerte correlación entre ETR y evolución de oxígeno se presentó para irradiancias menores a 500 μ mol fotones•m⁻²•s⁻¹ (Figura 12). En condiciones de luz saturante la relación no pudo mantenerse debido a la fuerte disminución de ETR por el bajo Φ_{PSII} en esas condiciones (ver Figura 10B). El protocolo para la medición de ambas variables fue diferente y es necesario mantener las muestras un periodo de tiempo suficiente para que

lleguen a un estado estacionario de ETR, el cual no es alcanzado usando el protocolo de RLC. Sin embargo, los datos muestran que las RLC fueron capaces de representar las características fotosintéticas de hojas en condiciones de luz por debajo o cercanas a E_{K} .

La linealidad en la relación entre ETR y evolución de oxígeno demuestra que ETR es un parámetro adecuado para el estudio de los fenómenos que afectan a la fotosíntesis en *M. pyrifera* y es consistente con lo reportado por otros autores para especies que tienen mecanismos de concentración de carbono (Aguirre-von-Wobeser 2002; Silva *et al.* 1998). Esta relación permite utilizar la fluorescencia con la ventaja de ser un método no destructivo, rápido y confiable para estudios tanto *in situ* como en laboratorio.



Figura 12: Relación entre ETR y evolución de oxígeno para irradiancias menores a 500 μ mol fotones•m⁻²•s⁻¹. La línea representa el ajuste a una regresión lineal (R²=0.91).

Disipación de energía del PSII. Las hojas superficiales de *M. pyrifera* tuvieron una gran capacidad de disipación en forma de calor medida como NPQ, con un $t_{1/2}$ (tiempo en que alcanza la mitad de la expresión máxima) de entre 4 y 5 minutos y alcanzando valores de 10 (Figura 13). Las hojas colectadas a 3 metros de profundidad presentaron una reducción del 40% en NPQ con respecto a las de superficie, pero aún así el valor fue alto (NPQ=6). Las hojas colectadas a 6m mostraron una reducción del 60% en relación a los valores obtenidos para las hojas superficiales (NPQ=4), siendo este valor comparable al valor usual de NPQ reportado para plantas superiores (entre 2 y 4, Demming Adams y Adams III 1996). En contraste, las hojas más profundas que 9 metros tuvieron una baja capacidad para realizar NPQ. Estos resultados indican que una capacidad de fotoprotección efectiva debe estar involucrada en la regulación de la capacidad fotosintética en hojas de superficie.



Figura 13: Disipación no fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila *a* (NPQ) en hojas de *M. pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. Las mediciones se realizaron en dos organismos colectados en la primavera del 2005. *II.5.* DISCUSIÓN

La capacidad fotosintética es regulada de manera diferencial en un sólo organismo de *M. pyrifera* en función de la posición que ocupa el tejido fotosintético en la columna de agua. Las hojas colectadas a diferentes profundidades mostraron diferencias en sus tasas fotosintéticas, la concentración relativa de sus pigmentos, en sus propiedades para absorción de luz y en su capacidad para disipar el exceso de energía en forma de calor.

Estas respuestas fisiológicas están controladas principalmente por la variación de la irradiancia en función de la profundidad. Aunque los nutrientes y la temperatura son factores que afectan la capacidad fotosintética, durante primavera estas variables no se comportan como estresores. En el tejido no se detectaron signos de estrés nutricional ya que la concentración de nitrógeno en el tejido fue siempre superior al 1% (Gerard 1982). Así mismo, durante esta estación es cuando las frondas alcanzan sus máximas tasas de elongación en un área adyacente a Campo Kennedy (González-Fregoso et al. 1991).

M. pyrifera es una especie capaz de responder a condiciones ambientales diferentes mediante la expresión de condiciones de aclimataciones diferenciales de acuerdo a la posición del tejido fotosintético en la columna de agua. Las hojas superficiales mostraron diferencias en casi todos los parámetros medidos, presentando las mayores P_{max} , ETR_{max}, E_k , concentración de compuestos que absorben en UV (Abs₃₁₀), concentración de carotenoides fotoprotectores (ΣXC) y capacidad de realizar NPQ. De manera esperada, las hojas del subdosel presentaron valores menores de P_{max} , ETR_{max}, E_k , Abs₃₁₀, ΣXC y NPQ en comparación con las hojas superficiales, mientras que las hojas basales presentaron los menores valores de los mismos parámetros con una capacidad marginal para realizar NPQ. diferentes intensidades de luz. En condiciones de aclimatación a alta luz el proceso favorecido es una alta tasa de recambio de la unidad fotosintética (PSU) (Sukenik et al. 1987) mientras que la capacidad para absorber luz se ve reducida ya sea por una disminución en el tamaño del PSU o por reducción del número de PSU (Falkowski y LaRoche 1991). Esos ajustes incrementan la tasa de transporte de electrones y como consecuencia aumenta el P_{max} y ETR_{max} en algas adaptadas a alta luz (Silva et al. 1998).

Una de las principales respuestas de *Macrocystis pyrifera* fue que en las hojas superficiales y del subdosel las respuestas de fotoprotección se vieron favorecidas. Las hojas de estas profundidades acumularon significativos niveles de compuestos que absorben en el UV y carotenoides fotoprotectores y mostraron un alto NPQ. El aumento de la capacidad para fotoprotegerse es una respuesta bien documentada de plantas y algas adaptadas a alta luz (Horton et al. 1996). Así mismo, las algas acumulan compuestos que absorben en la región UV como una estrategia para fotoprotegerse cuando sienten un estrés debido a este tipo de radiación. En esta especie la acumulación de compuestos que absorben en el UV ya había sido documentada (Aguirre-von-Wobeser et al. 2000), en donde detectan un incremento del triple en la concentración de estos compuestos cuando las hojas fueron incubadas bajo luz solar directa. Esta especie probablemente es capaz de sintetizar y acumular compuestos que absorben UV-B como son los aminoácidos del tipo mycosporina y mycosporina-glicina ya que en otras especies de algas café la acumulación de estos aminoácidos es una respuesta importante de protección contra el UV (Apprill y Lesser 2003).

En relación a la protección de la radiación en la región del PAR, las hojas superficiales presentaron una alta capacidad de inducción de NPQ, la cual esta correlacionada con la alta ΣXC presente en el tejido. NPQ fue inducido por la síntesis de Zea y Ant a través del XC (capítulo 3 de esta tesis). Ya que ΣXC fue mayor en hojas superficiales éste estrato fue el que tuvo el mayor potencial para acumular pigmentos fotoprotectores como Zea. Un hecho bien documentado es que las especies de sol presentan altos valores de NPQ, mayor ΣXC y mayor síntesis de Zea en un corto plazo que las especies de sombra (Demmig-Adams y Adams III 1996, Eskling y Åkerlund 1999). La adaptación en términos de capacidad para fotoprotectores mientras que la especie Laminaria abyssalis que habita en aguas profundas expresa valores bajos de NPQ y presenta un pool reducido de pigmentos fotoprotectores mientras que la especie Laminaria digitata, la cual ocupa aguas someras muestra un patrón opuesto (Rodrigues et al. 2002).

Un resultado destacable es que los máximos valores de NPQ fueron de 10. Estos valores son atípicos para algas y plantas superiores y sólo han sido reportados para la diatomea *Phaeodactylum tricornutum* cultivada bajo un régimen de luz intermitente (Ruban et al 2004), en el alga café *Pelvetia canaliculata* (Harker et al. 1999) y en *Laminaria saccharina* (Gevaert et al. 2002). Probablemente, una alta capacidad de realizar NPQ es una respuesta particular de algunos miembros del filum Heterokontophyta y especialmente en algunas Phaeophytas, permitiéndoles a estas especies tener una alta capacidad fotoprotectora.

Un resultado inesperado fue que tanto los valores de α como de α ETR no fueron mayores en hojas basales en comparación con hojas del subdosel o superficiales, ya que α y α ETR no tuvieron un claro patrón con la profundidad. Debido a que la eficiencia fotosintética es máxima en organismos adaptados a sombra, altas tasas fotosintéticas son alcanzadas mediante el incremento del número o del tamaño de la PSU (Falkowski y LaRoche 1991). Esta respuesta aclimatativa permite que aumente la probabilidad de que un fotón sea absorbido por los pigmentos asociados a los fotosistemas (Lünning 1990). El incremento en el tamaño de las PSUs parece ser una importante respuesta de *M. pyrifera* a diferentes condiciones lumínicas.

La mayor diferencia en pigmentación, sin considerar a los pigmentos fotoprotectores, fue que las hojas basales presentaron mayores concentraciones del pigmento accesorio Fuc normalizado por Chl *a*. Smith y Melis (1987) también reportaron una mayor concentración de Fuc:Chl *a* en hojas colectadas a 20 metros de profundidad y ellos le atribuyen este cambio a una respuesta de los organismos a un aumento de la absorción en las longitudes de onda que predominan a estas profundidades (azul). La mayor diferencia detectada en las características de absorción es que las hojas superficiales y del subdosel presentan una absorción relativa mayor en la región azul-verde del espectro, lo cual puede ser asociado con una mayor ΣXC , ya que los carotenoides del XC absorben significativamente en el rango entre 450 y 500 nm.

La concentración de Chl *a* por unidad de área en esta especie es alta en comparación con otras algas (Enríquez et al. 1994) y con pastos marinos (Enríquez 2005). Como consecuencia, las hojas tienen una alta eficiencia para absorber luz lo cual queda
evidenciado en las mediciones de absortancia. La alta concentración de chl *a* también provoca un bajo coeficiente especifico de absorción de la clorofila *a* comparado con otras algas y con otras macrófitas (Enríquez et al. 1994, Enríquez 2005) y esta asociado con el efecto paquete (Dubinsky 1992).

Otro resultado inesperado es que las hojas basales presentaron una mayor irradiancia de compensación (E_0) comparada con las hojas superficiales y del subdosel. La razón principal de este incremento se debe a las altas tasas de respiración encontradas en las hojas basales. Normalmente, la limitación de la luz reduce las tasas metabólicas, lo que provoca que la respiración sea menor en hojas adaptadas a sombra (Geider et al. 1998). La alta tasa de respiración en las hojas basales podría estar asociada con un aumento de las rutas metabólicas que consumen energía, como por ejemplo los sistemas de incorporación de nutrientes.

La fotografía integrada de las respuestas fotoaclimatativas a diferentes condiciones ambientales en *M. pyrifera* durante la estación de primavera es la siguiente: las respuestas que aumentan la absorción de luz se ven favorecidas en todo el organismo. En los estratos superiores y especialmente en las hojas superficiales, las altas tasas fotosintéticas se alcanzan probablemente mediante un aumento en la tasa de recambio de la unidad fotosintética (PSU). Esto se logra haciendo más eficiente algunos pasos de las reacciones oscuras de la fotosíntesis. La regulación de las reacciones oscuras de la fotosíntesis (probablemente a nivel de concentración y/o actividad de Rubisco) parece ser una de las respuestas más importantes a diferentes condiciones lumínicas, lo cual quedó evidenciado por los cambios en P_{max} que no estuvieron acompañados por cambios en α en la

profundidad. Cabello-Pasini et al. (2000) reportaron una respuesta similar cuando aclimataron las hojas superficiales a diferentes condiciones lumínicas. Otra característica clave de las hojas superficiales es que presentan un mecanismo eficiente de fotoprotección (las hojas superficiales tienen una alta tasa y una rápida recuperación al estrés lumínico, ver capítulo 4). Esta estrategia es necesaria para reducir la fotoinhibición y para mantener una alta tasa fotosintética ya que la irradiancia que llega a la superficie en un día soleado puede ser 10 veces mayor que la irradiancia necesaria para saturar la maquinaria fotosintética (E_k en superficie fue 160 µmol fotones•m⁻²•s⁻¹). Como consecuencia de las altas tasas fotosintéticas las hojas superficiales y subsuperficiales hacen la mayor contribución a la producción por organismo. En contraste, la producción neta de las hojas basales es mínima considerando que la irradiancia que llega al interior de un manto a 14 m de profundidad es menor al 1% de la luz incidente en superficie (Dean 1985). En la tabla IV se presenta la estimación de la máxima productividad por estrato de la productividad a partir de una dosis diaria de luz típica para primavera, un coeficiente de atenuación típico para aguas costeras cercanas al sitio de estudio (K_d= 0.3; Peña Manjarrez, Com. Pers) y los valores reportados de P_{max} , E_0 y E_k (ver Resultados). En el estrato de 0-9 m se genera aproximadamente el 90% de la productividad, mientras que en el estrato de 9-18 m se genera menos del 10% de la productividad (Tabla IV). Así mismo, las hojas de 12-18 m presentaron valores negativos, lo cual indica que estas hojas son un gasto metabólico para el organismo (Tabla IV). Cabe aclarar que estos datos no están corregidos por la biomasa que tiene cada estrato sino que se calcularon asumiendo una biomasa constante, lo cual es una simplificación dada la complejidad estructural y la variabilidad en tamaño de estos organismos. Sin

embargo, la mayor parte de la biomasa se encuentra en el estrato 0-9m (North 1971b), lo cual permite suponer que este estrato genera más del 90% de la productividad máxima total.

Tabla IV: Estimación de la máxima productividad por estrato, asumiendo un K_d = 0.3 y una dosis de irradiancia de 50 E m⁻² día⁻¹ en superficie durante primavera. Para el cálculo de % de luz utilizable se uso el valor de absortancia promedio (80%) para todos los estratos y se restaron los fotones que representan el punto de compensación (E₀). La máxima productividad se calculó en base a la luz integrada en la columna de agua y la irradiancia de saturación (E_k). Los valores de P_{max}, E₀ y E_k usados provienen de la tabla II.

Estrato	% de luz	Máxima	%
	utilizable	productividad	producción
		µmol O ₂ m ⁻² dia ⁻¹	por estrato
0-3 m	100.00	675315.36	34.96
3-6 m	100.00	631549.44	32.69
6-9 m	81.82	480917.71	24.90
9-12 m	26.45	143889.76	7.45
12-15 m	-6.84	-34242.19	-1.77
15-18 m	-16.59	-73311.96	-3.80

La pregunta lógica es por qué *M. pyrifera* mantiene las hojas basales si no contribuyen a la producción neta del organismo. Dado que *M. pyrifera* tiene la capacidad de translocar iones y sustancias orgánicas desde y hacia el dosel (Manley 1981, Manley 1984), se propone la hipótesis de diferenciación de funciones entre los estratos superiores y las hojas basales. En las hojas basales podría existir una eficiencia en los procesos

involucrados en la absorción de nutrientes (como los sistemas de incorporación de nutrientes de baja afinidad-alta capacidad), mientras que las hojas superficiales estarían especializadas en la fotoprotección y en el uso eficiente de la energía absorbida para la producción de fotosintetato. Esto podría ser la ventaja adaptativa que le permite a esta especie tener una de las mayores tasas de crecimiento de todos los fotoautótrofos (Gerard 1982) y poder ser una especie dominante en el área submareal costera del Sistema Sur de la Corriente de California. *Macrocystis* podría necesitar hojas basales ya que crece en aguas que son oligotróficas en superficie la mayor parte del año. *Nereocystis*, otro de los miembros de la familia *Lessoniaceae*, no presenta hojas en todo el rango de la profundidad pero sólo vive en aguas frías y ricas en nutrientes inclusive en superficie y con mayor intensidad de oleaje. Para esta especie tener hojas adicionales podría ser una desventaja debido al incremento en la fuerza de arrastre que genera tener más biomasa (Denny y Gaylord 2002).

Otra diferencia con importantes implicaciones ecológicas es que tanto *Nereocystis* como *Pelagophycus* son especies anuales, a diferencia de *Macrocystis* que es una especie perenne (Lünning 1990). Se podría especular que en *Pelagophycus* la ausencia de hojas basales provoca su naturaleza anual, ya que no puede sobrevivir a los periodos de aguas cálidas y pobres en nutrientes en superficie, mientras que *Macrocystis* puede sobrevivir en forma perenne al deshacerse de las hojas del dosel y mantener sus niveles críticos de nitrógeno por encima del 1%.

II.6.CONCLUSIÓN

M. pyrifera es una especie capaz (adaptada) de expresar respuestas aclimatativas diferenciales en sus hojas, las cuales están individualmente expuestas a un amplio rango de condiciones lumínicas. Probablemente, mediante la evolución de la estrategia de diferenciación de funciones del tejido fotosintético, esta especie llegó a ser ecológicamente exitosa en una ambiente altamente variable como son las zonas costeras templadas con régimen de surgencias.

Capítulo 3

Fotofisiología de Macrocystis pyrifera en verano: fotosíntesis y fotoprotección

III.1. RESUMEN

Durante el verano, las poblaciones de Macrocystis pyrifera generalmente pierden su dosel y presentan daño en sus hojas, particularmente cerca de la superficie. Originalmente esta condición fue atribuida al efecto de la alta temperatura pero posteriormente se especuló que podría deberse a la baja concentración de nutrientes o al efecto sinergístico de ambos factores. En el presente estudio se compararon algunos aspectos de la fisiología fotosintética de esta especie durante primavera y verano del 2005 con el fin de detectar los cambios que pudieran explicar el mecanismo que culmina con el deterioro del dosel. La similitud entre estaciones en la composición elemental del tejido y en la concentración de proteínas totales permite suponer que las hojas de Macrocystis pyrifera en el Norte de Baja California no estuvieron estresadas por nutrientes independientemente de la profundidad a la que fueron colectadas. Tampoco se detectaron cambios ni en la concentración de pigmentos constitutivos ni en la de accesorios, en las curvas ETR-E o en Fv/Fm. Sin embrago, su capacidad fotosintética y su capacidad de fotoprotección tanto en el PAR como en el UV se vieron reducidas un 30-40% durante el verano, lo cual sugiere que el "síndrome de verano" podría estar relacionado con una reducción en la capacidad fotoprotectora. Así mismo, la diferencia entre ETR-E y P-E permiten hipotetizar que la fotosíntesis no estuvo limitada a nivel del PSII. Posiblemente, el incremento de otras vías

metabólicas que consumen oxígeno o una limitación en la etapa oscura de la fotosíntesis podría ser la causa de esta diferencia.

III.2. INTRODUCCIÓN

Todos los organismos fotosintéticos oxigénicos se desarrollan en un ambiente en el que muchos factores pueden afectar la tasa y la capacidad fotosintética en la escala temporal, desde segundos hasta periodos más largos que días. El principal de esos factores es la intensidad de la luz, mientras que la temperatura, la concentración de nutrientes y de CO₂ cobran mayor importancia bajo condiciones de estrés lumínico (Falkowski y Raven 1997). Durante un ciclo anual, el campo lumínico cambia considerablemente debido a los cambios en la irradiancia y el fotoperíodo, y en la columna de agua hay además cambios en la calidad espectral debido a los procesos de atenuación (Kirk 1992).

En el curso de la evolución las algas han desarrollado la capacidad de ajustar su maquinaria fotosintética en respuesta a la variación de la luz (Blankenship 2002). Esta capacidad es esencial porque para sobrevivir y ser competitivas las macroalgas deben ser capaces de colectar y utilizar una cantidad suficiente de luz para ser productivas en invierno, mientras que durante el verano deben tener mecanismos eficientes de fotoprotección para evitar dañar la maquinaria celular. Acorde con lo anterior, muchas macroalgas muestran un ciclo de crecimiento anual, comenzando en invierno y deteniendo o disminuyendo su tasa de crecimiento en verano (Lüning 1993). *Macrocystis pyrifera* es una macroalga que no sólo muestra este comportamiento sino que además durante el verano y especialmente durante condiciones ENSO (Ladah y Zertuche-González 2004, Grove et al. 2002, Gerard 1984, 1986) sufre el deterioro de su dosel (North 1971a). Esto se manifiesta como blanqueamiento del tejido, lesiones en las hojas, aumento de la cobertura de organismos incrustantes, perforación de los pneumatocistos, lo cual causa la pérdida de la boyancia, y escasez de hojas apicales (North 1971a). A nivel fisiológico, la capacidad

fotosintética de las hojas superficiales disminuye entre un 15 y un 30% respecto a los valores registrados en primavera (Clendenning 1971) y la concentración de clorofila *a* y de nitrógeno en el tejido disminuyen hasta los valores reportados como críticos para la especie (Gerard 1984, North y Zimmerman 1984).

Al conjunto de estos síntomas se le denomina "síndrome de verano" y en el Sur de California ha sido relacionado con el aumento de la temperatura del agua (North 1971a), la disminución en la concentración de nutrientes (Jackson 1977, Dayton y Tegner 1984) o al efecto sinergístico de ambos factores (Gerard 1984, Zimmerman y Kremer 1984). Sin embrago, hasta la fecha no se ha estudiado qué relación tiene este síndrome con el aumento de la irradiancia, ya que durante el verano aumenta la irradiancia no sólo en superficie, sino que el deterioro del dosel permite que la irradiancia penetre hasta estratos más profundos (Dean 1985). Cuando la cantidad de luz absorbida excede la capacidad fotosintética del organismo, el pigmento violaxantina (Vio) es de-epoxidado a zeaxantina (Zea) en un ciclo conocido como ciclo de las xantofilas (XC; Yamamoto 1962). La síntesis de la Zea está relacionada con la conversión del fotosistema II (PSII) a un estado de mayor disipación térmica y menor emisión de fluorescencia de la clorofila a (Chl a). La disipación térmica protege al centro de reacción del PSII de sufrir sobreexcitación y un subsiguiente deterioro ya que reduce las posibilidades de formación de especies reactivas de oxígeno (Havaux y Niyogi 1999). Este proceso de disipación no fotoquímica (NPQ) lo presentan casi todos los fotótrofos eucariotas, ayudando a regular y proteger su aparato fotosintético del exceso de luz (Horton et al. 1994, Müller et al. 2001).

En contraposición al verano, durante la primavera esta especie alcanza su máxima tasa de elongación de frondas (González-Fregoso et al. 1991) y su fisiología fotosintética está principalmente regulada por la luz (Colombo-Pallotta et al. 2006). Así mismo se documentó una alta capacidad para realizar NPQ en superficie y de esta forma disipar eficientemente el exceso de energía en forma de calor (capítulo 2). Sin embargo no se conoce si esta capacidad puede verse disminuida durante el verano y si tiene alguna relación con el estado nutricional del tejido. En el presente capítulo se contrastan los resultados fisiológicos obtenidos en una condición ambiental no estresante (primavera) y una condición ambiental estresante (verano) en un manto del Norte de Baja California. Principalmente se evaluaron los cambios en los parámetros fotosintéticos, la tasa de transporte de electrones, pigmentación y respuesta fotoprotectora en el PAR y en el UV. Debido a que las respuestas fotoprotectoras y la capacidad fotosintética disminuyeron considerablemente, especialmente en superficie pero las tasas de transporte de electrones se mantuvo en niveles altos, se hipotetiza que la reducción en la capacidad fotosintética podría estar relacionada con una limitación en la etapa oscura de la fotosíntesis más que con una limitación nutricional como ha sido sugerido en California (Jackson 1977, Dayton y Tegner 1984).

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

<u>Características del sitio de estudio.</u> Las muestras para este estudio se colectaron en la localidad Campo Kennedy (31°41.96 N; 116° 40.90 W) cerca de la ciudad de Ensenada, Baja California, México. El sitio, ubicado al sur de Punta Banda, es altamente productivo durante primavera y verano, con un intenso régimen de surgencias regional (Ladah y Zertuche-González 2004). La temperatura superficial del mar máxima se presenta en septiembre y la mínima de febrero a abril; el índice de surgencias muestra el mayor transporte fuera de la costa de abril a junio y la menor en diciembre y enero (Ladah y Zertuche –González 2004).

Material algal. Las muestras de *Macrocystis pyrifera* fueron colectadas como se describe en el Capítulo 2 de esta tesis. Brevemente, en base al diámetro del grampón (North 1971a), se muestrearon organismos adultos de aproximadamente 2 años de edad, de unos 18 m de largo mediante buceo autónomo en dos muestreos en primavera (31 de marzo y 12 de mayo del 2005) y dos muestreos en verano (12 de julio y 5 de septiembre del 2005). Durante cada muestreo se colectaron hojas de 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 m de profundidad de 1-3 organismos y se mantuvieron en oscuridad hasta su procesamiento en el laboratorio.

Con la ayuda de un sacabocados se cortaron discos de 1.2 cm de diámetro a 10 cm del pneumatocisto sobre el eje central de cada hoja libre de epifitas. Los discos de las 4 hojas colectadas a cada profundidad fueron mezclados y seleccionados al azar para la medición de las diferentes variables y fueron mantenidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de agua de mar filtrada a una temperatura constante de 17 ± 0.5 °C con aireación vigorosa. La luz (100 µmoles de fotones•m⁻²•s⁻¹) fue provista por una lámpara

fluorescente de luz fría de 54 watts (Tecno Life) en un fotoperíodo 12:12 hs. La irradiancia en el PAR fue medida con un sensor de irradiancia LI-1000 (LI-COR, Inc.).

Determinación de C, N, composición pigmentaria y absorción de luz. Para la determinación de la concentración de carbono y nitrógeno en el tejido cada disco fue secado a 60 °C por 24 hs, molido en mortero y analizado por el método de combustión completa en un Analizador Elemental 440 (Exeter Analytical Inc, MA, USA). Los valores se reportan como porcentaje de peso seco (%C y %N).

La cuantificación de pigmentos se determinó mediante Cromatografía Líquida de Alta Presición (HPLC), como se describe en el Capítulo 2 de esta tesis. El estado de deepoxidación (DPS) de los pigmentos del ciclo de las xantofilas se calculó como:

$$DPS = ([Zea] + 0.5 \bullet [Ant]) / \Sigma XC$$
(9)

donde Ant y Zea son las concentraciones de anteraxantina y zeaxantina respectivamente y ΣXC representa la suma de los pigmentos del XC (violaxantina, anteraxantina y zeaxantina). DPS representa el estado fotoprotector del ciclo de las xantofilas ya que los carotenoides Ant y Zea están involucrados en la disipación de la energía en forma de calor, lo cual protege al aparato fotosintético (Pfündel y Bilger 1994).

La absorción espectral se evaluó usando la técnica de la esfera integradora en una sección de 1 cm de ancho de cada hoja dentro de una celda de cuarzo de 3 mL llena de agua de mar, como se describe en el capítulo 2.

<u>Mediciones de fluorescencia de clorofila a.</u> La fluorescencia de la Chl *a* se midió con un fluorómetro de amplitud modulada (Diving PAM; Heinz Walz, Effeltrich, Germany), equipado con un diodo azul (pico de emisión a las 428 nm) como la luz de medición. La

nomenclatura y los cálculos de los parámetros se realizaron como se describe en Van Kooten y Snel (1990). La tasa de transporte de electrones (ETR) fue medida en discos previamente aclimatados a oscuridad por 15 minutos, ETR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ETR = \Phi_{PSII} \bullet E_{PAR} \bullet 0.5 \bullet 0.80 \tag{10}$$

donde Φ_{PSII} es la eficiencia cuántica operacional del PSII determinada como (F'_m –F)/F'_m = $\Delta F/F'_m$. F'_m y F son la máxima y la mínima fluorescencia en presencia de luz actínica, respectivamente. E_{PAR} es la intensidad lumínica aplicada en µmol fotones m² s⁻¹ y el factor 0.5 se aplica debido a que el transporte lineal de electrones involucra la absorción de un mínimo de 2 fotones (Genty et al. 1989). Las curvas rápidas de ETR-E (RLC) fueron realizadas aplicando 12 intervalos secuenciales de luz de 10 segundos cada una hasta un máximo de 1560 µmol fotones•m⁻²•s⁻¹. La luz actínica fue provista por la luz interna del Diving PAM.

La tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}), la eficiencia del transporte (α_{ETR}) y la reducción en la tasa de transporte durante alta luz (β_{ETR}) se obtuvieron usando el siguiente modelo (Platt et al. 1980):

$$ETR = ETR_{max} \bullet (tanh (\alpha_{ETR} / ETR_{max} \bullet E_{PAR})) \bullet exp (-\beta_{ETR} / ETR_{max} \bullet E_{PAR})$$
(11)

La disipación no fotoquímica de la clorofila *a* (NPQ) se medió en discos expuestos por 30 minutos a una intensidad lumínica de 1560 μ mol fotones•m⁻²•s⁻¹ en un baño de agua a una temperatura constante de 17 °C. El NPQ fue monitoreado al colocar la fibra óptica del Diving PAM en un ángulo de 60° en relación a la cara del disco expuesta a la luz. La geometría se mantuvo constante durante cada medición por el lapso de tiempo expuesto a alta luz, y cada minuto se aplicó un pulso de luz saturante (0.8 seg). El NPQ se calculó como:

$$NPQ = (F_{m} - F'_{m})/F'_{m}$$
(12)

<u>Mediciones de Fotosíntesis vs. Irradiancia (curvas P-E).</u> La tasa fotosintética a diferentes intensidades de luz se midió por duplicado como producción de oxígeno, como se describe en el Capítulo 2 de esta tesis. Los datos obtenidos fueron introducidos en el siguiente modelo para calcular la pendiente inicial (α) y la tasa máxima fotosintética (P_{max}) siguiendo el modelo propuesto por Jassby y Platt (1976):

$$P = P_{max} \bullet tanh \left(\alpha \bullet E_{PAR} / P_{max} \right)$$
(13)

Procesamiento de datos y análisis estadístico. Los cálculos de los diferentes parámetros descritos se obtuvieron ajustando los datos a los modelos propuestos mediante el algoritmo de Marquardt-Levenberg (Sigma Plot software, Jandel SSP scientific). Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete Statistica 6.0. Para analizar los cambios estacionales los datos de las diferentes profundidades fueron agrupados para obtener un juego de datos integrativo de organismos en primavera y en verano. Estos análisis se determinaron usando pruebas ANOVA de una vía (Zar 1984), luego de corroborar que las muestras cumplían con el supuesto de homogeneidad de varianzas usando la prueba de Cochran (Underwood 1997). En todos los casos el valor de significancia de alfa fue de 0.05. Todos los datos se reportan como la media \pm una desviación estándar.

III.4. RESULTADOS

Composición elemental. En la Figura 14 se presentan los resultados de la composición elemental en el tejido durante primavera y verano en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. La concentración de carbono en el tejido (%C) no mostró diferencias significativas entre primavera y verano (ANOVA p=0.45). El valor promedio de %C durante el verano fue del 26 % del peso seco, valor dentro del rango reportado para la especie (van Tussenbroek 1989). De manera similar, los valores de concentración de nitrógeno en el tejido (%N) no fueron significativamente diferentes entre primavera y verano (ANOVA p=0.63). El valor promedio de nitrógeno en el tejido urante el verano fue de 2.5%, lo cual indica que la concentración de nitrógeno en el tejido se encontró siempre por encima del valor crítico reportado para la especie (1%; Gerard 1982) y contrariamente a lo esperado, el %N no disminuyó en el verano, lo cual ha sido previamente reportado en California (Gerard 1984, North y Zimmerman 1984, Dean y Jacobsen 1986) y en las Islas Malvinas (van Tussenbroek 1989).

<u>Absorción de luz</u>. La absorbancia espectral normalizada a 675 nm refleja la cantidad relativa de pigmentos con características de absorción diferentes a las de la clorofila *a*. Durante primavera, este parámetro mostró una síntesis diferencial de pigmentos a diferentes profundidades (Colombo-Pallotta et al. 2006), especialmente las sustancias que absorbieron a longitudes de onda cortas fueron relativamente más abundantes en hojas de superficie y cercanas a superficie. Durante el verano esta síntesis diferencial no fue evidente ya que el tejido a lo largo de todo el organismo mostró un comportamiento similar y éste fue comparable al del de las hojas de estratos profundos durante primavera (Figura 15).



Figura 14: Composición elemental de discos de tejido de *Macocystis pyrifera* de hojas colectadas a diferentes profundidades. A) Contenido de carbono (%C); B) Contenido de Nitrógeno (%N) como % de peso seco en primavera (símbolo cerrado) y verano (símbolo abierto) del 2005. Cada punto (n=4) representa la media \pm 1 SD para cada profundidad y estación.



Figura 15: Absorbancia espectral relativa (normalizada a la absorbancia a 675 nm) de hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas en primavera y en verano. Cada línea representa la media de 3 organismos analizados.

En la Figura 16 se presenta la comparación de los descriptores de absorción de luz para primavera y verano. La absorción relativa a 310 nm en verano fue 30-40% menor que en primavera para las hojas de superficie y cercanas a superficie, mientras que en las hojas basales no mostró diferencias. Esto significa que durante el verano hubo una reducción de los compuestos que absorben en el UV en la mayor parte del organismo y especialmente en la superficie (Figura 16A). La proporción de luz absorbida por el tejido (absortancia) tuvo el mismo comportamiento en primavera y verano, siendo en promedio 80% y sin mostrar correlación con la concentración de clorofila a (Figura 16B). El coeficiente específico de absorción mostró un comportamiento similar entre estaciones, donde las hojas menos pigmentadas fueron 3 veces más eficientes para absorber luz en comparación con las hojas más pigmentadas. Sin embrago, durante el verano el coeficiente específico de absorción fue un 50% más alto que en primavera (Figura 16C).

Concentración pigmentaria. La composición pigmentaria de los discos colectados a diferentes profundidades durante primavera y verano fue evaluada mediante HPLC. La concentración de clorofila *a* no fue significativamente diferente entre estaciones (ANOVA p=0.907, Figura 17A), presentando una mayor variabilidad en primavera y valores promedios de 26 μ g •cm⁻². La única diferencia encontrada fue que la concentración de Chl *a* en las hojas superficiales colectadas en verano fue 23% mayor que en las hojas superficiales colectadas en verano fue 23% mayor que en las hojas superficiales colectadas en verano fue 23% mayor que en las hojas superficiales colectadas en verano fue 23% mayor que en las hojas superficiales colectadas en primavera. La concentración de β-caroteno tampoco fue significativamente diferente entre estaciones (ANOVA p=0.054, Figura 17B) presentando valores promedio de 2.2 μ g •cm⁻².



Figura 16: Descriptores de absorción de luz en *Macrocystis pyrifera* en primavera (símbolos cerrados, línea contínua) y verano (símbolos abiertos, línea punteada). A) Absorción relativa a 310 nm. B) Relación entre la absortancia promedio en el PAR y la concentración de Chl *a*. C) Relación entre el coeficiente específico de absorción con el contenido de Chl *a*. n=3 organismos por estación para todas las profundidades analizadas.



Figura 17: Concentración de pigmentos constitutivos en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades en primavera 2005 (símbolo cerrado) y en verano 2005 (símbolo abierto) A) Concentración de clorofila *a*. B) Concentración de β -caroteno. Cada punto representa la media (n=4) ± 1 SD por estación y profundidad.

El pigmento accesorio clorofila *c* (Chl *c*) no mostró diferencias significativas entre estaciones (ANOVA p=0.49, Figura 18A) con valores promedio de 4 μ g •cm⁻², mientras que la fucoxantina (Fuco) tampoco mostró diferencias significativas entre estaciones (ANOVA p=0.47, Figura 18B) con valores promedio de 16 μ g •cm⁻². Aunque no se encontraron diferencias estadísticas en cuanto a la concentración de pigmentos constitutivos y accesorios entre estaciones, lo cual posiblemente se deba a la alta variabilidad encontrada especialmente durante primavera, durante el verano hubo una clara tendencia a mantener la misma concentración de pigmentos a diferentes profundidades, mientras que en primavera se documento un aumento en hojas basales con respecto a superficie de hasta el doble de fucoxantina, y en menor medida de clorofila *a* y *c* (Colombo-Pallotta et al. 2006).

El conjunto de pigmentos involucrados en el ciclo de las xantofilas normalizados por la concentración de clorofila *a* (XXC/ Chl *a*) no mostró diferencias significativas entre estaciones (ANOVA p=0.203, Figura 19A) aunque en las hojas de superficie colectadas en primavera el XXC/ Chl *a* fue 40% mayor con respecto al encontrado en las hojas de superficie colectadas en verano. Esta disminución esta relacionada con la disminución en la absortancia relativa en la región entre 450 y 500 nm durante el verano (Figura 15) ya que los carotenoides del XC absorben significantemente a estas longitudes de onda. El estado de de-epoxidación (DPS), que representa la proporción de los pigmentos de ciclo de las xantofilas en la forma disipadora, no mostró diferencias significativas (ANOVA p=0.468, Figura 19B) entre estaciones, aunque de manera interesante, en las hojas de superficie colectadas en verano el DPS fue 45% mayor que en las hojas de superficie colectadas en primavera.



Figura 18: Concentración de pigmentos accesorios en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades en primavera 2005 (símbolo cerrado) y en verano 2005 (símbolo abierto) A) Concentración de clorofila *c*. B) Concentración de fucoxantina. Cada punto representa la media (n=4) \pm 1 SD por estación y profundidad.



Figura 19: Concentración de pigmentos fotoprotectores y DPS en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades en primavera 2005 (símbolo cerrado) y en verano 2005 (símbolo abierto) A) pigmentos del ciclo de las xantofilas normalizados por la concentración de clorofila *a*. B) Estado de de-epoxidación. Cada punto representa la media $(n=4) \pm 1$ SD por estación y profundidad.

Capacidad fotosintética. Los parámetros fotosintéticos derivados de las curvas P-E realizadas en las hojas colectadas durante el verano mostraron claras diferencias con respecto a los parámetros registrados durante primavera (Figura 20). Durante el verano, la máxima tasa fotosintética (Pmax) no se presentó en las hojas de superficie sino que fueron las hojas colectadas a 3 m de profundidad las que tuvieron el mayor P_{max}, lo cual concuerda con lo reportado por Clendenning (1971) quien documenta que en California la mayor tasa fotosintética en verano fue encontrada en hojas de profundidades intermedias (aproximadamente 6m). Esto representó una reducción del 30% del máximo Pmax y de hasta el 60% en las hojas basales con respecto a los valores encontrados en primavera (Figura 20). La reducción de P_{max} en verano fue evidente ya que el máximo valor obtenido en verano (4.2 µmol O₂•cm⁻²•h⁻¹) es comparable al obtenido en las hojas de 18 m de profundidad durante la primavera (Colombo-Pallotta et al. 2006). Otra diferencia fue que durante el verano los valores de la eficiencia fotosintética medida como la pendiente inicial de las curvas P-E (α) disminuyó en los estratos más profundos, a diferencia de lo encontrado en primavera, donde α fue constante conforme el aumento de la profundidad (capítulo 2). Esto podría estar relacionado con una disminución relativa del tamaño de la PSU en profundidad en comparación con el de primavera, ya que durante el verano la concentración de clorofila c y fucoxantina no mostró el patrón de incremento con la profundidad que mostró en primavera (Figura 18).

Capacidad fotosintética medida como actividad del PSII. Las curvas de transporte de electrones (ETR-E) reflejan el estado aclimatativo de células a una cierta condición lumínica (Silva et al. 1998, White y Critchley 1999). Estas curvas fueron muy similares

tanto en forma como en magnitud entre estaciones (Figura 21) y no se encontraron diferencias significativas en sus parámetros derivados ETR_{max} (ANOVA p= 0.656), α ETR, (ANOVA p= 0.180) y β ETR (ANOVA p=0.406) entre primavera y verano. Esto podría estar reflejando que durante el verano la capacidad operativa del PSII no se modificó y que la reducción en la capacidad fotosintética podría deberse a causas independientes del transporte de electrones en el PSII. La máxima eficiencia cuántica operativa del PSII (F_v/F_m) no tuvo diferencias significativas entre estaciones (ANOVA p=0.654), aunque durante el verano las hojas de superficie no mostraron la reducción de este parámetro que tuvieron las hojas superficiales en primavera (F_v/F_m superficial en primavera 0.57 y en verano 0.67, Figura 22).

Al igual que en primavera, en verano hubo una fuerte correlación entre ETR y evolución de oxígeno para irradiancias menores a 500 μ moles fotones•m⁻²•s⁻¹. Sin embrago, el valor de la pendiente fue mayor en verano debido a la disminución en los valores de evolución de oxígeno. Sin embargo, la linealidad en ambas estaciones permite el uso del protocolo RLC para caracterizar la respuesta fotosintética bajo condiciones de luz menores o cercanas al E_k (Figura 23).



Figura 20: Curvas P-E de hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. A) Primavera 2005; B) Verano 2005. Cada curva (n=2) representa el ajuste (R^2 >0.95) al modelo de la tangente hiperbólica descrito en materiales y métodos.



Figura 21: Curvas ETR-E de hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. A) Primavera 2005; B) Verano 2005. Cada curva (n=4) representa el ajuste (R^2 >0.95) al modelo de la tangente hiperbólica descrito en materiales y métodos.



Figura 22: Máxima eficiencia cuántica operativa del PSII medida como F_v/F_m en primavera (símbolo cerrado) y en verano (símbolo abierto). Cada punto representa la media (n=4) ± 1 SD para cada profundidad y estación.

Disipación de la energía del PSII. Con respecto a la capacidad de disipación térmica medida como NPQ, durante el verano en las hojas de superficie se registró una disminución de esta capacidad, encontrando valores cercanos a 6, lo que representa una disminución de NPQ en superficie del 40% (Figura 24) con respecto a los valores encontrados en primavera (Colombo-Pallotta et al. 2006). Esto está directamente relacionado con la disminución del ΣXC / Chl *a* ya que en esta especie existe una relación entre la concentración de Zea y la inducción de NPQ (capítulo 4 de esta tesis). De igual forma, las hojas colectadas a 6 m de profundidad durante el verano mostraron una

reducción del 50% de esta capacidad con respecto a los valores de primavera, pasando de valores de NPQ de 5.5 en primavera a valores de NPQ de 2.5 en verano. Finalmente, las hojas colectadas a 18m de profundidad tuvieron valores similares de NPQ en ambas estaciones, aunque en estas hojas la capacidad fue la menor en comparación con otros estratos, con valores NPQ de hasta 1.2 (Figura 24).



Figura 23: Relación entre ETR y evolución de oxígeno para irradiancias menores a 500 μ moles fotones•m⁻²•s⁻¹ en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades, en primavera (símbolo cerrado) y en verano (símbolo abierto). El ajuste al modelo lineal fue R²>0.95 y la ecuación se presenta en la grafica.



Figura 24: Inducción de NPQ en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. A) Primavera 2005. B) Verano 2005. Cada punto (n=4) representa la media ± 1 SD para cada profundidad y estación.

III.5. DISCUSIÓN

Al igual que en primavera, durante el verano la actividad fotosintética en *M*. *Pyrifera* estuvo regulada diferencialmente en función de la profundidad, ya que las hojas de distintas profundidades mostraron diferencias en su composición pigmentaria, en sus tasas fotosintéticas y en su capacidad de disipación térmica. Esto sugiere que independientemente del ciclo de crecimiento estacional, esta especie tiene la capacidad de regular su actividad fotosintética en la escala espacial, aunque en primavera el gradiente aclimatativo fue proporcionalmente más marcado que en verano.

En cuanto a la regulación en la escala temporal, los parámetros que no mostraron diferencias significativas entre primavera y verano fueron la concentración de carbono y nitrógeno en el tejido, la absortancia promedio, la concentración de pigmentos constitutivos y accesorios, la tasa de transporte de electrones y Fv/Fm. De manera contraria, la absorción relativa a 310nm, la capacidad fotosintética y NPQ se redujeron un 30-40% durante el verano. Estos resultados indican que durante el verano la disminución de la capacidad fotosintética podría estar relacionada con una disminución en la capacidad fotoprotectora.

Con relación a la fotoprotección en la región del PAR, los valores de inducción de NPQ en superficie bajaron de valores cercanos a 10 en primavera a valores cercanos a 6 en verano, lo cual estuvo relacionado con una menor concentración de pigmentos fotoprotectores (*XXC*/ Chl *a*) durante el verano, ya que en esta especie 1 mol de Zea induce 1 unidad de NPQ (García-Mendoza y Colombo-Pallotta, en prensa). Pero de manera interesante, aunque el pool total disminuyó en verano, el estado de de-epoxidacion fue mayor. Esto podría estar indicando que durante el verano los organismos sentían mayor

presión fisiológica, y por esta razón una mayor proporción del pool se encontraba en la forma disipadora.

Con relación a la fotoprotección en la región del UV, durante el verano la Abs₃₁₀ disminuyó considerablemente en los estratos superiores, lo que puede ser relacionado con una disminución en la capacidad para acumular compuestos que absorben en el UVB como aminoácidos del tipo micosporina, que en otras *Laminariales* se ha documentado que constituyen una respuesta fotoprotectora importante (Apprill y Lesser 2003).Un aumento del 10% en la dosis de UV provoca una disminución del 50% de la tasa fotosintética en *M. pyrifera* (afecta tanto a P_{max} como a α) y una reducción en la eficiencia de la transferencia de la energía desde los sistemas colectores de luz al PSII (Clendennen et al. 1996). En otras *Laminariales* se ha reportado la disminución del 20-40% de la tasa fotosintética y del 40% de F_v/F_m luego de 48 hs de exposición a UVA+UVB (Gómez y González 2005). A largo plazo, altas dosis de UV pueden inducir un alto grado de fotoinactivación, fotodaño e inhibición de la fijación de carbono y se ha sugerido que puede alterar los mecanismos de incorporación de carbono mediante inhibición de la enzima anhidrasa carbónica (AC) cambios en la afinidad de los transportadores de HCO₃⁻ o cambios en la permeabilidad de la membrana (Franklin et al. 2003).

Los resultados de la composición elemental del tejido indican que el "síndrome de verano" en Baja California podría estar relacionado con una limitación diferente a la nutricional, como ha sido previamente sugerido para las poblaciones de *M. pyrifera* en California (Jackson 1977, Gerard 1984, North y Zimmerman 1984, Dean y Jacobsen 1986) ya que la concentración de nitrógeno en el tejido no disminuyó en verano ni se encontró

dentro de los valores considerados como críticos para la especie. Particularmente en este sitio de Baja California, Ladah y Zertuche-Gonzalez (2004) han propuesto que las ondas internas y las corrientes de marea podrían traer nutrientes por debajo de la termoclina hasta la zona basal de estos organismos. Estos pulsos cortos de nutrientes generados por movimientos internos del mar pueden ser suficientes para reabastecer el nitrógeno en el tejido (Ladah y Zertuche-Gonzáles 2004), lo cual es particularmente importante para especies de kelps que tienen la capacidad de translocar compuestos orgánicos e inorgánicos (Manley 1984).

La relación C:N se mantuvo constante a lo largo del organismo en ambas estaciones, oscilando alrededor de 12.5 durante primavera y alrededor de 11 durante verano, lo cual sugiere un balance entre ácidos nucléicos, lípidos, carbohidratos y proteínas (Raven et al. 2004) durante ambas estaciones. Si bien esta relación ha sido ampliamente utilizada como indicador del estado nutricional de micro y macroalgas (Raven et al. 2004), ésta no discrimina entre el carbono y el nitrógeno que proviene de distintos constituyentes celulares como proteínas, polisacáridos o lípidos. Debido a lo anterior, se pueden tener razones C:N similares aunque la proporción relativa de cada uno de estos constituyentes pude ser muy diferente. Particularmente la concentración de proteínas totales es crítica para el correcto funcionamiento celular debido a que son componentes indispensables del aparato fotosintético, tanto desde el punto de vista estructural como enzimático (Blankenship 2002). La mayor concentración de proteínas totales en *Macrocystis pyrifera* fue hallada en las hojas de superficie, disminuyó hasta los 6 m de profundidad y permaneció constante en las hojas más profundas (Figura 25). Entre estaciones, este

parámetro no fue significativamente diferente (ANOVA p=0.294) lo cual junto con la similitud entre estaciones de concentración de nitrógeno en el tejido refuerza la hipótesis de que durante el verano los organismos colectados en Baja California no presentaban signos de estrés nutricional.



Figura 25: Concentración de proteínas totales en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades durante primavera (símbolo cerrado) y durante verano (símbolo abierto). Cada punto (n=3) representa la media para cada profundidad y estación.

Pero si durante el verano no hubo signos claros de limitación nutricional, ¿cuál fue la causa de la reducción en la capacidad fotosintética? En primer lugar no puede ser atribuida a una disminución en la concentración de pigmentos encargados de captar o

transferir la energía de excitación, ya que tanto los pigmentos constitutivos (Chl *a* y β -caro) como los pigmentos accesorios (Chl *c* y Fuco) no mostraron diferencias significativas entre estaciones. En segundo lugar, el haber encontrado altas tasas de transporte de electrones durante verano implica que la fotosíntesis no estuvo limitada a nivel del PSII. Posiblemente la diferencia entre ETR-E y P-E se deba al incremento de otras vías metabólicas que consuman oxígeno como por ejemplo la incorporación de nitrato, o a una limitación en la etapa oscura de la fotosíntesis. En plantas se ha documentado que el aumento en la dosis de UVB puede provocar una disminución de hasta el 70% en la actividad de Rubisco después de 3 días de tratamiento (Jordan et al. 1992).

La respuesta aclimatativa de *M. pyrifera* durante una condición ambiental estresante (verano) es la siguiente: las respuestas fotoprotectoras disminuyeron tanto en el PAR como en el UV especialmente en las hojas de superficie. Esto estuvo acompañado por una reducción de hasta un 40% de la capacidad fotosintética de los organismos. Sin embargo los resultados de la composición elemental del tejido y la concentración de proteínas permiten asumir que no hubo signos de estrés nutricional. La disminución de la capacidad fotosintética parece estar relacionada con un aumento en otras vías metabólicas que consumen oxígeno o con limitación en la etapa oscura de la fotosíntesis, y podría ser a nivel de la actividad de Rubisco a una disminución en la capacidad de incorporación de carbono inorgánico o transporte del mismo dentro de la célula (vía la anhidrasa carbónica intra o extra celular).

III.6. CONCLUSIÓN

La falta de diferencias entre primavera y verano en la composición elemental y en la concentración de proteínas sugieren que el deterioro de verano de organismos adultos de *Macrocystis pyrifera* en este sitio de surgencias de Baja California podría no está causado por estrés nutricional. El deterioro podría estar causado por una reducción en la capacidad fotoprotectora tanto en la región del PAR como del UV. Así mismo, la relación entre ETR-E y P-E permiten hipotetizar que en verano la fotosíntesis no estuvo limitada a nivel del PSII. La reducción en la capacidad fotosintética en verano podría estar relacionada con un aumento de otras vías metabólicas que consumen oxígeno o a una limitación en las reacciones de la etapa oscura de la fotosíntesis.
Capítulo 4

Caracterización del mecanismo que controla la disipación no fotoquímica en

Macrocystis pyrifera.

IV.1. RESUMEN

La capacidad de disipación térmica medida como NPQ fue caracterizada en la especie Macrocysytis pyrifera (L) C. Agardh. Se realizó un análisis comparativo de la inducción de NPQ y la actividad del ciclo de las xantofilas (XC) en hojas colectadas a diferentes profundidades. Así mismo se realizaron mediciones en presencia del inhibidor dithiothreitol (DTT) y del desacoplador NH₄Cl. El grado de inducción de NPQ estuvo relacionado con la cantidad de zeaxantina sintetizada en alta luz a través del ciclo de las xantofilas. Por lo tanto, altos valores de NPQ (cercanos a 10) fueron alcanzados en las hojas de superficie mediante la acumulación de una alta concentración de zeaxantina. Los pigmentos del XC fueron 3 veces más abundantes en superficie que en hojas colectadas a 18 m de profundidad. La inhibición de la síntesis de zeaxantina con DTT redujo el 80% la inducción de NPQ en las hojas de superficie mientras que en las hojas basales el DTT produjo un efecto mínimo. Así mismo, hubo una respuesta diferencial entre las hojas de superficie y basales en presencia de NH₄Cl, ya que sólo en las hojas de superficie se detectó una lenta relajación luego de la adición del desacoplador que provoca la destrucción del gradiente de protones (ΔpH). Estos resultados indican que el gradiente de protones no induce por sí mismo el NPQ. Por lo tanto, en contraste con plantas superiores, en M. pyrifera el NPQ puede ser explicado principalmente por la síntesis de zeaxantina. La necesidad de este

pigmento para la fotoprotección fue evidenciada por la lenta recuperación del máximo potencial fotoquímico (F_v/F_m) en las muestras de superficie tratadas con DTT y en las hojas basales, luego de un estrés con alta luz.

IV.2. INTRODUCCIÓN

La luz es un recurso que presenta variabilidad tanto en la escala temporal como espacial (Kirk 1992), lo cual provoca que los organismos autótrofos hayan desarrollado la capacidad de regular sus antenas (Falkowski y Raven 1997). Bajo condiciones de limitación por luz las antenas incrementan la cantidad de energía transferida a los centros de reacción, pero cuando la luz es excesiva en relación a la capacidad de la célula de utilizar los productos de la etapa clara de la fotosíntesis, los componentes de esta fase no tienen donde canalizar la energía que acumulan. Esto puede causar daño celular principalmente debido a que la clorofila *a* se encuentra más tiempo excitada, lo que provoca que aumente la probabilidad de que reaccione con oxígeno formando radicales altamente oxidantes como singuletes de oxígeno (Falkowski y Raven 1997).

Uno de los mecanismos más importantes de fotoprotección presentes en algas y plantas superiores es la disipación del exceso de energía en forma de calor, el cual ocurre en la antena o en el centro de reacción de fotosistema II (PSII) (Pfündel y Bilger 1994, Müller et al. 2001, Horton y Ruban 2005). Una manera de medir la disipación de este exceso de energía es mediante el proceso de "quenching" (disipación) de la clorofila *a* independiente de la fotoquímica (NPQ; Non Photochemical Quenching). Hay varios componentes dentro de NPQ, como qE, qI, estados de transición y fotoinactivación del PSII (Horton et al. 1991). Sin embargo, el rol fotoprotector sólo se le ha asignado a la parte de disipación térmica de NPQ (Müller et al. 2001), llamado qE o disipación de alta energía (Horton et al 1991), siendo uno de los procesos más importantes el del ciclo de las xantofilas (XC), que consiste en la de-epoxidación del carotenoide violaxantina (Vio) para

convertirse en zeaxantina (Zea) vía el pigmento intermediario anteraxantina (Ant) (Yamamoto et al. 1962).

El mecanismo molecular exacto del ciclo de las xantofilas en relación a NPQ no está bien entendido. En plantas superiores y en algas verdes se necesitan tres elementos para la expresión completa de NPQ: la síntesis de Zea vía el XC (Demmig Adams y Adams III 1996), la formación de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide (ApH) (Noctor et al. 1991, Horton et al. 1996) y la presencia de la subunidad PsbS en la antena del PSII (Li et al. 2000). El modelo de control de NPQ propuesto para plantas superiores y algas verdes (revisado en Govindjee 2002, Müller et al 2001, Horton y Ruban 2005, Niyogi et al. 2005) indica que la acidificación del lumen durante la etapa de alta luz (formación de ΔpH) induce la protonación de uno o más complejos de la antena del PSII, especialmente PsbS. La protonación causa cambios conformacionales en la antena que promueven la disipación térmica (fase de inducción rápida). De manera paralela a la protonación, el bajo pH en el lumen activa la síntesis de Zea, quien se une a las proteínas protonadas y forma un complejo de disipación (fase lenta). Aunque existe un consenso en la secuencia de eventos descritos anteriormente, aún continúa el debate sobre si la Zea es sólo un activador alostérico (Horton et al. 1991) o si está directamente involucrado en el proceso de disipación de la clorofila *a* (Frank et al. 1994, Ma et al. 2003).

En algas cafés se ha documentado la importancia de NPQ y el XC en la fotoprotección, ya que las especies incapaces de expresar eficientemente los mecanismos fotoprotectores están restringidas a hábitats profundos, mientras que las que pueden activamente expresar un ciclo de las xantofilas proliferan en ambientes someros (Rodrigues et al. 2002). Dado que las algas café expresan el mismo XC que las plantas superiores (Vio-Ant-Zea), se supone que el mecanismo que controla NPQ es el mismo para ambos grupos. Sin embargo, las diatomeas (que pertenecen al mismo Filum) muestran diferencias a la inducción de NPQ, mientras que estados de transición es un mecanismo ausente (Owens y Wold 1986). Las diatomeas, aunque son capaces de expresar el ciclo de las xantofilas Vio-Ant-Zea, también pueden expresar (y lo hacen preferencialmente) el ciclo de las xantofilas de didinoxantina (DDx) a diatoxantina (DTx; Lohr y Wilhelm 1999). La tasa de epoxidación de los pigmentos del XC es mucho mayor en diatomeas que en plantas (Olaizola et al. 1994, Lavaud et al. 2004). NPQ puede alcanzar valores de 10 en diatomeas (Lavaud et al. 2002a, Ruban et al. 2004) mientras que los típicos valores de NPQ en plantas no suelen superar los 4 (Demmig Adams y Adams III 1996). En contraste con plantas, las diatomeas son altamente sensibles a los inhibidores del XC. El dithiothreitol (DTT), un inhibidor de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE), reduce significativamente NPQ (Olaizola et al. 1994, Lavaud et al. 2002b).

En contraste a plantas superiores, esta súper capacidad para disipar el exceso de energía en diatomeas presenta una lenta reversibilidad en presencia de un desacoplador como el cloruro de amonio (NH₄Cl; Ruban et al. 2004). Estas diferencias indican que probablemente el mecanismo de disipación térmica en Cormofitas y especialmente en Heterokontofitas es diferente al de plantas superiores. En contraste a las diatomeas, *Macrocystis pyrifera* sólo presenta el ciclo de las xantofilas Vio a Zea y una gran cantidad de pigmentos fotoprotectores (ΣXC) junto con valores de NPQ cercanos a 10 en hojas superficiales (Capítulo 2 de esta tesis).

Para conocer el mecanismo de disipación térmica en esta especie se colectaron hojas de diferentes profundidades para medir su capacidad de NPQ y su respuesta con respecto a la fotoprotección en tejido aclimatado a diferentes condiciones lumínicas. Los resultados se discuten en el contexto del modelo propuesto para plantas superiores.

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Material de estudio. Las muestras de *Macrocystis pyrifera* fueron colectadas de la zona submareal del manto ubicado en la localidad Campo Kennedy (31.70176° N; 116.68356° W) cercano a la ciudad de Ensenada, Baja California, México. Esta localidad se encuentra en el rango medio de distribución de la especie en el Hemisferio Norte. En base al diámetro del grampón (North 1971a) se muestrearon plantas de 2 años de edad durante la estación de primavera (31 de marzo y 12 de mayo) y verano (12 de julio y 5 de septiembre) del 2005. Mediante buceo autónomo se colectaron hojas completas y sanas de entre 1 y 3 plantas por muestreo, a intervalos de profundidad constantes, desde la superficie hasta el grampón ubicado a una profundidad de 18 m. Para cada profundidad se colectaron 4 hojas completas para cada una de las profundidades (0 metros equivalente a superficie, 3, 6, 9, 12, 13.5, 15 y 18 metros).

Con la ayuda de un sacabocados se cortaron discos de tejido de 1.2 cm de diámetro a unos 10 cm del nematocisto sobre el eje central de cada una de las hojas libres de epifitas visibles. Los discos fueron mantenidos por menos de 24 horas en matraces de 250 ml con 200 ml de agua de mar filtrada, en un incubador con un foto período 12:12 a 17 \pm 0.5 °C con aireación vigorosa y una intensidad lumínica de 75 µmoles de fotones•m⁻²•s⁻¹ provistos por una lámpara fluorescente de luz fría de 54 watts (Tecno Life). La irradiancia fue medida con un irradiómetro LI-1000 (LI-COR, Inc.) y expresada en PAR (400- 700 nm). Los discos de la misma planta y la misma profundidad fueron mantenidos en el mismo Erlenmeyer, y los discos fueron tomados al azar para realizar cada una de las mediciones. *Cuantificación de pigmentos.* La cuantificación de pigmentos se realizó en 5 discos por cada profundidad mediante Cromatografía Líquida de alta Presición (HPLC), como se describe en Van Heukelem y Thomas (2001), modificado en el perfil de abastecimiento de solventes (%B, min): 5%, 0 min; 5% 5 min; 95% 22 min; 95%, 27 min; 5% 30 min. Las extracciones se realizaron en 3 ml de acetona fría previa molienda del tejido en nitrógeno líquido. Los extractos fueron mantenidos por 1 hora en oscuridad a 4 °C, clarificados por centrifugación a 12000 xg por 5 minutos y almacenados a -20 °C por menos de 24 horas hasta el análisis por HPLC. El equipo de HPLC (Shimadzu AV-10) estaba equipado con una columna de fase reversa Zorbax ODBC-8 (4.6 x 150 mm, 3.5 μM tamaño de partícula). El protocolo fue calibrado y los factores de calibración se obtuvieron de estándares puros de clorofilas y carotenoides (DHK, Inc. Suiza).

Mediciones de fluorescencia de clorofila a. Las mediciones de fluorescencia de clorofila *a* para cada disco se realizaron con un fluorómetro de amplitud modulada (Diving-PAM; Heins Walz, Germany). La nomenclatura y los parámetros calculados siguen lo reportado por Van Kooten y Snel (1990). Para las determinaciones de máxima eficiencia fotosintética del fotosistema II (PSII), los discos fueron adaptados a oscuridad por 5 minutos y la fluorescencia basal (F_0) se obtuvo al colocar la sonda del fluorómetro a una distancia de 10 mm y prender la luz de medición, mientras que la Fluorescencia máxima (F_m) se determinó dando un pulso de 0.8 segundos de luz actínica saturante.

La disipación no fotoquímica de la clorofila *a* (NPQ) se midió en discos expuestos por periodos de 30 minutos a intensidades lumínicas de 1560 μ moles fotones•m²•s⁻¹ en sistemas abiertos o cerrados de agua de mar con temperatura controlada a 17 °C. NPQ fue

monitoreado al colocar la fibra óptica del PAM en un ángulo de 60° en relación a la cara del disco expuesta a la luz. La geometría se mantuvo constante durante cada medición (fase de alta luz y fase de recuperación) y con intervalos de 1 minuto se aplicó un pulso de luz saturante (0.8 seg.) y NPQ se calculó como:

$$NPQ = (F_{m} - F'_{m})/F'_{m}$$
(14)

donde F'_m es la máxima emisión de fluorescencia medida en alta luz (inducción de NPQ) u oscuridad luego de alta luz (relajación de NPQ).

Inducción del ciclo de las xantofilas. Se midió el cambio en la concentración de los pigmentos relacionados con el ciclo de las xantofilas, Vio, Ant y Zea luego de exponer varios discos de la misma hoja a condiciones de luz saturante (como se describió anteriormente) por diferentes periodos de tiempo. Cada disco fue previamente aclimatado a oscuridad por 1 hora y luego de cada tratamiento los discos fueron congelados y almacenados en nitrógeno líquido hasta su análisis. El estado de de-epoxidación de los pigmentos del XC se calculó como:

$$DPS = [Zea] + 0.5 [Ant] / \Sigma XC$$
(15)

donde Zea representa la concentración de zeaxantina, Ant la de anteraxantina y ΣXC representa la suma de los pigmentos relacionados con el ciclo de las xantofilas (Vio, Ant y Zea). La constante de de-epoxidacion de la Vio (k) se calculó al ajustar los datos de cambio de Vio en el tiempo que estuvo expuesta a alta luz (t) utilizando el siguiente modelo exponencial (Olaizola et al 1994):

$$\left[\operatorname{Vio}_{t} - \operatorname{Vio}_{f}\right] = \left[\operatorname{Vio}_{i} - \operatorname{Vio}_{f}\right] e^{-kt}$$
(16)

donde i y f representan la concentración de Vio en los discos aclimatados a oscuridad y luego de estar expuestos a 30 minutos de alta luz, respectivamente.

<u>Tratamiento con inhibidores</u>. Se monitoreó el efecto del DTT sobre la inducción de NPQ en discos de hojas colectadas a diferentes profundidades. Estos discos, al igual que los controles fueron adaptados por 1 hora a oscuridad, pero sólo para los discos del tratamiento con DTT a los 30 minutos de esta aclimatación se les agregó DTT a una concentración final de 1mM y se los mantuvo durante los 30 minutos restantes en estas condiciones. Tanto el tiempo como la concentración de DTT fueron efectivos para inhibir la de-epoxidación sin causar efectos secundarios en los discos. Luego del tratamiento con DTT los discos fueron sometidos a condiciones de alta luz como se describió anteriormente.

Asimismo, se investigó el efecto que tiene la ruptura del gradiente de protones a través de la membrana tilacoide sobre la disipación no fotoquímica, utilizando un desacoplador, en este caso cloruro de amonio (NH₄Cl). Los discos fueron expuestos a las condiciones de luz anteriormente mencionadas en una cámara de acrílico y mantenida a 17 °C por recirculación en un sistema cerrado. Luego de 20 minutos de comenzado el tratamiento con alta luz se les agregó el desacoplador a una concentración final de 100 mM como se describe en Ruban y colaboradores (2004). Una vez adicionado el NH₄Cl se mantuvieron en luz por 10 minutos más para completar el periodo de alta luz de 30 minutos. Adicionalmente, algunos discos fueron incubados con el desacoplador 10 minutos antes del tratamiento con alta luz.

Experimentos de fotoinhibición. La recuperación de F_v/F_m luego del estrés con alta luz se monitoreó en discos provenientes de diferentes profundidades. Estos discos fueron tratados

como se describe para la inducción del ciclo de las xantofilas y luego de finalizado el tratamiento con alta luz se mantuvieron en luz baja (25-30 μ moles fotones•m⁻²•s⁻¹) tanto para los discos control como para los discos tratados con DTT. La tasa de recuperación se calculó ajustando los datos al modelo propuesto por Hanelt (1998):

$$Y = 1 - A * \exp^{\left(-at\right)} + B * \exp^{\left(-bt\right)}$$
(17)

donde Y es la recuperación de F_v/F_m en relación al valor que este parámetro presentó antes de la exposición a alta luz. *A* es la fase de recuperación rápida con una constante de tiempo *a* y la amplitud de la recuperación lenta es descrita por *B* con una constante de tiempo *b*. $t_{1/2}$ representa el tiempo que tarda en alcanzar el 50% de la recuperación máxima.

<u>Procesamiento de datos y análisis estadístico</u>. Los cálculos de los diferentes parámetros descritos se obtuvieron ajustando los datos a los modelos propuestos mediante el algoritmo de Marquardt-Levenberg (Sigma Plot software, Jandel SSP scientific). Los análisis estadísticos paramétricos fueron realizados con el paquete Statistica 6.0, utilizando un valor de significancia de alfa de 0.05.

IV.4. RESULTADOS

Análisis de la disipación de la fluorescencia de la clorofila a. Durante la estación de primavera se caracterizó la disipación de la fluorescencia de la clorofila *a*, con valores de hasta 10 (Colombo-Pallotta et al. 2006). Por lo tanto, para caracterizar el mecanismo que controla NPQ en *Macrocystis pyrifera* se realizó el análisis de disipación en hojas colectadas a diferentes profundidades durante la estación de verano. La Figura 26 muestra los resultados representativos de 3 profundidades para hojas colectadas durante la estación de verano. Las hojas mostraron una clara diferencia en los valores de NPQ entre la inducción en alta luz y la relajación en oscuridad. Los máximos valores de disipación de la fluorescencia de la clorofila *a* los presentaron las hojas del dosel, alcanzados en el menor $t_{1/2}$ (Figura 26A). Los valores de F'_m disminuyeron hasta valores por debajo de F₀, razón por la cual se obtuvieron altos valores de NPQ. Durante los muestreos realizados en verano los valores máximos de NPQ fueron de 5-6 (capítulo 3 de esta tesis). La disipación de F'_m disminuyó con la profundidad y los mínimos valores se registraron en muestras basales (9-18 m de profundidad) (Figura 26C).

La relajación en la oscuridad de la disipación generada durante el periodo de alta luz, fue más lenta que la inducción de este proceso en las muestras del dosel y del subdosel (Figura 26A y 26B), mientras que en las hojas basales el proceso de relajación no fue evidente (Figura 26C). De manera paralela a la relajación de la disipación de F_m , la fluorescencia variable (F_v) también mostró una recuperación durante el periodo de oscuridad después del estrés lumínico. Los valores de recuperación de F_v fueron máximos en las hojas del dosel y disminuyeron conforme al aumento de la profundidad (Figura 26).



Figura 26: Análisis de disipación de la fluorescencia de la clorofila *a* en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. La fluorescencia se midió en discos previamente aclimatados a oscuridad por 1 hora y expuestos por 30 minutos a luz actínica saturante (1560 µmoles fotones•m²•s⁻¹) y posteriormente durante 30 minutos en recuperación en oscuridad. La fluorescencia máxima se determinó aplicando un pulso corto (0.8 s) de luz saturante cada minuto. A) Muestra colectada en superficie. B) Muestra colectada a 6 m de profundidad. C) Muestra colectada a 18m de profundidad.

<u>NPQ y actividad del XC</u>. Durante la exposición de los discos a la condición de alta luz se evidenció la conversión de Vio a Ant y Zea. La cantidad y la tasa de síntesis de Ant y Zea durante 30 minutos de exposición a alta luz estuvieron relacionadas con la posición de las hojas en la columna de agua (Tabla V), ya que las hojas del dosel presentaron la mayor cantidad de pigmentos del XC (Σ XC), el mayor estado de de-epoxidación (DPS) y la mayor tasa (*k*) de de-epoxidación de la Vio. Las hojas del subdosel presentaron valores intermedios en estos parámetros mientras que las hojas basales presentaron los mínimos valores (Tabla V). Así mismo no hubo síntesis *de novo* de estos carotenoides (datos no mostrados) al menos durante los 30 minutos de alta luz.

DPS indica la cantidad relativa de síntesis de pigmentos fotoprotectores relativos al XC, y este parámetro mostró una relación lineal con la inducción de NPQ (R^2 = 0.79), mientras que la producción de Zea dependió del tamaño del pool (Σ XC) y del estado de deepoxidación. Debido a que Σ XC y DPS cambiaron con la profundidad, la cantidad de Zea sintetizada fue diferente entre profundidades. Las hojas del dosel mostraron una mayor síntesis de Zea en comparación con otras profundidades. Por lo tanto, la concentración de Zea mostró una mayor correlación con NPQ que con DPS (R^2 = 0.90). La Figura 27 muestra la relación entre la concentración de Zea medida en diferentes momentos desde el inicio del tratamiento con alta luz y el valor de NPQ asociado a ese momento para hojas provenientes de todas las profundidades analizadas. El ajuste de los datos a un modelo de regresión lineal simple (R^2 = 0.84) reveló que la pendiente no mostró diferencias significativas de 1 y el intercepto de 0 (prueba t-student, p<0.05). La variabilidad en esta relación podría deberse principalmente a la heterogeneidad entre las hojas colectadas a diferentes profundidades.

Tabla V: Características pigmentarias en relación a la fotoprotección en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. ΣXC representa la suma de Vio, Ant y Zea normalizado por la concentración de Chl *a. K* representa la mayor tasa de de-epoxidación de la Vio. DPS inicial representa el valor de de-epoxidación al inicio del tratamiento y DPS máx representa el máximo valor de de-epoxidación durante el tratamiento. DPS máx + DTT representa el máximo valor de de-epoxidación en los discos tratados con DTT como se describe en materiales y métodos. Los valores representan la media (n=4) ± 1 DS. Las diferencias estadísticas entre profundidades se muestran con diferentes superíndices (t-student test, p>0.05).

Profundidad	ΣΧC	k	DPS inicial	DPS máx	DPS
(m)	(mM mM chla ⁻¹)	(min ⁻¹)			máx +
					DTT
0	0.25 ± 0.07^{a}	0.48	0.08 ±0.02	0.36 ±0.06 ^a	0.09
3	0.22 ± 0.04^{a}	0.32	0.08 ±0.01	0.20 ± 0.06^{a}	
6	0.12 ±0.05 ^b	0.28	0.04 ±0.01	0.18	0.03
9	0.11 ±0.01 ^b	0.10	0.06 ± 0.02	0.12 ± 0.04^{b}	
15	0.10 ± 0.01^{b}	0.15	0.07 ±0.01	0.10 ± 0.05^{b}	
18	0.10 ± 0.01^{b}	0.08	0.05 ± 0.03	0.11 ±0.03 ^b	0.04

En la Figura 27 se incluyeron los datos de las muestras mantenidas en oscuridad luego de la exposición a la luz. Bajo esta condición se desarrolla la reversibilidad del XC (proceso de epoxidación del Zea) y los datos de estas mediciones siguieron la relación NPQ-Zea, aunque con baja concentración de Zea todavía permanece algo de NPQ (Figura 27). Por lo tanto, el NPQ residual puede ser atribuido a la reducción en la emisión de la fluorescencia debido a la inactivación del PSII (ver la sección de fotoinhibición) o a la presencia de Ant no epoxidada a Vio en esas muestras.



Figura 27: Relación entre NPQ y la concentración de Zea en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades durante el periodo de alta luz en experimentos realizados con muestras colectadas en primavera y verano (círculos abiertos). Se incluyen los resultados obtenidos durante el periodo de recuperación en oscuridad (círculos cerrados). La línea continua representa el ajuste al modelo de regresión lineal simple (r^2 =0.84), mientras que las líneas punteadas representan el intervalo de 95% de confianza. *Efecto del DTT en NPQ*. Para comprender el mecanismo que controla NPQ en *M. pyrifera*,

específicamente el rol de la Zea, se inhibió la conversión de los pigmentos del XC al incubar los discos de diferentes profundidades con dithiothreitol (DTT). El DTT es un inhibidor inespecífico de la VDE que puede causar efectos secundarios (Pfündel y Bilger 1994). Sin embrago, no se detectaron efectos negativos ya que en los discos de tejido la

incubación con el inhibidor no causó un aumento en la fotoinhibición, no hubo reducción del valor de F_v/F_m antes de comenzar el tratamiento con alta luz ni hubo cambios en los valores de evolución de oxígeno en las muestras tratadas con respecto a los controles (datos no mostrados).

Las hojas superficiales que presentaron un alto NPQ suprimieron el 80% de la disipación en presencia de DTT (Figura 28A, Tabla V). En contraste, el efecto del DTT fue mínimo o ausente en hojas basales que tuvieron también una baja capacidad de realizar NPQ (ver capítulo 2). El DTT también causó un efecto en la relajación de NPQ después del tratamiento con alta luz. Para las hojas superficiales, el DTT suprimió completamente la relajación (Figura 28B) y de manera general, el efecto del DTT para muestras de todas las profundidades fue llevar los valores de NPQ al mínimo. Por lo tanto, todas las muestras tratadas con DTT presentaron características de inducción y de relajación de NPQ similares a las de las hojas basales, que en los discos control mostraron los mínimos valores de NPQ y la menor actividad del XC.



Figura 28: Efecto del DTT en la capacidad de realizar NPQ en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades durante el verano. A) Tratamiento control. B) tratamiento con DTT como se describe en materiales y métodos.

<u>Efecto del NH₄Cl en NPQ.</u> Las hojas colectadas de diferentes profundidades mostraron respuestas diferentes a la adición de NH₄Cl después de 20 minutos de tratamiento con alta luz. Para las hojas superficiales se observó que la mayor parte de la disipación de la fluorescencia se relajó lentamente luego de la adición de NH₄Cl (Figura 29A). Este efecto

disminuyó conforme a la profundidad en la cual se obtuvieron los discos (Figura 29B), mientras que para las hojas basales este desacoplador no tuvo ningún efecto (Figura 29C).



Figura 29: Efecto del desacoplador NH₄Cl (la flecha indica el momento en que fue agregado) en la capacidad de realizar NPQ en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades. A) Hojas de superficie. B) Hojas de 6 m C) Hojas de 18m.

La relajación de la disipación de la fluorescencia luego de la adición de NH₄Cl parece estar correlacionada con el grado de expresión de NPQ relacionado con la actividad del XC. Para investigar si había una parte de NPQ asociada solamente a la formación del Δ pH, se realizaron mediciones de NPQ en muestras tratadas con NH₄Cl antes de iniciar el estrés por alta luz. Se esperaba que el NH₄Cl suprimiera completamente la disipación de F'_m. Sin embrago, se observó una pequeña inducción de NPQ en las muestras tratadas con NH₄Cl antes del tratamiento con alta luz (Figura 30A). A los 15 minutos de alta luz el grado de disipación en las muestras tratadas con NH₄Cl fue similar al de las muestras tratadas con DTT (NPQ =0.48 y NPQ =0.63 respectivamente; Figura 30B). Así mismo, estos valores son comparables a la disipación que se midió en las hojas basales (NPQ =0.55; Figura 27A). Las muestras incubadas con NH₄Cl no sintetizaron Zea durante el periodo de alta luz (DPS= 0.05, [Zea]= 0.007 mol•mol chl a^{-1}) y por lo tanto la disipación fue mínima (Figura 30B).

En *Macrocystis pyrifera* parecería que la disipación no fotoquímica (NPQ) es independiente del ΔpH comparado con plantas superiores y microalgas verdes y estaría principalmente relacionada con la síntesis de Zea. El NPQ residual detectado en las hojas basales y el los discos tratados con DTT podría estar asociado a una reducción de F_m independiente del XC, como inactivación del PSII. El efecto del NH₄Cl en la relajación de NPQ parecería estar correlacionado con la conversión de Zea a Vio (reverso del XC) ya que probablemente la actividad de la enzima violaxantina de-epoxidasa se pierde luego de la adición del desacoplador.



Figura 30: A): Efecto de la adición de NH_4Cl antes de iniciar el periodo de alta luz en la capacidad de realizar NPQ en hojas superficiales de *Macrocystis pyrifera*. B) Efecto del doble tratamiento de discos de tejido aclimatados durante 1 hora a DTT y que adicionalmente recibieron NH_4Cl a la mitad del tratamiento con alta luz.

Para corroborar esta idea se midió la cinética de epoxidación de la Zea en oscuridad luego del tratamiento con alta luz y se comparó con el efecto en la concentración de los pigmentos del XC de los discos a los que se les agregó NH₄Cl durante la alta luz. En las hojas superficiales, la concentración de Zea formada durante el periodo de 20 minutos de alta luz disminuye rápidamente en oscuridad (Figura 31). La reacción de epoxidación reestablece en 30 minutos la concentración de Zea a valores cercanos a los que presentaba antes del estrés con alta luz (Figura 31).



Figura 31: Epoxidación de la Zea en oscuridad luego de exponer las hojas de *M. pyrifera* de superficie durante 20 minutos a alta luz (línea continua y símbolo cerrado). La reducción en la concentración de Zea en luz luego de la adición de NH_4Cl esta representada por la línea discontinua y los símbolos grises. La línea contínua representa el mejor ajuste a un modelo de disminución exponencial. La línea punteada representa la cantidad de Zea presente en oscuridad antes del tratamiento con luz.

La recuperación de la fotoinhibición está relacionada con la actividad de XC. Con la finalidad de documentar la importancia de la formación de Zea a través del XC como un mecanismo fotoprotector, se midió la recuperación de la eficiencia quántica operativa máxima del PSII (F_v/F_m) luego de un estrés con alta luz en muestras colectadas a diferentes profundidades. Las muestras superficiales mostraron la mayor tasa y la más rápida recuperación en comparación a las muestras provenientes de las demás profundidades (Figura 29). Para las hojas del dosel, la fase rápida (A) representó más del 90% de la recuperación de la máxima eficiencia del PSII. Por lo tanto, F_v/F_m tuvo una recuperación con una $t_{1/2}$ de 5 minutos al cambiar la condición de alta luz a la de recuperación (Figura 32A).

La importancia relativa de la fase de recuperación rápida de F_v/F_m disminuyó en muestras provenientes de 6 y de 18 metros de profundidad, con un $t_{1/2}$ de 25 y 132 minutos respectivamente (Figura 32B y 32C). El tratamiento con DTT afecta de tal manera el XC que causó un efecto negativo en la recuperación de F_v/F_m en las hojas del dosel y subdosel pero no en las hojas basales (Figura 32). Así mismo, en las muestras tratadas con DTT la fase rápida de recuperación de F_v/F_m desapareció. Por lo tanto, el $t_{1/2}$ en las muestras tratadas con DTT aumentó 12 veces en superficie y 3.5 veces para las muestras provenientes de 6 metros de profundidad. En contraste, el $t_{1/2}$ de recuperación de F_v/F_m fue similar para las muestras control y tratadas con DTT provenientes de hojas basales (Figura 32C).



Figura 32: Recuperación de la máxima eficiencia quántica operativa del PSII luego del estrés con alta luz para muestras control (símbolo abierto) y para las muestras tratadas con DTT (símbolo cerrado) como se describe en materiales y métodos. A) Muestras de superficie. B) Muestras de 6 m. C) Muestras de 18 m. La línea representa el ajuste al modelo propuesto por Hanelt 1998 (ver materiales y métodos). *IV.5.* **DISCUSIÓN**

<u>Relación entre NPQ y el XC.</u> El análisis comparativo entre la disipación de la fluorescencia de la clorofila *a* y la actividad del ciclo de las xantofilas mostró que, a diferencia de lo que ocurre en plantas superiores, en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades el NPQ puede ser explicado principalmente por la síntesis de zeaxantina. Por lo tanto, la alta capacidad para disipar el exceso de energía en forma de calor está asociada a la alta acumulación de Zea bajo condiciones de luz saturante.

El análisis de disipación y los tratamientos con inhibidores se realizaron en las muestras colectadas durante el verano, que fueron las que presentaron valores de NPQ más bajos que los reportados en primavera (capítulo 2 de esta tesis). Durante la primavera estos organismos alcanzan su máxima tasa de elongación de frondas (Gonzáles-Fregoso et al. 1991), mientras que en verano se ha reportado una disminución de la tasa fotosintética junto con menores valores de concentración de clorofila *a* (Clendenning 1971, Gerard 1984, capítulo 3 de esta tesis), aparentemente por un aumento en la temperatura del agua y/o una disminución de la concentración de nutrientes. Por lo tanto en este capítulo se presentaron características de organismos en diferentes estados fisiológicos. Sin embargo, la relación NPQ-Zea, la cual se construyó con datos obtenidos durante primavera y verano, indica que el mecanismo de disipación térmica es el mismo entre diferentes condiciones fisiológicas.

Aunque *M. pyrifera* presenta un XC similar al de plantas superiores, las características de NPQ y los factores de control asociados son más parecidos a los reportados para diatomeas. Por ejemplo, la relación entre Zea y NPQ en *M. pyrifera* es similar a la relación entre DTx y NPQ reportada para diatomeas (Lavaud et al. 2002a,

Lavaud et al. 2004). Así mismo, la concentración de Zea o de DTx normalizada por clorofila *a* induce la misma cantidad de NPQ. Esto genera que se alcancen valores muy altos de NPQ vía la acumulación de Zea o de DTx (Ruban et al. 2004) tanto en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas en superficie, y por lo tanto aclimatadas a altas irradiancias, como en células de *Phaeodactylum tricornutum* aclimatadas a un régimen de luz intermitente (Lavaud et al. 2002, Ruban et al. 2004) ya que ambas condiciones inducen el incremento del ΣXC (Lavaud et al. 2002).

El tamaño de ΣXC normalizado por la concentración de clorofila *a* fue tres veces mayor en las hojas del dosel que en las basales, y en comparación con plantas superiores fue aproximadamente 5 veces mayor (Jahns 1995). De igual manera, el ΣXC en diatomeas es mayor que en plantas superiores (Wilhelm 1990, Lavaud et al. 2004), y un régimen de luz intermitente provoca un aumento del 100% en estos pigmentos (Lavaud et al. 2002a). Por lo tanto, una gran cantidad de pigmentos potencialmente fotoprotectores parecen ser una importante adaptación de las Heterokontofitas, ya que les permite alcanzar una alta disipación del exceso de energía en forma de calor.

La cantidad de pigmentos interconvertibles del XC estuvo relacionada con el estado de aclimatación de las hojas. Las hojas superficiales mostraron la más rápida tasa de deepoxidación y la más alta acumulación de Zea luego de la exposición a alta luz. El incremento en la concentración de Vio que puede ser de-epoxidada es una característica de las plantas adaptadas a sol (Demmig-Adams y Adams III 1996, Horton y Ruban 2005). La principal diferencia ente *M. pyrifera* y plantas superiores son los bajos valores de DPS que se alcanzan en el alga. Mientras que el máximo DPS fue de alrededor de 35% en hojas superficiales, en plantas superiores (Pfündel y Bilger 1994) y en microalgas verdes (Casper-Lindley y Björkman 1998, García-Mendoza et al. 2002) se alcanzan valores de hasta el 80%. Las diatomeas también presentan bajos valores de DPS, de entre 33 y 50% (Oliazola et al. 1994, Lavaud et al. 2004). En plantas superiores la cantidad relativa de Vio que puede ser de-epoxidada está relacionada con el tamaño del complejo periférico colector de luz (LHCII). El máximo valor de DPS es mayor cuando LHCII es pequeño, como en el caso de plantas adaptadas a alta luz (Jahns 1995; Härtel et al. 1996, Färber y Jahns 1998). En algas cafés la regulación del tamaño de las antenas periféricas en relación al XC no ha sido estudiada, pero probablemente el arreglo de estas antenas afecte la máxima cantidad de Vio que puede ser de-epoxidada.

<u>Mecanismos involucrados en el control de NPQ</u>. Puesto que *M. pyrifera* no presenta estados de transición (Fork et al. 1991) y tampoco hay un Δ pH asociado a NPQ (ver más adelante), la reducción en F_m es causada principalmente por la acumulación de Zea. Por lo tanto, la inactivación de la VDE con DTT bloquea considerablemente la inducción de NPQ. Las hojas del dosel y subdosel tratadas con DTT presentaron un NPQ similar al de las muestras colectadas a 18 m de profundidad (que fueron insensibles al tratamiento con DTT ya que la síntesis de Zea en estas hojas es mínima). La inducción residual de NPQ en las hojas de 18 m y en las hojas tratadas con DTT podría ser explicada por las pocas moléculas de Zea o Ant presentes durante el tratamiento con alta luz pero principalmente por la reducción de F_m relacionada con el fotodaño del PSII.

De manera similar, en diatomeas el DTT bloquea completamente la inducción de NPQ (Oliazola et al. 1994, Casper-Lindley y Björkman 1998, Lavaud et al. 2002b). En contraste, en plantas superiores y en microalgas verdes permanece una proporción importante de NPQ en muestras tratadas con DTT (Püfndel y Bilger 1994). Esta proporción de NPQ está asociada con la protonación de ciertas subunidades del LHC sobre la formación del gradiente del protones (Müller et al. 2001, Horton y Ruban 2005). En plantas superiores (Horton et al. 1991) y en algas verdes (García-Mendoza et al. 2002) la transición de alta luz a oscuridad está acompañada con un rápido decaimiento de NPQ asociado con la desaparición de ApH y es interdependiente de la presencia de Zea ya que también fue observado en las muestras tratadas con DTT (García-Mendoza et al. 2002). M. pyrifera no presenta la fase de inducción rápida de F_m en alta luz, y la relajación de NPQ en oscuridad es lenta. La inducción y relajación de NPQ sigue la síntesis y epoxidación de la Zea, por lo tanto, *M. pyrifera* no tiene un NPQ directamente dependiente de la formación de ΔpH . La función del gradiente de protones a través de la membrana tilakoide parece sólo estar relacionado con la activación de la enzima VDE. Otra observación que indica una independencia entre la formación del ApH y la inducción de NPQ es la respuesta de las hojas colectadas a diferentes profundidades a la adición del desacoplador NH₄Cl. Una lenta relajación de NPQ luego de la destrucción de ΔpH con cloruro de amonio fue observado sólo en presencia de Zea. En contraste, en plantas superiores (Doctor et al. 1991, Ruban et al. 2004) y en algas verdes (García-Mendoza et al. 2002) NPQ se relaja en segundos luego de la adición del desacoplador en las muestras tratadas y no tratadas con DTT. Por lo tanto *M. pyrifera* no tiene la fase de inducción rápida que ha sido atribuida a la protonación de ciertas proteínas de la antena del PSII en plantas superiores. De manera alternativa, la protonación toma lugar y en presencia de Zea hay una lenta liberación de protones desde el lugar de disipación. Esto ha sido propuesto por Ruban et al. (2004) y por Horton y Ruban (2005) para explicar la lenta relajación de NPQ en *P. tricornutum* luego de la adición del desacoplador. Sin embrago, en *M. pyrifera*, la lenta relajación de NPQ luego de la adición del desacoplador estuvo relacionada con la epoxidacion de Zea, ya que la VDE se vuelve inactiva luego de la destrucción del ΔpH. De cualquier modo, si la protonación de alguna proteína de la antena existiera, no indujo NPQ en la diatomea *P. tricornutum*.

El análisis comparativo de NPQ en diferentes organismos en importante para comprender cuál es el mecanismo global de esta inducción (Horton y Ruban 2005). Estos resultados muestran que el control de una de las respuestas más importantes al estrés producido por alta luz difiere entre linajes evolutivos en los fotótrofos eucariotas. En *Macrocystis pyrifera*, que pertenece al linaje de las algas rojas, la inducción de NPQ no puede ser explicada usando el modelo de plantas superiores, que pertenecen al linaje de las algas verdes. La diferencia más importante es que el modulador de la disipación térmica que permite la inducción rápida y la relajación de NPQ, parece no estar presente en *M. pyrifera*. En plantas, este modulador (control prendido-apagado) es la subunidad PsbS (Horton y Ruban 2005), que no ha sido encontrada ni en diatomeas ni en algas café (Müller et al. 2001) y debido a que el arreglo espacial de las antenas es diferente entre plantas y algas café (De Martino et al. 2000), es posible considerar que existen diferencias en el control de NPQ entre estos organismos. En plantas superiores q_E es el elemento clave en la regulación térmica. Sin embargo, también se ha reportado un inducción

dependiente de la Zea pero independiente del ΔpH y PsbS (Dall'Osto et al. 2005). Esta disipación, que es insensible a los desacopladores, corresponde en parte a un componente de la lenta relajación de NPQ conocido como q_I (Dall'Osto et al. 2005). Se ha visto que q_I, el cual es sobreexpresado en plantas aclimatadas a bajas temperaturas, protege eficientemente al aparato fotosintético (Verhoeven et al. 1999, Gilmore y Ball 2000). Esta condición induce altos valores de Zea y probablemente su mecanismo molecular sea la agregación de LHCII (Gilmore y Ball 2000). Recientemente Dall'Osto y colaboradores (2005) identificaron que el origen de esta disipación independiente del pH podría estar asociado a cambios conformacionales de las proteínas colectoras de luz que se unen a la Zea. Es posible que la disipación observada en *M. pyrifera* sea del tipo q_I encontrada en plantas. El arreglo de las antenas de las algas café probablemente favorece este tipo de disipación y podría ser la responsable de los altos valores de NPQ encontrados en *M. pyrifera*.

En plantas superiores (Havaux y Niyogi 1999) y en diatomeas (Olaizola et al. 1994, Lavaud et al. 2002a) se reconoce la importancia que tiene el XC en la fotoprotección. En *M. pyrifera*, los altos valores de NPQ asociados a la síntesis de Zea indican un efectivo potencial fotoprotector. Dos procesos con diferentes cinéticas contribuyen a la recuperación de la máxima eficiencia quántica luego del estrés con alta luz (Hanelt 1998). La fase lenta de recuperación F_v/F_m está asociada con la reparación de los centros de reacción del PSII dañados cuando hay una alta tasa de degradación de la proteína D1 (fenómeno conocido como fotoinhibición crónica) mientras que la fase rápida está relacionada con la rápida reversibilidad (down regulation) del PSII. Los datos presentados en este capítulo muestran que esta fase está relacionada con XC ya que la fase de recuperación rápida es mínima en ausencia de actividad del XC en hojas basales. También, la inhibición del XC en las hojas superficiales o subsuperficiales tratadas con DTT muestra que hay un bloqueo en la fase de la recuperación rápida de F_v/F_m . Por lo tanto, la baja recuperación de F_v/F_m en las muestras tratadas con DTT con una capacidad mínima de acumulación de Zea indica que este pigmento es necesario para la fotoprotección.

IV.6. CONCLUSIÓN

M. pyrifera tiene un XC similar al de plantas superiores pero su NPQ y sus factores de control son más semejantes a los de diatomeas. En ambos grupos, NPQ depende principalmente de la síntesis de pigmentos fotoprotectores durante condiciones de alta luz. Las diatomeas tienen una inducción más rápida debido a que la DTx se logra en una reacción de de-epoxidacion un sólo paso. Las diatomeas proliferan en ambientes de luz altamente variables como las aguas no estratificadas, lo que las lleva a necesitar un sistema de respuesta más rápido que en las macroalgas sésiles. En éstas, probablemente la adquisición de un sistema de fotoprotección más eficiente (alto ΣXC, alto NPQ) es más importante que una respuesta rápida. Las especies de algas pardas que son incapaces de expresar mecanismos de fotoprotección eficientes están restringidas a ocupar hábitats profundos mientras que las especies que poseen un alto XC pueden hacerlo en hábitats someros (Rodrigues et al. 2002). *Macrocystis pyrifera* presenta ambas características de acuerdo a la posición del tejido fotosintético en la columna de agua.

Discusión general

V.1. Hipótesis de diferenciación de funcionas en Macrocystis pyrifera

La caracterización individual de la fisiología fotosintética de organismos adultos de *Macrocystis pyrifera* mostró que esta especie regula activamente sus mecanismos de fotosíntesis y fotoprotección. Mientras que las hojas del dosel son altamente eficientes para realizar fotosíntesis y fotoprotegerse, las de la zona basal mostraron un patrón opuesto (excepto en su capacidad para absorber luz) pero probablemente contribuye con otras funciones fisiológicas. En el capitulo 2 se presento la hipótesis de diferenciación de funciones en las hojas basales como respuesta evolutiva a los valores negativos de productividad integrada. La diferenciación de funciones no implica una diferenciación tisular (como seria el caso de las raíces en plantas) sino que solamente se refiere a que exista un tipo de tejido donde se localicen los productos de una activación genética diferencial (Raven 1986). En caso de existir una diferenciación de funciones en esta especie, probablemente estaría relacionado con una activación genética diferencial de los genes que codifican para los transportadores y reductores de nutrientes en las hojas basales.

En la Figura 33 se presenta un esquema de la regulación genética diferencial bajo la hipótesis de diferenciación de funciones en *Macrocystis pyrifera*, tomando en cuenta a los transportadores y reductores de nutrientes, a los componentes estructurales del aparato fotosintético (proteínas y pigmentos asociados) y a las enzimas más importantes de la etapa oscura (Rubisco y Rubisco activasa).



Figura 33: Regulación hipotética de los genes que codifican para los transportadores y reductores de nutrientes (T y R), para los componentes estructurales del aparato fotosintético (PSU, Chl c y Fuco), para los pigmentos del ciclo de las xantofilas (XC) y para las enzimas de la etapa oscura (Rubisco) en *Macrocystis pyrifera* bajo la hipótesis de diferenciación de funciones. La punta de la flecha indica hacia donde es mayor la expresión.

V.1.1. Transportadores y reductores de nutrientes

Tanto en plantas como en algas la incorporación de nitrato y nitrito se realiza con la ayuda de transportadores de alta afinidad en un proceso activo que demanda el consumo de ATP. En *Macrocystis pyrifera* se ha visto que esta incorporación sigue la cinética de saturación descrita por la ecuación de Michaelis-Menten, aunque V_{max} y K_s son variables y dependen de las condiciones ambientales previas (Kopczak 1994). Una vez dentro de la célula el nitrato y el nitrito son reducidos a amonio por las enzimas nitrato y nitrito reductasa, siendo la ferrodoxina el agente reductor (Shehawy y Kleiner 2001), por lo que es

un proceso competitivo con la generación de NADPH en la etapa clara de la fotosíntesis (ver Figura 1). En plantas superiores la expresión del gene *nar* (que codifica para la nitrato reductasa) es inducido por la presencia de nitrato y la degradación de la proteína es inducida en ausencia de nitrato o en presencia de otra forma reducida de nitrato (Berges 1995, 1997). Así mismo, la actividad de la NR parece estar influenciada directamente por la irradiancia ya que hay mayor abundancia y actividad durante periodos de alta luz, y baja abundancia y actividad en condiciones de oscuridad (Deng et al. 1991). Sin embrago, en algas verdes, cianobacterias y cormofitas hay expresión de NR en oscuridad siempre que haya una fuente de carbono, por lo que parece que la importancia de la luz en promover la síntesis de la NR probablemente es indirecta y está relacionada con el metabolismo del carbono (revisado en Berges 1997).

De acuerdo con la hipótesis de diferenciación de funciones en el tejido, en las hojas basales se debería localizar el producto de la activación genética diferencial de los genes que codifican para los transportadores (*nrtABCD*), para la nitrato reductasa (*nar*) y/o para la nitrito reductasa (*nir*). Probablemente el mecanismo de señalización involucre la presencia de fotorreceptores como rodopsinas o criptocromos.

V.1.2. Componentes estructurales del aparato fotosintético

Para diferentes especies se ha reportado que un aumento en la irradiancia generalmente provoca que aumente el número de centros de reacción por PSII (revisado en Genty y Harbinson 1996), lo cual concuerda con lo que reportan Smith y Melis (1987) para *Macrocystis pyrifera*. Por lo tanto los genes que codifican para las proteínas D1 y D2 de los

centros de reacción (codificadas por los genes *PsbA* y *PsbD* respectivamente), las proteínas involucradas en la cadena de transporte de electrones (plastoquinona A y B, citocromos y platocianina) y las proteínas de las vías de señalamiento asociadas (por ejemplo ascorbato) deberían estar mayormente expresadas en la zona del dosel.

El patrón opuesto lo mostró la concentración de pigmentos accesorios, que aumentó linealmente con la profundidad ($R^2 = 0.80$), lo cual indica que los genes que codifican para la fucoxantina y para la clorofila c deben estar mayormente expresados en la zona basal. Debido a que los pigmentos no están libres sino que se encuentras asociados a proteínas (light harvesting complex pigments -LHCP), también la expresión de LHCP debería ser mayor en la zona basal de los organismos. Esto concuerda con lo reportado sobre la regulación de los genes que codifican para las proteínas que se unen a la fucoxantina (FCPs), que son las mayoritarias en esta especie y están codificadas por la familia multigene Lchf. Apt y colaboradores (1995) reportan que en Macrocystis pyrifera la expresión de los genes Lhcf está inversamente relacionada con la intensidad de luz, con el doble en la abundancia de mRNA bajo condiciones de baja luz, aunque el nivel absoluto de mRNA de cada gene fue diferente y uno de ellos (LhcfD) fue insensible al cambio de luz excepto durante periodos de oscuridad, donde sus niveles se redujeron dramáticamente. Esto ilustra la complejidad de los mecanismos que controlan la regulación de los genes de esta familia (Apt et al. 1995). Así mismo, pocos promotores de los genes Lchf han sido caracterizados por lo que se conoce poco sobre las secuencias regulatorias cis-acting. Con respecto a los sensores de luz en Heterokontofitas, el mecanismo directo involucra la presencia de fotorreceptores del tipo criptocromos y rodopsinas, los cuales activan la
expresión de los *Lchf*, mientras que el mecanismo indirecto involucra el estado redox de la cadena de transporte de electrones y/o otros productos de la fotosíntesis (Durnford 2003).

Los resultados de la fisiología individual indirectamente mostraron que existe una activa regulación en cuanto a los componentes estructurales del aparato fotosintético, sin embargo, aunque existe una expresión genética diferencial no existe un localización de los productos por lo que en cuanto a componentes estructurales del aparato fotosintético no hay diferenciación de funciones, sólo hay diferencias en los niveles de expresión como consecuencia de los mecanismos de regulación.

V.1.3. Enzimas de la etapa oscura

Debido a que los mayores P_{max} se alcanzaron en superficie y disminuyeron linealmente con la profundidad (R^2 = 0.93), Rubisco debería mostrar un patrón similar, por lo que los genes que codifican para la subunidad mayor y menor de esta proteína (*rbsL* y *rbsS* respectivamente) deberían ser activamente expresados en la zona del dosel, y su expresión debería ser menor en la zona basal. El patrón observado en la concentración de proteínas (Figura 25) podría ser un indicador aproximado del comportamiento de esta proteína ya que Rubisco puede constituir hasta el 50% de las proteínas totales (Falkowski y Raven 1997).

Rubisco es una proteína cuya actividad está relacionada con la luz y la presencia de otra proteína, la Rubisco activasa, la cual está codificada en el núcleo del cloroplasto y presenta dos isoformas. La modulación de Rubisco bajo condiciones de luz limitantes es mayormente debido a la capacidad de regular la actividad de la Rubisco activasa vía cambios en el potencial redox en el estroma del cloroplasto (Portis et al. 2002). Debido a lo anterior, la expresión de la Rubisco activasa también debería ser mayor en la zona del dosel y al igual que en el caso de los componentes estructurales del aparato fotosintético, esto representa sólo una diferencia a nivel de regulación y no una diferenciación de funciones ya que no se puede asumir que exista un tipo de tejido donde se localice la expresión diferencial de estos genes.

V.2. Posibles causas de la disminución de la capacidad fotoprotectora durante el verano

Si bien en California se ha relacionado el síndrome del verano con una limitación nutricional (ver discusión del capítulo 3), los resultados presentados en esta tesis sugieren que en este sitio de Baja California durante el verano el estado nutricional no sería un factor limitante. El otro factor ambiental que ha sido relacionado con el síndrome de verano es el incremento de la temperatura del mar. En algas no hay trabajos que directamente relacionen el aumento de la temperatura con la disminución en la capacidad fotoprotectora. Aparentemente el paso limitante afectado por la temperatura en plantas superiores es la activación de Rubisco por medio de la Rubisco activasa ya que se ha visto que bajo un estrés térmico moderado decrece la activación de Rubisco y la tasa neta fotosintética, (Crafts-Brandner y Salvatucci 2002), lo cual a nivel bioquímico es consecuencia de un desbalance entre la tasa de inactivación de Rubisco y la de reactivación por medio de la Rubisco activasa (Crafts-Brandner y Salvatucci 2000).

Por otro lado, el incremento en la temperatura del agua genera una menor disolución de gases como el CO₂. Esto, junto con el posible decremento en el transporte carbono inorgánico vía la anhidrasa carbónica por efecto del UV (ver discusión del capitulo 4), podría provocar un aumento de la actividad oxigenasa de Rubisco, proceso conocido como fotorrespiración, al cual se le ha asignado un rol fotoprotector debido a que libera parte de la presión en la cadena de transporte de electrones en lo que se conoce como transporte de electrones "no asimilatorio" (Beardall et al. 2003). A su vez, los mecanismos de concentración de carbono (MCC) requieren ATP y si el flujo lineal de electrones hacia NADP⁺ no es suficiente para producirlo, pueden activarse otras vías metabólicas que generan ATP, como el flujo cíclico de electrones alrededor del PSI o el ciclo agua-agua (Beardall et al. 2003). El decremento en la activación de Rubisco y el aumento de otras vías metabólicas que generan ATP podrían dar como resultado la diferencia en la pendiente en la relación ETR-E vs P-E entre primavera y verano (Figura 23).

Pero ¿qué relación tiene una limitación en la etapa oscura con la disminución de NPQ en verano? Al menos en plantas, el ΔpH tiene dos funciones básicas en el aparato fotosintético: activa a la enzima ATP sintetasa y es un componente clave en la regulación del quenching dependiente de la energía, q_E (vía activación del XC y protonación de PsbS) en la antena del aparato fotosintético (revisado en Cruz et al. 2005). Así mismo se ha demostrado que excite una modulación de NPQ inducida por diferentes concentraciones de CO₂, donde una menor concentración de CO₂ eleva los valores de NPQ (Kanazawa y Kramer 2002) ya que q_E se vuelve más sensible al flujo lineal de electrones a medida que disminuye la concentración de CO₂ (Cruz et al. 2005). Pero el ΔpH es afectado no sólo por

el flujo lineal de electrones, sino que también es afectado por el flujo cíclico de electrones y por el ciclo agua-agua. Estos dos mecanismos son activados para translocar protones a través de la membrana tilacoidal y por lo tanto dirigir la síntesis de ATP o iniciar q_E en ausencia de NADP⁺. Debido a que en *Macrocystis pyrifera* el componente principal de NPQ es q_I y no q_E como en plantas (ver discusión del capítulo 4), es difícil generar un modelo que explique la relación entre NPQ y la limitación en la etapa oscura.

Finalmente, la pregunta clave que surge del comportamiento de verano es entender por qué esta especie no puede mantener la misma expresión de los pigmentos del XC durante el verano, y por lo tanto expresar la misma capacidad de inducción de NPQ. Indudablemente en algas se necesita generar más conocimiento sobre los mecanismos de regulación de la síntesis de pigmentos y la regulación de los procesos involucrados en la etapa clara y la etapa oscura para explicar la disminución de NPQ durante el verano en *Macrocystis pyrifera*.

V.3. CONCLUSIONES GENERALES

Macrocystis pyrifera es una especie capaz de regular su maquinaria fotosintética en relación a la variación de luz en el ambiente. Durante primavera, la estación en que estos organismos alcanzan su máxima tasa de elongación frondas, los estratos superficiales contribuyen en más del 90% de la productividad de estos organismos, alcanzando altas tasas fotosintéticas y teniendo una súper capacidad para disipar el exceso de energía. En contraste, lo zona basal contribuye pobremente a la productividad neta, lo cual unido a los altos valores de respiración y dentro de un contexto evolutivo, permite suponer que la presencia de estas hojas les proporciona una ventaja adaptativa, la cual podría estar relacionada con la absorción de nutrientes. Esto demuestra que esta especie tiene la capacidad de regular diferencialmente sus mecanismos aclimatativos en función de la posición que ocupa el tejido fotosintético en la columna de agua.

Durante el verano, los organismos retienen la capacidad de regular diferencialmente sus mecanismos aclimtativos, pero tanto la tasa fotosintética como la capacidad fotoprotectora disminuyen un 30-40%. Si bien en California la disminución de la fotosíntesis y la concentración de clorofila *a* durante el verano ha sido relacionada con una limitación nutricional, en el sitio de estudio en Baja California no se detectó este tipo de estrés. La reducción en la capacidad fotosintética parece no estar relacionada con daño en el PSII, debido a que las tasas de transporte de electrones fueron similares entre estaciones, al igual que la concentración de pigmentos constitutivos y accesorios. Esto sugiere que la reducción el la fotosíntesis máxima durante el verano podría ser producto del incremento de otras vías metabólicas necesarias para mantener la homeostasis, como el flujo cíclico de electrones alrededor del PSI o el ciclo agua-agua, generando el ATP necesario para activar los MCC ya que el incremento de la temperatura disminuye la concentración de CO_2 lo que provoca un aumento en la actividad oxigenasa de Rubisco y disminuye la activación de la enzima Rubisco activasa.

El modelo de control de NPQ en esta especie es diferente al modelo propuesto para plantas superiores, donde el componente principal de NPQ es qE. En *Macrocystis pyrifera*, el componente principal de NPQ es Δ pH independiente y parece sólo estar relacionado con la concentración de la zeaxantina, por lo tanto es tipo qI. Mientras que en plantas superiores este tipo de disipación es más comúnmente encontrado en especies perennifolias con bajas tasas de crecimiento, *Macrocystis pyrifera* presenta las mayores tasas de crecimiento de los fotótrofos conocidos. Esto demuestra que los modelos propuestos para plantas superiores no siempre son extrapolables a los sistemas algales.

Finalmente, la capacidad de regulación diferencial en cuanto a fotosíntesis y fotoprotección le permite a esta especie ser ecológicamente exitosa en zonas altamente variables como son las zonas de surgencias costeras, y de esta forma servir de hábitat, refugio y alimento a un gran número de vertebrados e invertebrados marinos, y por lo tanto ser la base de uno de los ecosistemas marinos más productivos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Aguirre-Von-Wobeser E., Figueroa F.L. y Cabello-Pasini, A. 2000. Effect of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *J Appl Phycol* 12: 159-168.

Aguirre-Von-Webeser E. 2002. Regulación de la fotosíntesis en el pasto marino *Zostera marina*. Tesis de Maestría en Ciencias en Oceanografía Costera. Facultad de Ciencias Marinas, UABC, México. 55 p.

Allen A.E., Ward B.B. y Song B. 2005. Characterization of diatom (Bacillarophyceae) nitrate reductase genes and their detection in marine phytoplankton communities. *J Phycol* 41: 95-104.

Apprill A.M. y Lesser M.P. 2003. Effects of ultraviolet radiation on *Laminaria saccharina* in relation to depth and tidal height in the Gulf of Maine. *Mar Ecol Prog Ser* 256: 75-85.

Apt K.E., Clendennen S.K., Powers D.A. y Grossman A.R. 1995. The gene family encoding for fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. Mol Gen Genet 246:455-464.

Arnold K.E. y Manley S.L. 1985. Carbon allocation in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta): intrinsic variability in photosynthesis and respiration. *J Phycol* 21: 154-167.

Aro E.M, Virgin I. y Andersson B. 1993. Photoinhibition of photosystem II: inactivation, protein damage and turnover. *Biochem Biophys Acta* 1143: 113–134.

Axelsson L. y Beer S. 2001. Carbon limitation. En: Algal adaptation to environmental stress: Physiological, biochemical and molecular mechanisms. Rai L.C. y Gaur J.P (Eds). Springer Verlag New York Inc. NY, USA. 421 p.

Baker N.R. 1996. Photosyntesis and the environment. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 491 p.

Berges J.A. 1997. Algal nitrate reductases. Eur J Phycol 32: 3-8.

Berges J.A y Harrison P.J. 1995. Relationships between nitrate reductase activity and nitrate incorporation under steady-state light or nitrate limitation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillarophyceae). *J Phycol* 31: 85-95.

Blankenship R.E. 2002. Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science, UK.202 p.

Büchel C. y Wilhelm C. 1993. *In vivo* analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives. *Photochem Photobiol* 58(1): 137-148.

Cabello-Pasini A., Aguirre-Von-Wobeser E. y Figueroa F.L. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor systems. *J Photochem Photobiol B: Biol* 57: 169-178.

Carr H. y Bjork M. 2003. A methodological comparison of photosynthetic oxygen evolution and estimated electron transport rate in tropical *Ulva* (Chlorophyta) species under different light and inorganic carbon conditions. *J Phycol* 39:1125-1131.

Casper-Lindley S. y Björkman O.1998. Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth Res* 56: 277-289.

Clark R.P., Edwards M.S. y Foster M.S. 2004. Effects of shade from multiple kelp canopies on an understory algal assemblage. *Mar Ecol Prog Ser* 267: 107-119.

Clendennen S.K., Zimmerman R., Powers D. y Alberte R. 1996. Photosynthetic response of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) to ultraviolet radiation. *J Phycol* 32: 614-620.

Clendenning K. 1971. Photosynthesis and general development in *Macrocystis*. En: Biology of giant kelp beds (*Macrocystis*) W.J. North (Ed). Nova Hedwigia 32: 169-190.

Colombo-Pallotta M.F., García-Mendoza E. y Ladah L.B. (2006) Photosynthetic performance, light absorption and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. *J Phycol* 42 (2).

Crafts-Brandner S.J y Salvatucci M.E. 2000. Rubisco activase constrains the photosynthetic potencial of leaves at high temperature and CO₂. *PNAS* 97(24): 13430-13435,

Crafts-Brandner S.J y Salvatucci M.E. 2002. Sensitivity of photosynthesis in a C4 plant, maize, to heat stress. *Plant Physiol* 114: 439-444.

Dall'Osto L., Caffarri S. y Bassi R. 2005. A mechanism of nonphotochemical energy dissipation, independent from PsbS, revealed by a conformational change in the antenna protein CP26. *Plant Cell* 17: 1217–1232.

Dayton P.K. y Tegner M.J. 1984. Catastrophic storms, El Niño and patch stability in Southern California Kelp forest community. *Science* 224: 283-285.

Dayton P.K. 1985. Ecology of kelp communities. Ann Rev Ecol Syst 16: 215-245.

Dean T.A. 1985. The temporal and spatial distribution of underwater quantum irradiation in a Southern California kelp forest. *Estuarine Coastal shelf sci* 21: 835-844.

Dean T.A. y Jacobsen F.R. 1984. Growth of juvenile *Macrocystis pyrifera* (Laminariales) in relation to environmental factors. *Mar Biol* 83: 301-311.

De Martino A., Douady D., Quinet-Szely M., Rousseau B., Crépineau F., Apt K. y Caron L. 2000. The light-harvesting antenna of brown algae. *Eur J Biochem* 267: 5540-5549.

Denny M. y Gaylord B. 2002. The mechanics of wave-swept algae. *J Exp Bot* 205: 1355-1362.

Demmig-Adams B. 1990. Carotenoids and protection in plants: A roll of the xanthophylls zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta* 1020: 1-24.

Demmig-Adams B. y Adams III W. 1996. Xanthophyll cycle and light stress in nature: uniform response to excess direct sunlight among higher plant species. *Planta* 198: 460-470.

Deng M.D., Moureaux T., Cherel I, Boutin J.P. y Caboche M. 1991. Effects of nitrogen metabolites on the regulation of the circadian expression of tobacco nitrate reductase. *Plant Physiol Biochem* 29: 239-247.

Denny M. y Gaylord B. 2002. The mechanics of wave-swept algae. *J Exp Biol* 205: 1355-1362.

Dubinsky Z., Falkowski P.G., Post A.F. y van Hes U.M. 1987. A system for measuring phytoplankton photosynthesis in a defined light field with an oxygen electrode. *J Plankton Res* 9: 607-612.

Dubinsky Z. 1992. The functional and optical absorption cross-sections of phytoplankton photosynthesis. In: Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Plenum Press, NY. 550 p.

Durnford D.G. 2003. Structure and regulation of Light-Harvesting Complexes genes. En: Photosynthesis in algae. Larkum A.W., Douglas S.E. y Raven J.A. (Eds). Kluwer Academic Press Publishers. The Netherlands. 63-82 pp.

Eichelmann H., Oja V., Rasulov B., Padu E., Bichele I., Pettai H., Mänd P., Kull O. y Laisk A. 2005. Adjustment of leaf photosynthesis to shade in a natural canopy: reallocation of nitrogen. *Plant cell environ* 28(3): 389-401.

Enriquez S. 2005. Light absorption efficiency and the package effect in leaves of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar Ecol Prog Ser* 289:141-150.

Enriquez S., Agusti S y Duarte C. M. 1994. Light absorption by marine macrophytes. *Oecologia* 98: 121–129.

Eskling M. y Åkerlund H. 1999. Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low light to high light. *Photosynth Res* 57: 41-50.

Fairhead V.A. y Cheshire A.C. 2004. Seasonal and depth related variation in the photosynthesis- irradiance response of *Ecklonia radiata* (Phaeophyta, Laminariales) at West Island, South Australia. *Mar Biol* 145: 415-426.

Falkowski P. y LaRoche J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J Phycol* 27: 8-14.

Falkowski P. y Raven J. 1997. Aquatic Photosynthesis. Blackwell Science, Oxford, UK. 375 p.

Färber A. y Jahns P. 1998. The xanthophyll cycle of higher plants: influence of antenna size and membrane organization. *Biochim Biophys Acta* 1363: 47-58.

Ferrario-Mery S., Valadier M.H. y Foyer C.H. 1998. Overexpression of nitrate reductase in tabacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. *Plant Physiol* 117(1): 293-302.

Fork D.C., Herbert S.K. y Malkin, S. 1991. Light energy distribution in the brown algae *Macrocystis pyrifera* (Giant kelp). *Plant Physiol* 95: 731-739.

Frank H.A., Cua A., Chynwat V., Young A., Gosztola D. y Wasielewski M.R. 1994. Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth Res* 41: 389-395.

Fujita Y., Ohki K. y Murakami A. 2001. Acclimation of photosynthetic light energy conversión to the light environment. En: Algal adaptation to environmental stress: Physiological, Biochemical and Molecular mechanisms. Rai L.C. y Gaur J.P. (Eds.) Springer Verlag NY, USA.421 p.

García-Mendoza E., Matthijs H.C.P., Schubert H. y Mur L. 2002. Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca a*cclimated to constant and dynamic light conditions. *Photosynth Res* 74: 303-315.

García-Mendoza E. y Colombo-Pallotta M.F. En prensa. The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different non-photochemical quenching control than higher plants. New Phytologist.

Gaylord B., Reed D.C., Raimondi P.T., Washburn L., y McLean S.R. 2002. A physically based model of macroalgal spore dispersal in the wave and current-dominated nearshore. *Ecology* 83: 1239-1251.

Geider R.J., MacIntyre H. y Kana T. 1998. A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnol Oceanog* 43: 679-694.

Geider R.J. y Osborne B.A. 1992. Algal Photosynthesis: the measurement of algal gas exchange. Chapman & Hall, Inc. USA. 256 p.

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

Gevaert F., Creach, A., Davoult, D., Holl, A.-C., Seuront, L. y Lemoine, Y. 2002. Photoinhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. *Plant Cell Environ* 25: 859-872.

Gerard V. 1982. Growth and utilization of internal nitrogen reserves by the giant kelp *Macrocystis pyrifera* in a low-nitrogen ambient. *Mar Biol* 66:27-35.

Gerard V. 1984. Physiological effects of El Niño on giant kelp in southern California. *Mar Biol Lett* 5: 317-22.

Gerard V. 1986. Nutrient-limited growth of juvenile kelp, *Macrocystis pyrifera*, during the 1982-1984 "El Niño" in Southern California. *Mar Biol* 90: 597-601.

Gerard V. A. 1986b. Photosynthetic characteristics of giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) determined in situ. *Mar Biol* 90: 473-482.

Gilmore A.M. 1997. Mechanistic aspects of xantophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant* 99: 197-209.

Gilmore A.M. y Ball M.C. 2000. Protection and storage of chlorophyll in overwintering evergreens. *PNAS* 97: 11098–11101.

Gómez P.I. y Gónzalez M.A. 2005. The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biol Res* 38 (2-3): 151-162.

González-Fregoso J., Ibarra-Obando S. y North W.J. 1991. Frond elongation rates of shallow water *Macrocystis pyrifera* (L.) Ag. in northern Baja California, Mexico. *J App Phycol* 3: 311-318.

Govindjee. 2002. A Role for a Light-Harvesting Antenna Complex of Photosystem II in Photoprotection. *The Plant Cell* 14: 1663-1668.

Green B. y Parson W. 2003. Light-harvesting antenas in photosynthesis. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.513 p.

Groove R.S., Zabloudil K., Norall T. y Deysher, L. 2002. Effects of El Niño events on natural kelp beds and artifical reefs in southern California. *J Marine Science*. 59: 330-337.

Guglielmi G., Lavaud L., Rousseau B., Etienne A-L., Houmard J. y Ruban A.V. 2005. The light-harvesting antenna of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: Evidence for a diadinoxanthin-binding subcomplex. *FEBS Lett* 272: 4339–4348.

Harker M., Berkaloff C., Lemoine Y., Britton G., Young A.J., Duval J.C., Rmiki N.E. y Rousseau B. 1999. Effects of light and desiccation on the operation of the xanthophylls cycle in two marine brown algae. *Eur J Phycol* 34: 35-42.

Hanelt D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Artic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar Biol* 131: 361-369.

Härtel H., Lokstein H., Grimm B. y Rank B. 1996. Kinetic study on the xanthophyll cycle in barley leaves. *Plant Physiol* 110: 471-482.

Havaux M. y Niyogi K.K. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *PNAS* 96: 8762-8767.

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

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

Horton P. y Ruban A. 2005. Molecular design of the photosystem II light harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J Exp Bot* 56: 365-373.

Hurd C.L., Berges J.A., Osborne J., y Harrison P. 1995. An *in vitro* nitrate reductase assay for marine macroalgae: optimization and characterization of the enzyme for *Fucus gardneri* (Phaeophyta). *J Phycol* 31: 835-843.

Jackson G.A. 1977. Nutrients and production of giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, off southern California. *Limnol Oceanogr* 22: 979-95.

Jackson G.A., James D.E. y North W. 1985. Morphological relationships among fronds of giant kelp *Macrocystis pyrifera* off La Joya, California. *Mar Ecol Prog Ser* 26: 261-270.

Jassby A.D. y Platt T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 21: 540-547.

Jahns P. 1995. The xanthophyll cycle in intermittent light-growth pea plants. Possible functions of chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Plant Physiol* 108: 149-156.

Jordan B.R., He J., Chow W.S. y Anderson J. 1992. Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Environ* 15: 91-98.

Kirk J.T. 1992. *The nature and measurements of the light environment in the ocean*. En: Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Plenum press New York, NY, USA. 550 p.

Klein D., Morcuende R., Stitt M. y Krapp A. 2000. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below critical levels. *Plant Cell Environ* 23: 863-871.

Krause G.H. y Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42: 313-349.

Kristiansen S. 1983. The temperature optimum of the nitrate reductase assay for marine phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 28:776-780.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Ladah L., Zertuche-Gonzales J. y Hernandez-Carmona G. 1999. Rapid recovery of giant Kelp (*Macrocystis pyrifera*) recruitment near it southern limit in Baja California after mass disappearance during ENSO 1997-1998. *J Phycol* 35: 1106-1112.

Ladah L. y Zertuche-Gonzalez J. 2004. Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) survival in deep water (25-40 m) during El Niño of 1997-1998 in Baja California, Mexico. *Botanica Marina* 47: 367-372.

Ladah L., Tapia F., Pineda J. y Lopez M. 2005. Spatially heterogeneous, synchronous settlement of *Chthamalus spp*. Larvae in northern Baja California. *Mar Ecol Prog Ser* 302: 177-185.

Lavaud J., Rousseau B., Gorkom H.J., y Etienne A-L. 2002a Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum. Plant Physiol* 129: 1398-1406.

Lavaud J., Rousseau B. y Etienne A-L. 2002b. In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical florescence quenching. *FEBS Lett* 523: 163-166.

Lavaud J., Rousseau B. y Etienne A-L. 2004. General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *J Phycol* 40: 130-13.

Li X-P., Björkman O., Shin C., Grossman A.R., Rosenquist M., Jansson S. y Niyogi K.K. 2000. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395.

Lichtenthaler H.K. y Babani F. 2004. Light adaptation of the photosynthetic apparatus. Change in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activity. En: Chlorophyll *a* fluorescence: A signature of Photosynthesis. Papageorgiou G. y Givindjee (Eds). Springer Verlag. The Netherlands. 818 p.

Lobban C. 1978. Translocation of ¹⁴C in *Macrocystis pyrifera* (Giant Kelp). *Plant Physiol* 61: 585-589.

Lobban C. y Harrison P. 1994. Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press. U.K. 366 p.

Lohr M. y Wilhelm C. 1999. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *PNAS* 96: 8784-8789.

Lüning K. 1990. Seaweeds: Their environment, biogeography, and ecophysiology. Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc. USA. 527 p.

Lüning, K. 1993. Environmental and internal control of seasonal growth in seaweeds. *Hydrobiologia* 260/261: 1-14.

Ma Y.Z., Holt N.E., Li X.P., Niyogi K.K. y Fleming G.R. 2003. Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting. *PNAS* 100: 4377-4382.

Manley S. 1981. Iron uptake and traslocation by Macrocystis pyrifera. *Plant Physiol* 68: 914-918.

Manley S. 1984. Micronutrient uptake and translocation by *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta). *J Phycol* 20: 199-201.

Manley S. y North W. 1984. Phosphorus and the growth of juvenile *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta) sporophytes. *J Phycol* 20: 389-393.

Matt P., Krapp A., Haake V., Mock H.P y Stitt M. 2002. Decreased Rubisco activity leads to dramatic changes of nitrate metabolism, amino acid metabolism and the levels of phenylpropanoids and nicotine in tabacco antisense RBCS transformants. *The Plant Journal* 30(6):663-677.

Morosinotto T., Caffari S., Dall'Osto L. y Bassi R. 2003. Mechanistic aspects of the xanthophylls dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol Plant* 119: 347-354.

Müller P., Li X-P. y Niyogu K.K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558-1566.

Niyogi K.K., Li X-P, Rosenberg V. y Jung H-S. 2005. Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Bot* 56(41): 375-382.

Neushul M. y Haxo F.T. 1968. The life history of *Macrocystis* in the sea. *Fish Bulletin* 139: 13-16.

Noctor G., Rees D., Young A. y Horton P. 1991. The relationship between zeaxanthin, energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence, and trans-thylakoid pH gradient in isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1057: 320-330.

North W. 1971a. Introduction and background. En: The biology of giant kelp beds (*Macrocystis*) in California. W.J. North (Ed). Nova Hedwigia 32: 1-97 p.

North W.J. 1971b. Growth of individual fronds of the mature giant kelp *Macrocystis*. En The biology of Giant kelp beds (*Macrocystis*) in California. W.J. North (Ed) Nova Hedwigia 123-168 p.

North W.J. y Zimmerman R.C. 1984. Influences of macronutrients and water temperatures on summertime survival of *Macrocystis* canopies. *Hydrobiologia* 116/117: 419-24.

Olaizola M., La Roche J., Kolber Z. y Falkowski P. 1994. Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth Res* 41: 357-370.

Owens T.G. y Wold E.R. 1986. Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. II. Disitribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol* 80: 730-746.

Pearcy R.W., Krall J.P. y Sassenrath-Cole G.F. 1996. Photosynthesis in fluctuating light environment. En Photosynthesis and the environment. Baker N.R (Ed). Kluwer Academic Publishers. The Netherands. 491 p.

Peschek G.A. y Zoder R. 2001. Temperatura stress and basic bioenergetic strategies for stress defence. En: Algal adaptation to environmental stress: Physiological, biochemical and molecular mechanisms. Rai L.C. y Paur J.P. (Eds). Spring Verlag NY, USA.421 p.

Pfündel E. y Bilger W. 1994. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth Res* 42: 89-109.

Platt T. Gallegos C.L. y Harrison W.G. 1980. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J Mar Res* 38: 687-701.

Portis A. Zhang N., Ewy R. y Kallis R. 2002. Light Modulation of Rubisco in *Arabidopsis* Requires Redox Regulation of the Larger Rubisco Activase Isoform. *PNAS* 99: 330-3334.

Raven J.A. 1986. Evolution of plant life forms. En: On the economy of plant form and function. T.J. Givnish (Ed). Cambridge University Press. NY, USA. 717 p.

Raven J.A., Handley L.L. y Andrews, M. 2004. Global aspects of C/N interactions determining plant-environment interactions. *J Exp Bot* 55(394): 11-25.

Reed D., Amsler C. y Ebeling A. 1992. Dispersal in kelps: factors affecting spore swimming and competency. *Ecology* 73: 1577-1585.

Rodrigues M.A., Dos Santos C.P., Yoneshigue-Valentin Y., Strbac D. y Hall D.O. 2000. Photosynthetic light response curves and photoinhibition of the deep-water *Laminaria abyssalis* and the intertidal *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *J Phycol* 36: 97-106.

Rodrigues M.A., Dos Santos C.P., Young A.J., Strbac D. y Hall, D.O. 2002. A smaller and impaired xanthophyll cycle makes the deep sea macroalga *Laminaria abyssalis* (Phaeophyceae) highly sensitive to daylight when compared with shallow water *Laminaria digitata*. *J Phycol* 38: 939-947.

Ruban A.V., Lavaud J., Rousseau B., Guglielmi G., Horton P. y Etienne A-L. 2004. The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photosynth Res* 82: 15-175.

Salisbury F.B. y Ross C. 1969. Plant Physiology. The Wadsworth botany series, Wadsworth, Belmont, Calif. USA. 747 p.

Salomonson L. P. y Barberi M.J. 1990. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec Biol.* 41:225-253.

Santalices B. 1990. Patterns of reproduction, dispersal and recruitment in seaweeds. *Oceanogr Mar Biol Ann Rev* 28: 177-276.

Shehawy R.M. y Kleiner D. 2001. Nitrogen limitation. En: Algal adaptation to environmental stress: Physiological, Biochemical and Molecular mechanisms. Rai L.C. y Gaur J.P. (Eds.) Springer Verlag NY, USA. 421 p.

Silva J., Santos R., Serôdio J. y Melo R. 1998. Light response curves for *Gelidum* sesquipedale from different depths, determined by two methods: O₂ evolution and chlorophyll fluorescence. *J App Phycol* 10: 295-301.

Smith B.M. y Melis A. 1987. Photosystem stoichiometry and excitation distribution in chloroplasts from surface and minus 20 meter blades of *Macrocystis pyrifera*, the giant kelp. *Plant Physiol* 84: 1325-1330.

Song B. y Ward B.B. 2004. Molecular characterization of the assimilatory nitrate reductase gene and its expression in the marine alga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J Phycol.* 40:721-731.

Stauber J.L y Jeffrey S.W. 1988. Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. *J Phycol* 24: 158-172.

Sukenik A., Bennet J. y Falkowski P. 1987. Light-saturated photosynthesis-limitation by electron transport or carbon fixation? *Biochim Biophys Acta* 891: 205-215.

Thomas T.E y Harrison P.J. 1988. A comparison of *in vitro* and in vivo nitrate reductase assay in three intertidal seaweeds. *Bot Mar* 31:101-107.

Ting I.P. 1982. *Plant Physiology*. Addison – Wesley Publishing Company, USA. 642 p.

Tischner R., Ward M.R. y Heffaker R.C. 1989. Evidence for a plasma-membrane bound nitrate reductase involved in nitrate uptake in *Chlorella sorokiniana*. *Planta* 178: 19-24.

Underwood A. 1997. Experiment in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, Cambridge. 504pp.

Valiela I. 1995. Marine ecological processes. Second Edition, Springer Verlag New York Inc. 686 p.

Van den Hoek C., Mann D.G. y Jahns H.M. 1995 Algae: an introduction to phycology. The Cambridge University Press. UK. 627 p.

Van Heukelem L. y Thomas C. 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments, *J Chromatogr* 910: 31- 39.

Van Kooten O. y Snel J.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res.* 25: 147-150.

Vannesland B. y Salomonson L.P. 1972. The nitrate reductase of *Chlorella*. Species or strain differences? *Plant Physiol* 49: 1029-1031.

Van Tussenbroek, B.I. 1989. Seasonal growth and composition of fronds of *Macrocystis pyrifera* in the Falkland Islands. *Mar Biol* 100: 419-430.

Verhoeven A.S., Adams III W., Demmig-Adams B., Croce R. y Bassi R. 1999. Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperature and light stress in *Vinca major*. *Plant Physiol* 120: 727–737.

Villafañe C., Buma A., Boelen P. y Helbling W. 2004. Solar UVR-induced DNA damage and inhibition of photosynthesis in phytoplankton from Andean Lakes of Argentina. *Arch Hydrobiol* 161(2): 245-266.

Wheeler W.N. 1980. Pigment content and photosynthetic rate of the fronds of *Macrocystis pyrifera*. *Mar Biol* 56: 97-102.

Wheeler P.A. y North W.J. Effect of nitrogen supply on nitrogen content and grpwth rate of juvenile *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyta) sporophytes. *J Phycol* 16: 577-582.

White A.J. y Critchley C. 1999. Rapid light curves: A new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynth Res* 59: 63-72.

Wilhelm C. 1990. The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll *b*- and chlorophyll *c*- containing algae. *Plant Physiol Biochem* 28: 293-306.

Yamamoto H., Nayakama T.O.M. y Chichester C.O. 1962. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch Biochem Biophys* 97: 168-173.

Yamamoto H. 1979. Biochemistry of the xanthophylls cycle in higher plants. *Pure Appl Chem* 51: 639-648.

Yamamoto H. y Bassi R. 1996. Carotenoids: Localization and function. En Oxygenic Photosynthesis: The light reactions. Ort D.R. y Yocum C.F. (Eds). Kluver Academic Publishers. Dordrecht. 539-563 p.

Zar, J. 1984. Biostatistical analysis. Prentice Hall, USA. 718pp

Zimmerman R.C. y Kremer J.N. 1984. Episodic nutirent supply to a kelp forest ecosystem in Southern California. *J Mar Res* 42: 591-604.

Zimmerman R.C. y Robertson D. 1985. Effects of El Niño on local hydrography and growth of giant kelp *Macrocystis pyrifera*, at Santa Catalina Island, California. *Limnol Oceanogr* 30: 1298-1302.

Anexo 1

Expresión y actividad de nitrato reductasa en Macrocystis pyrifera

Una manera de probar la hipótesis de diferenciación de funciones planteada en esta tesis es monitoreando la expresión de algún gen relacionado con la incorporación de nutrientes, como por ejemplo nitrato reductasa en hojas provenientes de diferentes profundidades. Esta enzima cataliza la reducción de nitrato a nitrito, y se cree que es el paso limitante en el proceso de incorporación de nitrato y su subsiguiente reducción a amonio (Solomonson y Barber 1990). En Dunaliella tertiolecta la expresión de este gen es inducible por nitrato (siendo el tiempo de inducción dependiente del nivel de nitrógeno intracelular) y represible por amonio (Song y Ward 2004). La especie filogenéticamente más cercana de la que se dispone de la secuencia de ADN de este gen fue Phaeodactylum triconutum, una diatomea penada en la que Allen y colaboradores (2005) caracterizan su expresión. Debido a que este es un gen altamente conservado (Song y Ward 2004), mediante RT-PCR se intentó semi-cuantificar su expresión, usando las sondas diseñadas por Allen y colaboradores (2005) para diatomeas y siguiendo el protocolo de amplificación propuesto por estos autores. Desafortunadamente la reacción en Macrocystis no amplifico debido a inespecificidad del cebador diseñado en base a la secuencia de Phaeodactylum. Se probó hacer un gradiente en la temperatura de anillamiento en el RT-PCR, cambiar la concentración de cebadores y de los demás constituyentes de la reacción, la calidad de la enzima Taq DNA polimersa, etc, desafortunadamente sin éxito.

Así mismo se intento cuantificar la actividad de la enzima nitrato reductasa, usando para esto un protocolo de extracción y cuantificación diseñado para plantas superiores (NECi, http://www.nitrate.com), pero tampoco se pudo medir la actividad de la enzima. Esto posiblemente se deba a que la extracción de la enzima es un proceso delicado debido a la perdida de cofactores durante su extracción (Vannesland y Solomonson 1972), a la inhibición de la actividad por la presencia de compuestos fenólicos (Thomas y Harrison 1988), los cuales son abundantes en *Macrocystis*, o a la presencia de endoproteasas (Berges y Harrison 1995). Otra limitación en el protocolo generalmente empleado es que la actividad de esta enzima se determina a 37 °C, temperatura machismo mayor a la *in-situ* y que puede afectar los valores de actividad (ver Kristiansen 1983). Sin embrago, esta es la enzima involucrada en la incorporación de nutrientes mejor caracterizada en plantas y algas, tanto en términos bioquímicos como moleculares y ecofisiológicos (Tischner et al. 1989, Hurd et al. 1995, Ferrario-Mery et al. 1998, Klein et al. 2000, Matt et al. 2002).

Para poder amplificar el gene de nitrato reductasa en Macrocystis pyrifera habría que conocer la secuencia de DNA para diseñar los cebadores especie-específicos. Para esto habría que clonar y secuenciar la región, partiendo de oligos degenerados diseñados en base secuencias más conservadas de las este gen en plantas algas а у (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Luego, la cuantificación de la expresión podría realizarse mediante Real Time PCR, o usando la expresión de un gen constituvo como control, como por ejemplo actina.