

Tesis defendida por
Héctor Ocampo Alvarez
y aprobada por el siguiente comité

Ernesto García Mendoza
Director del Comité

Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité

Eugenio de Jesús Carpizo Ituarte
Miembro del Comité

Alejandro Cabello Pasini
Miembro del Comité

María Lucila del Carmen Lares Reyes
Coordinador del programa de posgrado en
Ecología Marina

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

14 de marzo de 2013

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DE ENSENADA**



Programa de Posgrado en Ciencias
en Ecología Marina

Disipación del exceso de energía en el aparato fotosintético de *Macrocystis pyrifera*:
Control molecular y respuesta a la temperatura

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Héctor Ocampo Alvarez

Ensenada, Baja California, México
2013

Resumen de la tesis de Héctor Ocampo Alvarez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ecología Marina.

Disipación del exceso de energía en el aparato fotosintético de *Macrocystis pyrifera*:
Control molecular y respuesta a la temperatura

Resumen aprobado por:

Ernesto García Mendoza
Director de Tesis

Resumen

La disipación no fotoquímica de la fluorescencia del fotosistema II (NPQ; por sus siglas en inglés) es uno de los principales mecanismos de fotoprotección de plantas y algas contra la exposición al exceso de luz. En *Macrocystis pyrifera* las características del NPQ son únicas ya que no presenta la inducción rápida de NPQ dependiente de energía (qE, por sus siglas en inglés), que es común en plantas superiores y algas verdes. Entender como se controla el NPQ cuando el qE no está presente es importante ya que este mecanismo en *M. pyrifera* podría representar una respuesta ancestral al estrés por luz. Para entender el funcionamiento de este mecanismo de fotoprotección, se trabajó bajo la hipótesis de que el NPQ en *M. pyrifera* depende de las reacciones de interconversión del ciclo de xantofilas, por lo que los factores que puedan afectar estas reacciones afectan también la formación de NPQ. Para probar la hipótesis se realizó la caracterización de la cinética de formación y disipación de NPQ y la cinética de la interconversión de los pigmentos del ciclo de xantofilas. Se estudió la influencia del tamaño de la concentración total de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) sobre las reacciones del ciclo de xantofilas y sobre la formación de NPQ. Asimismo, se investigó el efecto de la temperatura, como factor de estrés, sobre las reacciones del ciclo de xantofilas y sobre la formación de NPQ. La cinética de formación y disipación de NPQ presentó dos componentes con características similares a procesos que están presentes en las plantas superiores: quenching fotoinhibitorio (qI) y quenching dependiente de zeaxantina (qZ). Se demostró que el tamaño de la concentración total de pigmentos del ciclo de xantofilas ejerce un control sobre la tasa de formación de NPQ, pero no sobre la amplitud máxima de NPQ. Se demostró que la temperatura afecta las reacciones del ciclo de xantofilas y por lo tanto, la formación de NPQ. Se observó que a 20 °C o a una mayor temperatura, la formación de NPQ es más rápida debido a una aceleración de la interconversión de los pigmentos del ciclo de xantofilas. Adicionalmente se comprobó que las temperaturas altas son estresantes, por que estas provocaron formación de pigmentos deepoxidados en oscuridad, disminución de la máxima eficiencia cuántica del fotosistema II y disminución de la tasa de transporte de electrones. En este trabajo se propone un modelo conceptual para explicar la participación del ciclo de xantofilas en la regulación de la formación y disipación de NPQ en *M. pyrifera*. Se propone que existe un efecto antagónico entre la violaxantina (Vx) y las xantofilas deepoxidadas, anteraxantina (Ax) y zeaxantina (Zx), para la formación de NPQ y en el que probablemente intervienen proteínas del tipo LHCSR.

Palabras Clave: **ciclo de xantofilas, disipación térmica, *Macrocystis pyrifera***

Abstract of the thesis presented by Héctor Ocampo Alvarez as a partial requirement to obtain the Doctor in Science degree in Marine Ecology.

Excess energy dissipation in the photosynthetic apparatus of *Macrocystis pyrifera*:
molecular control and temperature response

Abstract approved by:

Ernesto García Mendoza
Director de Tesis

Abstract

The nonphotochemical quenching (NPQ) of Photosystem II fluorescence is one of the most important photoprotective mechanisms to cope with excess light in plants and algae. In *Macrocystis pyrifera* the NPQ is unique since the fast induction of this response, the energy dependent quenching (qE), which is a common response in plants and green algae, is not present in this alga. To understand how the NPQ is controlled when the qE is not present is important since NPQ in *M. pyrifera* might represent an ancient response to light stress. In order to understand the mechanism of photoprotection, the hypothesis of this work was that NPQ in *M. pyrifera* depends on the xanthophyll cycle reactions of interconversion, so that the factors affecting these reactions may also affect the NPQ formation. To test this hypothesis, the characterization of the NPQ formation and dissipation kinetics and interconversion of xanthophyll pigments cycle was performed. The influence of the size of the total xanthophylls cycle pigment pool (ΣCX) on the xanthophyll cycle reactions and NPQ formation was also investigated. Also, we investigated the effect of temperature as a stress factor on the xanthophyll cycle reactions and on the formation of NPQ. The NPQ formation and dissipation kinetics showed two components that have characteristics similar to those present in higher plants: photoinhibitory quenching (qI) and zeaxanthin-dependent quenching (qZ). It was shown that the size of the ΣCX affected the rate of NPQ formation, but not on the maximum amplitude of NPQ. It was shown that temperature affected the xanthophyll cycle reactions and also NPQ formation. It was shown that temperatures of 20° C or above, accelerated the formation of NPQ associated with an acceleration of the interconversion of the xanthophyll cycle pigments; additionally it was found that temperatures of 20° C or more are stressful, because these resulted in the formation of deepoxidated pigments in the dark, low photosystem II quantum yield and a decrease on the electron transport rate. We propose a conceptual model that explains the involvement of the xanthophyll cycle in the regulation of the formation and dissipation of NPQ in *M. pyrifera*. It is proposed that there is an antagonistic effect between violaxanthin (Vx) and the deepoxidated xanthophylls antheraxanthin (Ax) and Zeaxanthin (ZX), for the formation of the NPQ. Also, the function of LHCSR type proteins in NPQ is discussed.

Keywords: xanthophyll cycle, thermal dissipation, *Macrocystis pyrifera*

Dedicatorias

A Amaly Becerril Espinosa y Axayacatl Hector Ocampo Becerril

Ellos son mi familia, mi felicidad y mi más grande motivación.

A mis padres Hector Ocampo y Silvia Alvarez

Por creer en mi y darme la vida. Mamá se que estarías feliz.

A mis Hermanos Ulises, Omar e Isaac Ocampo Alvarez

En este largo recorrido, me falto tiempo para convivir con ustedes pero lo compensare.

A mis Abuelos Santos Alvarez y Gregoria Dorantes

Mi gran apoyo, consuelo y alegría por estas tierras lejanas.

Agradecimientos

A mi director de tesis Ernesto García Mendoza, por su enseñanza, por su apoyo y su amistad.

A los miembros de mi comité de tesis: Helmut Maske Rubach, Eugenio Carpizo Ituarte y Alejandro Cabello Pasini por sus comentarios y sugerencias y por su apoyo cuando ha sido necesario.

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), por abrirme las puertas a la ciencia, para obtener el doctorado en Ecología Marina, así como, el apoyo económico a través de becas de posgrado.

El personal de apoyo gráfico de CICESE, José Ma. Domínguez y Francisco Ponce quienes han contribuido en la edición de gráficas y figuras para las presentaciones en congresos y los artículos derivados de esta tesis.

Al personal administrativo del Departamento de Ecología de CICESE; L. Rebeca Pineda, Elizabeth Farías y Dalila Mercado. Así como del Departamento de Servicios Escolares; Dolores Sarracino, Citlali Romero, Ivone Best y Norma A Fuentes, quienes han sido un importante apoyo en la tramitología siempre ágil en esta institución. Al Dr. David H. Covarrubias Rosales, quien como Director de Estudios de Posgrado me dio todo su apoyo especialmente en la parte final de esta tesis.

A mis compañeros de muestreo que contribuyeron de manera importante en este proyecto: Ricardo Cruz López, Alma Carolina Castañeda Vega, Felipe Gómez Valdivia, Guadalupe Cabrales Talavera, Amayaly Becerril Espinosa, Luis Lombardo, Jose Edwin Morales y Arturo Ivan Ocampo Torres.

A los integrantes del grupo de conocimiento algal (CONGAL) del CICESE, por su gran amistad y sus sugerencias y comentarios durante las varias presentaciones de avances de la investigación: Ricardo Cruz López, Alma Carolina Castañeda Vega, Guadalupe Cabrales Talavera, Amayaly Becerril Espinosa, Luis Lombardo, Jose Luis Peña Manarrez, Jushiro Cepeda, Mildred Clohe, Mary Carmen Ruiz, Karina de la Rosa Meza.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero a través de la beca de doctorado con número de registro 41639.

Contenido

	Página
Resumen español.....	I
Resumen inglés.....	II
Dedicatorias.....	III
Agradecimientos.....	IV
Lista de Figuras.....	VIII
Lista de Tablas.....	XI
Capítulo 1.....	1
El ciclo de xantofilas y la disipación no fotoquímica en <i>Macrocystis pyrifera</i>	1
1.1 Introducción.....	1
1.2 El proceso de fotosíntesis y la necesidad de su regulación.....	4
1.3 La función de los carotenoides en la regulación de la fotosíntesis.....	6
1.4 El ciclo de xantofilas.....	7
1.5 El NPQ y el ciclo de las xantofilas en plantas superiores.....	8
1.6 Generalidades de <i>M. pyrifera</i>	9
1.7 Variabilidad de la luz y la temperatura en un manto de <i>M. pyrifera</i>	11
1.8 Alcances de esta tesis.....	13
1.9.1. Objetivo general.....	16
1.9.2. Hipótesis general.....	16
1.9.3. Hipótesis particulares.....	16
Capítulo 2.....	17
Cinética de formación y disipación de NPQ y su relación con la interconversion de los pigmentos del ciclo de xantofilas.....	17
2.1 Introducción.....	17
2.2 Materiales y Métodos.....	19
2.2.1. Material de estudio.....	19
2.2.2. Mediciones de fluorescencia de clorofila <i>a</i>	20
2.2.3. Análisis de Pigmentos.....	20
2.3 Resultados.....	21
2.3.1. Formación de NPQ y su relación con el ciclo de xantofilas.....	21
2.3.2. Disipación de NPQ y su relación con el ciclo de xantofilas.....	23
2.4 Discusión.....	28
Capítulo 3.....	31
Efecto del tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas sobre las reacciones de deepoxidación y epoxidación de carotenoides y la formación de NPQ.....	31
3.1 Introducción.....	31
3.2. Materiales y métodos.....	33
3.2.1. Material de estudio.....	33
3.2.2. Diseño experimental.....	34
3.2.3. Mediciones de fluorescencia de clorofila <i>a</i>	34
3.2.4. Análisis de pigmentos.....	35

3.2.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	36
3.3. Resultados.....	37
3.3.1. Concentración de pigmentos del CX en hojas de diferentes profundidades	37
3.3.2. Formación de NPQ en muestras con diferentes ΣCX	38
3.3.3. Deepoxidación en las muestras con diferentes ΣCX	42
3.3.4. Relación entre el NPQ máximo y el tamaño del ΣCX	44
3.4. Discusión	48
3.4.1. El estado de deepoxidación en hojas de diferentes profundidades.....	48
3.4.2. Efecto del tamaño del CX sobre la formación de NPQ y la deepoxidación de pigmentos del CX	49
3.4.3. Influencia del ΣCX en la relación entre el estado de deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas y el NPQ	50
Capítulo 4.....	54
Efecto de la temperatura sobre la reacción de deepoxidación de del ciclo de las xantofilas y su efecto en la formación del NPQ en <i>M. pyrifera</i>	54
4.1. Introducción.....	54
4.2. Materiales y métodos.....	57
4.2.1. Material de estudio	57
4.2.2. Diseño experimental	57
4.2.3. Mediciones de fluorescencia de clorofila <i>a</i>	58
4.2.4. Análisis de pigmentos.....	59
4.2.5. Procesamiento de datos y análisis estadístico.....	60
4.3. Resultados.....	61
4.3.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad del FSII y del ciclo de xantofilas en <i>Macrocystis pyrifera</i>	61
4.3.2. Formación de NPQ en <i>Macrocystis pyrifera</i> en muestras expuestas a diferentes temperatura	64
4.3.3. Efecto de la temperatura sobre la deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas	65
4.3.4. Efecto de la temperatura en la relación del NPQ y el CX	68
4.4. Discusión	69
4.4.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad fotosintética del FSII y la actividad del ciclo de xantofilas en <i>Macrocystis pyrifera</i>	69
4.4.2. Formación de NPQ y deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas en <i>Macrocystis pyrifera</i> expuesta a diferentes temperaturas	69
4.4.3. Efecto de la temperatura en la relación del NPQ y CX	71
4.4.4. Efecto de la temperatura en <i>M. pyrifera</i>	72
Capítulo V.....	74
Discusión General	74
Referencias bibliográficas	82

Lista de figuras

<i>Figura</i>		<i>Página</i>
1.	Esquema del cloroplasto y los componentes inmersos a la membrana tilacoide en los que se lleva a cabo la fotosíntesis.	5
2.	Esquema del ciclo de xantofilas.	7
3.	Representación de un organismo adulto de 1-2 años de edad de <i>M. pyrifera</i> .	10
4.	Distribución global de <i>M. pyrifera</i> .	11
5.	Formación NPQ, ETR y pigmentos del ciclo de xantofilas de las muestras de <i>M. pyrifera</i> durante 60 minutos de iluminación a 1000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.	22
6.	Relación del estado de deepoxidación de los pigmentos xantofilicos (DPS) y el NPQ a través del tiempo	23
7.	Disipación de NPQ en muestras de <i>M. pyrifera</i> después de diferentes periodos de preiluminación.	23
8.	Seguimiento del cambio en la concentración de violaxantina (Vx; Panel A), anteraxantina (Ax; Panel B), zeaxantina (Zx; Panel C) y el estado de deepoxidación (DPS; Panel D) del pool de pigmentos xantofilicos en muestras de tejido superficial de <i>Macrocystis pyrifera</i> .	26
9.	Relación del NPQ y la concentración de pigmentos xantofilicos. Panel A. Relación entre la anteraxantina (Ax) y el NPQ. B) Relación entre la zeaxantina (Zx) y el NPQ. C) relación entre el estado de deepoxidación (DPS) y el NPQ.	27
10.	Variación en profundidad del tamaño del pool de xantofilas (ΣCX) de <i>Macrocystis pyrifera</i> y la intensidad de luz en la columna de agua.	38
11.	Desarrollo del NPQ en hojas de <i>Macrocystis pyrifera</i> colectadas a diferentes profundidades de la columna de agua y expuestas a 5 diferentes irradiancias.	40
12.	Relación entre la disipación no fotoquímica (NPQ) medida a los 10 minutos de iluminación y el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) en hojas de <i>M. pyrifera</i> colectadas de diferentes profundidades (Panel A). El panel B representa la relación del ΣCX y la tasa de formación de NPQ en las muestras expuestas a diferentes irradiancias.	41
13.	Variación en los pigmentos del ciclo de xantofilas Vx columna izquierda, Ax columna del centro y Zx columna derecha, en las muestras colectadas en superficie, 1, 2, 3 y 6 m de profundidad (orden de arriba hacia abajo, indicado en las figuras de la derecha), al exponerla durante 10 minutos a las diferentes irradiancias.	43

14. Relación entre el estado de deepoxidación del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (DPS) medido a los 10 minutos de iluminación y el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) en hojas de *M. pyrifera* obtenidas de diferentes profundidades (Panel A). El panel B representa la relación del ΣCX y la tasa de de-epoxidación de las muestras expuestas a cinco diferentes irradiancias. 44
15. Relación entre la disipación no fotoquímica (NPQ) y la concentración de diferentes pigmentos del ciclo de xantofilas. 46
16. Relación entre el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) y la tasa constante de formación de Ax a partir de Vx (kV-A; panel A) y la tasa constante de formación de Zx a partir de Ax (kA-Z; panel B) en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas de diferentes profundidades y expuestas a 3 diferentes irradiancias. La razón kV-A / kA-Z se presenta en el panel C 47
17. Estado de deepoxidación de los carotenoides del ciclo de xantofilas (DPS) (Panel A) y Máxima eficiencia cuántica del FSII medido como la relación entre la fluorescencia variable y la fluorescencia máxima (F_v/F_m) en hojas del dosel de *M. pyrifera* sometidas por 30 min en oscuridad a las diferentes temperaturas. 61
18. Curvas rápidas de luz en las muestras de *M. pyrifera* mantenidas 30 min en oscuridad a las diferentes temperaturas (A). Tasa máxima del transporte de electrones del FSII (ETR max) en función de la temperatura (B). Tasa de formación del ETR (α ETR) a cada temperatura (C). Tasa de inhibición del ETR (β ETR) a cada temperatura. 63
19. A) Curvas de inducción de NPQ en tejido del dosel de *Macrocystis pyrifera* mantenidas a las diferentes temperaturas. En el panel B, se muestra la tasa de formación de NPQ obtenida del ajuste al modelo sigmoideo. 65
20. Seguimiento de la deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas durante la inducción de NPQ a diferentes temperaturas: Cambio en la concentración de Violaxantina (Vx), Antheraxantina (Ax), Zeaxantina (Zx) y en el estado de deepoxidación (DPS). 66
21. Relación de la tasa de cambio de los pigmentos del ciclo de xantofilas en función de la temperatura. Tasa de disminución de Vx (A). Tasa de acumulación de Zx (B). Tasa de incremento del estado de deepoxidación (DPS). 67
22. Relación del NPQ y el estado de deepoxidación de las muestras tratadas a las diferentes temperaturas. 68
23. Modelo de control de NPQ en el alga parda *Macrocystis pyrifera*. 77

Lista de tablas

Tabla		Página
I	Parámetros de la cinética de inducción de NPQ y de aumento del estado de deepoxidación de sus pigmentos xantofílicos DPS.	23
II	Parámetros de la cinética de disipación de NPQ en oscuridad después de 4, 6, 10, 20 y 50 minutos de preiluminación	24
III	Concentración de pigmentos del ciclo de xantofilas en hojas <i>Macrocystis pyrifera</i> , colectadas a diferentes profundidades en la columna de agua, después de un tratamiento de luz tenue-oscuridad	37

Capítulo 1

El ciclo de xantofilas y la disipación no fotoquímica en *Macrocystis pyrifera*

1.1 Introducción

La luz es necesaria para los organismos fotosintéticos, pero en exceso puede ser perjudicial. La luz en exceso, favorece la formación de especies de oxígeno altamente reactivas que son capaces de dañar el aparato fotosintético (fotodaño) e inhibir la fotosíntesis (fotoinhibición) (Murata et al. 2007). Para aprovechar la energía solar y al mismo tiempo evitar la fotoinhibición, los organismos fotosintéticos cuentan con mecanismos de fotoprotección que los protegen del daño inherente al uso de la luz. La aparición y diversificación de estos mecanismos fotoprotectores han contribuido al éxito evolutivo de los organismos fotosintéticos. Uno de los mecanismos de fotoprotección más importante consiste en eliminar en forma de calor (disipación térmica), el exceso de energía absorbida en el aparato fotosintético (Demmig-Adams 1990; Niyogi et al. 1998). La disipación térmica como mecanismo de fotoprotección, confiere una fuerte aptitud biológica (“fitness”) ante la variabilidad ambiental de la luz (Kulheim et al. 2002) e incrementa la tolerancia al estrés ambiental (Demmig-Adams y Adams 2006).

Elucidar el control molecular de la disipación térmica ha sido un reto científico importante (de Bianchi et al. 2010; Goss y Jakob 2010; Ruban et al. 2011; Wilhelm y Selmar 2011; Jahns y Holzwarth 2012). La gran mayoría de los estudios sobre la caracterización del control molecular de la disipación térmica se han llevado a cabo en plantas superiores, pero recientemente se ha empezado a estudiar este proceso en otros organismos, como las diatomeas, algas verdes y algas pardas (Goss y Jakob 2010).

La disipación térmica se ha medido indirectamente como la disminución de la emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* (Chl *a*) independiente de la actividad fotoquímica del fotosistema II (nonphotochemical quenching, NPQ por sus siglas en inglés)

(Krause y Jahns 2004). *Macrocystis pyrifera* (Heterokontophyta, Phaeophyceae) es una de las pocas representantes de las algas pardas, en las que se ha investigado este mecanismo de fotoprotección. En esta alga, la capacidad de disipación térmica (NPQ máximo) es mayor a la que presentan las plantas superiores, pero tarda más tiempo en formarse (Colombo-Pallotta et al. 2006). En un estudio comparativo entre la formación del NPQ en plantas superiores y *M. pyrifera* se demostró que el NPQ en el alga se relaciona con la interconversión de los pigmentos violaxantina (Vx), anteraxantina (Ax) y zeaxantina (Zx) denominado ciclo de xantofilas (CX), pero no con la formación de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoidal (ΔpH), ni con la agregación de proteínas de la antena del fotosistema II (FSII) como pasa en plantas superiores (Garcia-Mendoza y Colombo-Pallotta 2007; Garcia-Mendoza et al. 2011). Por lo tanto, existen diferencias importantes en el mecanismo de control de la disipación térmica entre algas pardas y plantas superiores. Estos dos grupos de organismos tienen una relación evolutiva distante; las plantas superiores pertenecen al linaje de las algas verdes mientras que *M. pyrifera* pertenece al linaje de las algas rojas, por lo que las diferencias entre el mecanismo de control de NPQ pueden estar relacionadas con la evolución diferencial de los sistemas colectores de luz de estos grupos (Garcia-Mendoza et al. 2011). Específicamente, se propone que *Macrocystis pyrifera* y probablemente el resto de las algas pardas, presentan un mecanismo de disipación térmica ancestral que está controlado única o principalmente por el ciclo de xantofilas (Garcia-Mendoza et al. 2011).

En plantas superiores, se han caracterizado tres procesos moleculares que contribuyen en la formación del NPQ: el quenching energético (qE), el quenching fotoinhibitorio (qI) y el quenching dependiente de zeaxantina (qZ) (Jahns y Holzwarth 2012). Estos procesos que contribuyen a la formación de NPQ, se desarrollan en escalas de tiempo distintas, por lo que pueden ser identificados mediante la caracterización de la cinética de formación y disipación de NPQ. El qZ y el qI se relacionan de manera lineal con la formación de Zx a partir de Vx mediante el CX, en contraste, el qE, es independiente de la formación de Zx, sin embargo cuando Zx está presente la formación de qE es más rápida (Johnson et al. 2009).

En *M. pyrifera* los procesos moleculares que contribuyen a la formación del NPQ no se conocen y por lo tanto es necesaria una aproximación experimental que permita identificar a través de la caracterización de la cinética de formación y disipación, los procesos moleculares con escalas de tiempo distintas que puedan contribuir al desarrollo del NPQ en esta alga parda.

En *M. pyrifera*, la suma del conjunto de pigmentos del ciclo de xantofilas o “tamaño del pool de pigmentos xantofílicos” (ΣCX ; $V_x + A_x + Z_x$), así como los valores de NPQ, son extremadamente altos en comparación con los que presentan las plantas superiores y algas verdes. En plantas superiores un pool de pigmentos xantofílicos (ΣCX) grande es característico de organismos aclimatados a alta luz con alta capacidad de fotoprotección (Johnson et al. 1993a; Johnson et al. 1993b; Demmig-Adams y Adams 1996; Eskling et al. 1997). Sin embargo, para las plantas superiores el ΣCX grande ocasiona una disminución en la tasa de formación de NPQ dependiente del CX (Johnson et al. 2008). No obstante, las plantas superiores pueden compensar esa disminución en el NPQ dependiente del CX, con procesos moleculares del NPQ que son independientes del CX, específicamente con el qE. En un organismo como *Macrocystis pyrifera*, que solo presenta procesos del NPQ dependientes del CX, un mayor ΣCX podría representar una limitación ecológica, si la influencia del tamaño del ΣCX sobre la cinética de formación de NPQ fuera negativa al igual que en plantas superiores, por lo que es importante investigar la influencia del tamaño ΣCX sobre el NPQ y sobre las reacciones del CX.

El principal interés de esta tesis se ha centrado en entender el papel del ciclo de xantofilas en la regulación de NPQ en *M. pyrifera*. Caracterizar la regulación del mecanismo de disipación térmica en *M. pyrifera* a través del ciclo de xantofilas, ayudará a entender la respuesta de *M. pyrifera* a cambios en el ambiente, además de comprender como ha evolucionado este mecanismo en los diferentes grupos de fotótrofos eucariontes. A continuación, se detallan conceptos generales de los temas relacionados a este trabajo de tesis como el proceso de fotosíntesis, los mecanismos de fotoprotección, los pigmentos fotoprotectores, el organismo de estudio (*Macrocystis pyrifera*), el planteamiento del problema, los objetivos e hipótesis tratadas en este trabajo.

1.2 El proceso de fotosíntesis y la necesidad de su regulación

Los organismos fotosintéticos desempeñan la función esencial de transformar la energía de la luz en energía química mediante el proceso de fotosíntesis. En organismos eucariotas, este proceso, se lleva a cabo en el interior de los organelos celulares denominados cloroplastos e involucra componentes inmersos o unidos en la membrana tilacoidal y componentes disueltos en el estroma, la parte interna del cloroplasto (Fig. 1). La energía luminosa se convierte en potencial reductor en los fotosistemas, que son componentes integrales de la membrana tilacoidal. Los fotones son absorbidos por moléculas de pigmentos fotosintéticos (carotenoides y clorofilas) asociados a proteínas. Los complejos proteicos pigmentarios involucrados en la fotosíntesis se denominan antenas colectoras de luz y forman parte de los fotosistemas. La energía es contenida en las moléculas de Chl *a* como energía de excitación, que luego se transfiere de una molécula de Chl *a*, a otra, hasta que es atrapada por un dímero de Chl *a* situado en el centro de reacción de ambos fotosistemas. La excitación de este par pigmentario conduce a una formación y separación de cargas, es decir, la donación de un electrón a un aceptor principal de electrones, seguido por una estabilización de la carga por separación espacial. Sin embargo, la transferencia de energía entre las moléculas de Chl *a* y la conversión de energía de excitación en potencial reductor no procede con la máxima eficiencia. Esto significa que, incluso en condiciones de baja intensidad de luz una parte de las moléculas de clorofila en estado excitado emiten la energía absorbida como fluorescencia o como calor. En el mismo sentido, en condiciones de alta intensidad de luz, donde se satura la separación de carga, la fluorescencia y la disipación térmica dentro de los complejos captadores de luz aumenta de manera significativa.

La fotosíntesis en las plantas superiores y algas es mediada por dos fotosistemas, donde se llevan a cabo dos tipos de reacciones. En el fotosistema II (FS II) el agua se divide en oxígeno molecular, protones y electrones, éstos últimos son transferidos desde el FS II al fotosistema I (FS I) por una serie de reacciones de reducción y oxidación (redox) que involucran a los diferentes componentes de la cadena de transporte de electrones fotosintéticos que están inmersos en la membrana tilacoidal (Fig. 1).

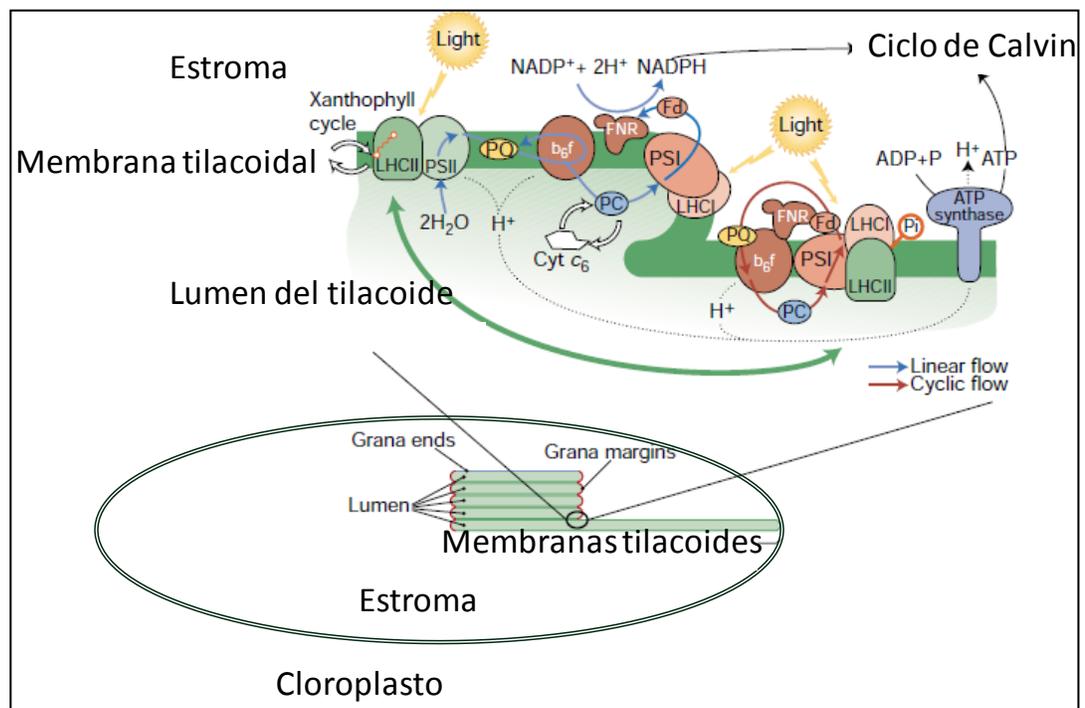


Figura 1. Esquema del cloroplasto y los componentes inmersos a la membrana tilacoidal en los que se lleva a cabo la fotosíntesis. Modificada de Finazzi et al. (2003, p. 755).

El fotosistema I finalmente genera el poder reductor de energía en forma de fosfato de dinucleótido nicotinamida adenina (NADPH) por la transferencia de los electrones al NADP⁺ a través de la ferredoxina. El flujo lineal y un flujo cíclico de electrones alrededor del FS I crean un gradiente de protones trans-tilacoidal necesario para la síntesis del trifosfato de adenosina (ATP) por el complejo enzimático ATP sintasa, que también representa un componente que está integrado en la membrana tilacoidal. El NADPH y el ATP sintetizados por la acción del transporte de electrones en el sistema fotosintético se utilizan para reducir el dióxido de carbono (CO₂) y formar azúcares de 6 carbonos por las enzimas del ciclo de Calvin localizados en el estroma del cloroplasto.

Debido a que la luz es inherentemente variable, las plantas superiores y las algas tienen que regular el proceso fotosintético para maximizar el uso de este recurso. Los períodos de poca luz pueden limitar a la fotosíntesis, sin embargo, al presentarse condiciones de luz alta, la cadena de transporte de electrones puede llegar a saturarse y puede producirse una inactivación y daño en el aparato fotosintético. Por lo tanto, en

condiciones de baja intensidad de luz es necesaria una gran eficiencia de colección de fotones para impulsar el transporte de electrones fotosintéticos y la asimilación de CO₂. En contraste, en altas intensidades de luz, es necesario que la energía de excitación que no puede ser utilizada para la fotosíntesis sea disipada de manera segura. En ambas condiciones, los carotenoides, participan de manera efectiva como reguladores del uso de luz en la fotosíntesis.

1.3 La función de los carotenoides en la regulación de la fotosíntesis

Los carotenoides son un grupo diverso de moléculas lipofílicas compuestas de un esqueleto C₄₀ altamente insaturado. En los organismos fotosintéticos el esqueleto de los carotenoides es construido a partir de unidades isoprenoides. Las estructuras moleculares pueden ser lineales o con anillos en los extremos y se denominan Carotenos cuando su composición es únicamente hidrocarbonada o xantofilas cuando poseen grupos oxigenados. Los carotenoides cumplen diversas funciones en los organismos fotosintéticos, de las que destacan: su función como pigmentos accesorios al ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios (clorofilas) y su función fotoprotectora al participar en el mecanismo de la disipación térmica y presentar acción antioxidante, además los carotenoides modulan la estructura de la membrana tilacoidal y regulan de la síntesis de ácido absícico (ABA) entre otras muchas.

La función de ampliación del intervalo de absorción de luz, es especialmente importante en las algas cromofitas. Las diatomeas y algas pardas presentan la xantofila fucoxantina y los dinoflagelados presentan la xantofila peridinina como principales pigmentos accesorios. Estas xantofilas se encargan de absorber la luz que predomina en las zonas más profundas de la columna de agua y transferirla a moléculas de Chl *a*. La función fotoprotectora de los carotenoides en plantas y algas es doble. El β-caroteno protege el aparato fotosintético al desactivar el estado excitado del oxígeno singulete en el centro de reacción del FSII. Otra función fotoprotectora importante se lleva a cabo por los pigmentos del ciclo de las xantofilas, que impiden la sobreexcitación del FSII al participar directa o indirectamente en la disipación térmica de la energía de excitación de la Chl *a*.

1.4 El ciclo de xantofilas

Se le denomina ciclo de xantofilas a la conversión enzimática de xantofilas epoxidadas a xantofilas libres de grupos epóxido (de-epoxidación) en presencia de luz en exceso y a la reacción inversa, en luz baja o en oscuridad. En plantas superiores, algas pardas y algas verdes, las xantofilas involucradas en el ciclo son violaxantina (Vx), anteraxantina (Ax) y zeaxantina (Zx). La reacción de de-epoxidación de la violaxantina consiste en la eliminación dos grupos epóxidos de manera sucesiva, para formar el intermediario Ax con un grupo epóxido y el producto final Zx, molécula sin grupos epóxidos (Fig. 2). En oscuridad o en luz de baja intensidad la reacción se invierte y se lleva a cabo la formación de Vx a partir de la epoxidación de Ax y Zx.

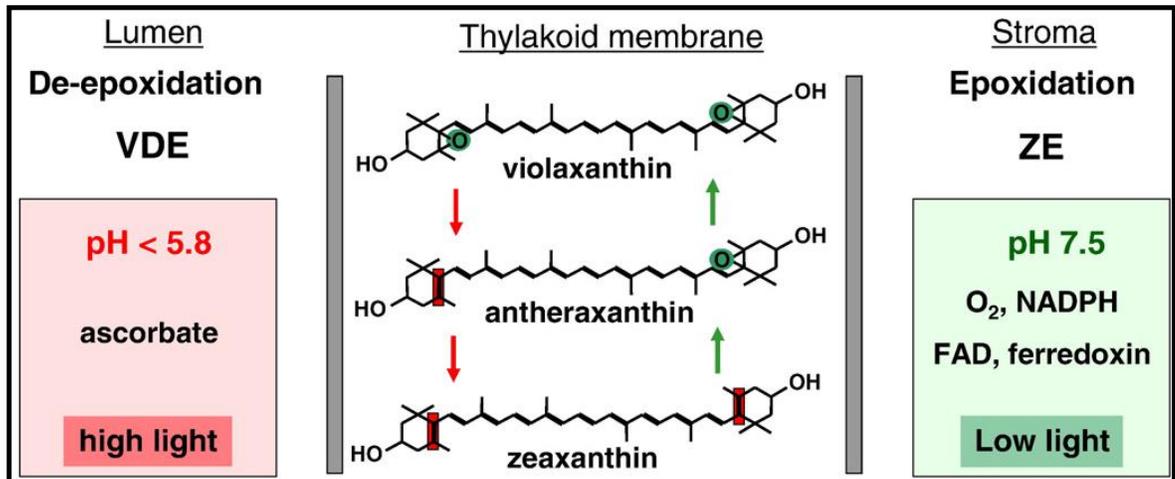


Figura 2. Esquema del ciclo de xantofilas. Tomado de Jahns et al. (2009, p.5). La enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) se encuentra en el lumen, la conversión de los pigmentos violaxantina, anteraxantina y zeaxantina, se lleva a cabo en la membrana tilacoidal. La enzima ZE (Zeaxantina epoxidasa) se encuentra en el estroma. Ver detalles en el texto.

Estas reacciones son catalizadas por dos enzimas diferentes. La enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) cataliza la formación de Zx a partir de Vx, pasando por el intermediario Ax y la enzima zeaxantina epoxidasa (ZE) cataliza la formación de Vx a partir de la Zx y Ax. La VDE se encuentra en el lumen tilacoidal y en plantas superiores presenta la mayor actividad a pH de 5.5, en contraste, la ZE se encuentra en el estroma del

cloroplasto y puede funcionar a pH neutro (Jahns et al. 2009; Goss y Jakob 2010; Jahns y Holzwarth 2012).

El ciclo de xantofilas ha sido ampliamente estudiado por el grupo de Yamamoto y colaboradores (Gilmore y Yamamoto 1993) y la participación de este ciclo en la disipación térmica fue propuesta inicialmente por el grupo de Deeming-Adams (Demmig et al. 1987; Demmig-Adams 1990). Sin embargo, la comprobación final de la participación del CX en la disipación térmica fue dada por Niyogi y colaboradores, quienes utilizaron cepas mutantes del ciclo de xantofilas en cepas del alga verde *Chlamidomonas* (Niyogi et al. 1997a) y de plantas superiores *Arabidopsis* (Niyogi et al. 1998). Los cepas mutantes carentes de Zx, tuvieron una formación deficiente de NPQ, mientras que otros procesos (respiración y fotosíntesis) no se vieron afectados (Niyogi et al. 1997b).

1.5 El NPQ y el ciclo de las xantofilas en plantas superiores

El NPQ es un proceso complejo y altamente regulado, que consiste en la desactivación térmica de los estados excitados de la Chl *a* en la antena del FSII (Demmig-Adams y Adams 1992; Horton et al. 1996; Niyogi 1999; Krause y Jahns 2004). En plantas superiores, los organismos más estudiados, se han caracterizado 4 procesos moleculares con diferentes cinéticas de formación y de disipación que intervienen en el NPQ (Krause et al. 1982; Horton y Hague 1988; Quick y Stitt 1989; Lambrev et al. 2010; Nilkens et al. 2010):

- 1.- **qE**, o quenching energético (Krause et al. 1982),
- 2.- **qT**, quenching de estados de transición (Allen et al. 1981),
- 3.- **qI**, quenching fotoinhibitorio (Krause 1988) y
- 4.- **qZ**, quenching dependiente de la formación de Zx (Nilkens et al. 2010).

El qE que se induce y disipa más rápidamente ($t_{1/2}$ de segundos a minutos) (Horton y Hague 1988; Müller et al. 2001; Lambrev et al. 2010). Este proceso se activa mediante la reducción del pH en el lumen debido a la formación de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide (Δ pH), el cual, es percibido por la proteína PsbS en plantas superiores (Li et al. 2004) o LHCRS en las algas verdes (Peers et al. 2007) y probablemente en las algas pardas y diatomeas (Peers et al. 2009; Bailleul et al. 2010; Dittami et al. 2010).

La protonación de PsbS en plantas superiores induce cambios conformacionales de la antena del FSII que promueven la disipación térmica en este sistema (Li et al. 2004; Horton et al. 2008; Kereiche et al. 2010). La existencia de zeaxantina durante el estrés lumínico acelera la formación de este proceso, sin embargo la ausencia de Zx no interrumpe la formación de qE (Horton y Ruban 2005).

El qT es el proceso con cinética de formación intermedia (minutos) y se relaciona a la reducción de las emisiones de FSII debido a la migración de parte de la antena periférica del FSII a la del FSI (Allen et al. 1981). El papel de este proceso en la fotoprotección se desconoce ya que se presenta solo en condiciones de luz subsaturante y se revierte en luz alta y no contribuye al NPQ (Schansker et al. 2006).

El qZ es un proceso de cinética aun mas lenta (10-30 minutos después de la exposición a la luz) y que depende de la concentración de Zx (Nilkens et al. 2010).

El qI es el proceso asociado con el daño del FSII y su cinética de disipación es la más lenta (varias horas o días) debido a que requiere la reparación del fotosistema (Krause 1988; Aro et al. 1993; Murata et al. 2007). Este componente también se relaciona directamente a la formación de Zx. La contribución relativa de cada uno de los procesos que integran el NPQ así como la duración de cada uno dependen de la intensidad y la duración de la exposición del organismo a la luz (Jahns y Holzwarth 2012). En las plantas superiores qE es el principal proceso del NPQ durante periodos cortos (minutos) de iluminación con luz saturante; mientras que el qI y qZ prevalecen durante periodos de exposición largos a luz alta. En algas pardas como el alga gigante *M. pyrifera*, los procesos que participan en la formación de NPQ no han sido caracterizados.

1.6 Generalidades de *M. pyrifera*

El alga parda *M. pyrifera* o sargazo gigante, se clasifica en la división Heterokontophyta; clase Phaeophyceae; orden Laminariales; familia Lessoniaceae; género *Macrocystis*; especie *M. pyrifera*. Es el alga más grande y de mayor tasa de crecimiento. Sus comunidades, denominadas bosques de macroalgas, sirven de hábitat, refugio y alimento a un gran número de organismos, por lo que se considera una especie clave (Lobban y Harrison 1994, Lüning 1991).

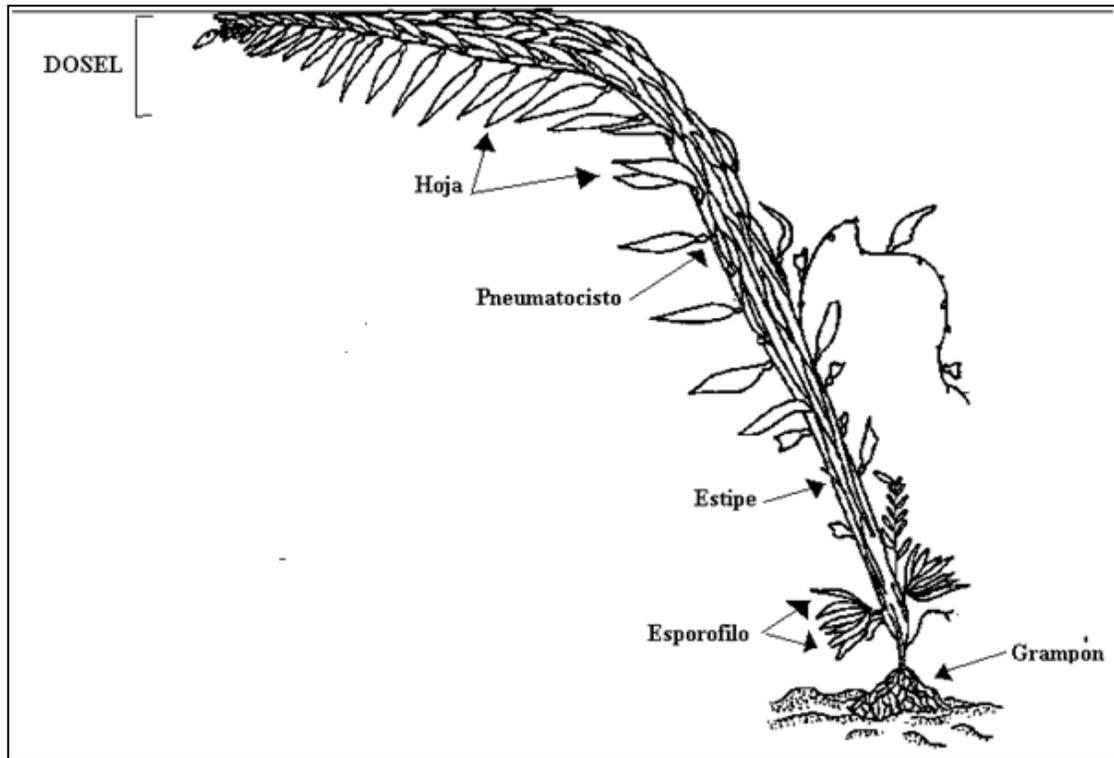


Figura 3. Representación de un organismo adulto de 1-2 años de edad de *M. pyrifera* donde se muestran las distintas partes que conforman un organismo. Tomado de Neushul y Haxo (1968, p. 40).

M. pyrifera presenta hojas a lo largo de todo el organismo y en la base de cada hoja presenta órganos de flotación llamados pneumatocistos. El órgano de soporte análogo al tallo de plantas superiores se denomina estipe y el órgano de fijación es el grampón. La fronda es el conjunto de todas las hojas que crecen a partir de un mismo estipe (Fig. 3). Un organismo adulto puede tener hasta 100 frondas y unas 300 hojas a lo largo de cada estipe (North 1971). Las frondas viven en promedio 6-9 meses y una hoja vive en promedio 4 meses (North 1971). La porción del organismo (hojas y estipes) que sobresale en la superficie de la columna de agua forma el dosel y puede extenderse por más de 20 metros. Todas las hojas del organismo aún en diferente posición de la columna de agua, tienen capacidad fotosintética, sin embargo las hojas del dosel aportan la mayor parte del fotosintetato al organismo debido a que reciben la mayor cantidad de luz y a que presentan la mayor capacidad de fotoprotección (Colombo-Pallotta et al. 2006; Colombo Pallotta

2006). *M. pyrifera* se distribuye en los dos hemisferios. En el hemisferio Norte abarca desde Point Conception USA, hasta la zona de Bahía Asunción, Baja California, México (North 1971). Mientras, en el hemisferio sur se presenta desde Perú hasta Cabo de Hornos en Chile. También se encuentra en el sur de África y Australia (North 1971) (Fig. 4). Estos sitios se caracterizan por presentar eventos de surgencias costeras frecuentes, con agua por debajo de los 20°C ricas en nutrientes (North 1971).

1.7 Variabilidad de la luz y la temperatura en un manto de *M. pyrifera*

La distribución de luz en el mar presenta un decaimiento exponencial con la profundidad y sufre cambios espectrales debido a procesos de absorción y atenuación en el agua (Kirk 1992). Sin embargo, en un manto de *Macrocystis* la distribución de la luz es mucho más compleja. La densidad del dosel puede producir el fenómeno de autosombreado a las hojas más profundas, mientras que el movimiento inducido por corrientes, oleaje y mareas producen fenómenos de autoenfoco en las hojas de superficie y la formación temporal de huecos de luz hacia los primeros metros de profundidad que pueden durar de segundos a minutos, por lo que la mayor variabilidad de la luz se da en los primeros metros de profundidad (Gerard 1984; Dean 1985; Wing et al. 1993; Colombo-Pallotta et al. 2006).

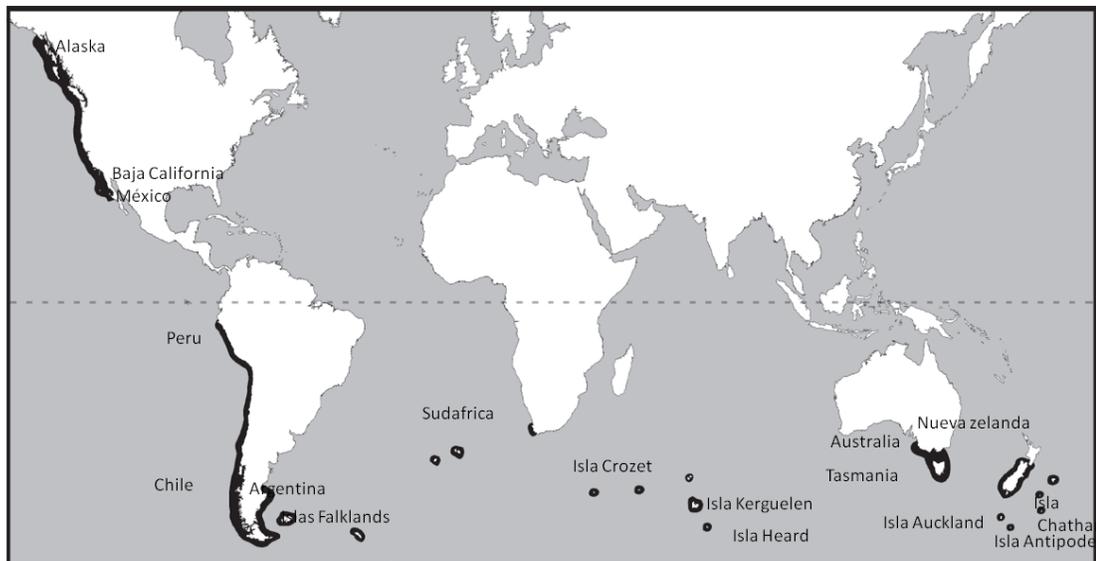


Figura 4. Distribución global de *M. pyrifera*.

La alta variabilidad de la luz en la superficie y a menos de 3 m de profundidad, ocasiona que las hojas de *M. pyrifera* de estas profundidades presente mayor capacidad de fotoprotección, para poder mantener una tasa óptima de fotosíntesis (Colombo-Pallotta et al. 2006). En tejido del dosel se han reportado valores de NPQ que varían desde las 6 hasta las 10 unidades mientras que en el tejido por debajo de 6 m de profundidad los valores de NPQ oscilan entre 0.5 y 2 (Colombo-Pallotta et al. 2006). Así mismo, el tamaño del pool de pigmentos de la xantofilas (ΣCX) en tejido del dosel oscila entre los 18 y 25 mol mol⁻¹ de Chl *a* x 100, mientras que en el tejido por debajo de 6 m de profundidad los valores del ΣCX son menores a 6 mol mol⁻¹ de Chl *a* x 100. Dadas estas coincidencias entre mayores valores de NPQ y mayores valores del ΣCX , es posible sugerir que hay una relación entre el tamaño del pool (ΣCX) y la amplitud máxima del NPQ, sin embargo no se han realizado estudios que permitan establecer esta relación por lo que aún no está claro cuál es la función de tener un ΣCX extremadamente grande.

La temperatura en un manto de *M. pyrifera* es muy variable en función de la profundidad y además presenta una variación estacional relacionada al régimen de surgencias, sin embargo difícilmente sobrepasa los 20 °C. 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 Lydia y Zertuche-González 2004). Se sabe que, entre 14 y 18 °C la tasa de crecimiento de *M. pyrifera* es constante, mientras que a temperaturas mayores la tasa disminuye significativamente. La temperatura superior a 20 °C frecuente en eventos NIÑO, se ha asociado al deterioro de los mantos y a la pérdida de poblaciones adultas de *M. pyrifera* (Ladah et al. 1999). Sin embargo no está claro si la temperatura superior a 20 °C afecta de manera particular algún proceso fisiológico. Un incremento de temperatura por encima de los 15.5 °C en el agua de mar en el Sistema de la Corriente de California esta asociada con una disminución de nutrientes, específicamente con valores de nitrato por debajo de 1µM (Jackson 1977). Debido a que el ciclo de las xantofilas es un proceso enzimático, es probable que la temperatura afecte la velocidad de las reacciones involucradas en este del ciclo y en consecuencia afecte la formación de NPQ y la capacidad de fotoprotección del alga *Macrocystis pyrifera*.

1.8 Alcances de esta tesis

El presente trabajo se centra en la caracterización de la interconversión de los pigmentos del ciclo de xantofilas y su efecto sobre la formación/disipación del mecanismo de disipación térmica del alga parda *M. pyrifera*. La disipación térmica del exceso de energía es un mecanismo presente en los organismos fotótrofos, que les permite asimilar la energía de la luz de manera segura, evitando un posible fotodaño en condiciones de alta luz. Tres elementos son indispensables para llevar a cabo la disipación térmica: el establecimiento de un gradiente de protones (ΔpH) intertilacoidal, proteínas específicas del fotosistema II (PsbS en plantas superiores o proteínas tipo L1818 en otras algas) y la formación de pigmentos fotoprotectores deepoxidados a partir de pigmentos epoxidados (ciclo de xantofilas). En la macroalga *M. pyrifera*, el principal elemento de control de la disipación térmica es el ciclo de xantofilas. El tejido fotosintético de *M. pyrifera* se encuentra sujeto a una alta variabilidad de luz, tanto espacial como temporalmente, por lo que su mecanismo de disipación térmica debe estar finamente regulado para evitar el fotodaño en condiciones de exceso de luz y al mismo tiempo ser eficiente en la absorción de energía en condiciones de baja irradiancia. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue caracterizar la influencia de las reacciones de interconversión de los carotenoides del ciclo de xantofilas sobre el mecanismo de disipación del exceso de energía en *M. pyrifera* medido como la disminución no fotoquímica de la fluorescencia del fotosistema II (NPQ).

Ya que la disipación del exceso de energía en *M. pyrifera* depende del ciclo de las xantofilas, se plantea como hipótesis general que cualquier variable ambiental que afecte las reacciones de interconversión de los pigmentos de este ciclo afectará directamente la formación de NPQ.

En el capítulo 2 de esta tesis, se caracterizó la cinética de formación y disipación del NPQ para evaluar los procesos que interviene en la disipación termica en *M. pyrifera*. Se caracterizó la cinética de formación y disipación del NPQ y su relación con la interconversión de los pigmentos del ciclo de las xantofilas en. Se evaluó la velocidad de síntesis de Ax y Zx a diferentes periodos de iluminación y se relacionaron con la formación de NPQ. Se demuestra que en *M. pyrifera*, el NPQ depende exclusivamente en la formación de Zx de manera análoga al qZ encontrado en plantas superiores. Además se

encontró que luego de una exposición prolongada a alta luz, la disipación del NPQ en oscuridad no fue total. El NPQ remanente estuvo asociado a la retención de Ax y Zx y fue relacionado con el quenching fotoinhibitorio qI.

En el capítulo 3, se probó si el tamaño del pool de carotenoides del ciclo de xantofilas (ΣCX) afecta las reacciones de deepoxidación y epoxidación del ciclo de CX y con ello la formación de NPQ. Para ello se caracterizó la cinética de las reacciones de interconversión del ciclo de xantofilas y la formación de NPQ en tejido de *M. pyrifera* con contenido de xantofilas distinto y expuesto a diferentes intensidades de luz. Se caracterizó la cinética de formación de NPQ a diferentes condiciones de iluminación y en muestras que presentaron diferentes concentraciones de pigmentos del ciclo de xantofilas. Se demostró que el NPQ depende directamente del estado de deepoxidación de los pigmentos del CX. Además se demostró que en *M. pyrifera* el tamaño del pool (ΣCX) de carotenoides del ciclo de xantofilas esta directamente relacionado con la tasa de formación del NPQ, pero no tiene efecto en la amplitud máxima del NPQ. Asimismo, se observó que la intensidad de luz afecta tanto la cinética de formación de NPQ así como el nivel de este proceso.

En el capítulo 4 se evaluó el efecto de la temperatura sobre las reacciones del ciclo de las xantofilas y la formación de NPQ en *M. pyrifera*. Ya que la interconversión de los pigmentos del CX depende de la actividad enzimática, y ésta puede verse afectada por la temperatura, se evaluó si la temperatura ejercía una influencia *in vivo* sobre la interconversión de los pigmentos y la formación del NPQ de *M. pyrifera*. Se evaluó la cinética de interconversión de pigmentos y de formación de NPQ en luz saturante en el tejido de *M. pyrifera* del dosel expuesto desde 10 °C hasta 25 °C. Se observó que la tasa de formación de NPQ es afectada por la temperatura ya que esta variable afecta la reacción de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas. Se demostró que a mayor temperatura existe una mayor tasa de de-epoxidación. Sin embargo, se encontró que la eficiencia de los pigmentos de-epoxidados para inducir el NPQ fue menor a mayores temperaturas. Específicamente, a temperaturas mayores a 20 °C la formación de NPQ fue más rápida y se observan asimismo valores mayores de esta variable, sin embargo la

eficiencia de los pigmentos de-epoxidados es menor. La tasa de transporte de electrones también se vio seriamente afectada a temperaturas de 20°C.

Finalmente, en el capítulo 5 se presenta una discusión general sobre los resultados de esta tesis dentro de un marco ecológico y evolutivo. Se discute la influencia de la tasa de formación de NPQ debido a los cambios de intensidad de luz y al tamaño del pool de carotenoides del ciclo de xantofilas, como una alternativa usada por *M. pyrifera* para enfrentar los daños inherentes a la variabilidad ambiental de la luz. También se discute el efecto de la cinética de conversión de pigmentos y la acumulación de Ax sobre la formación de NPQ. Se propone que la acumulación de Ax es un componente de control de NPQ análogo a la preactivación de luz dependiente de Zx preformada presente en plantas. Se plantea la importancia de conservar un pool de Ax para asegurar una respuesta mucho más rápida en hojas expuestas a una variabilidad alta de luz y la capacidad de regular a través del ciclo de xantofilas incluso la formación temporal de NPQ en las hojas aclimatadas a oscuridad que son expuestas rápidamente a luz baja. Finalmente, se discute el efecto de la temperatura sobre la regulación del NPQ y el efecto que puede tener a nivel fisiológico y ecológico.

1.9.1. Objetivo general

Caracterizar la influencia de las reacciones de interconversión de los carotenoides del ciclo de xantofilas sobre el mecanismo de disipación del exceso de energía en *M. pyrifera*.

1.9.2. Hipótesis general

La formación de NPQ en *M. pyrifera* depende principalmente de las reacciones de interconversión del ciclo de xantofilas, por lo que los factores que puedan afectar estas reacciones afectan la formación de NPQ.

1.9.3. Hipótesis particulares

Capítulo 2

La cinética de formación/disipación de NPQ en *M. pyrifera* esta relacionada con la interconversión de los pigmentos del ciclo de las xantofilas

Capítulo 3

El tamaño del conjunto de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX), afectan las reacciones de deepoxidación y epoxidación del ciclo de xantofilas y con ello la formación de NPQ en *M. pyrifera*.

Capítulo 4

La temperatura afecta las reacciones del ciclo de las xantofilas y en consecuencia la formación de NPQ en *M. pyrifera*.

Capítulo 2

Cinética de formación y disipación de NPQ y su relación con la interconversión de los pigmentos del ciclo de xantofilas

2.1 Introducción

Los organismos fotosintéticos tienen la capacidad de eliminar la energía que no pueden usar en el proceso de fotosíntesis y de esta manera se protegen del daño oxidativo que esta les podría ocasionar. El mecanismo principal de eliminación de exceso de energía consiste en la desactivación térmica de los estados excitados de la clorofila *a* en la antena del FSII (Demmig-Adams y Adams 1992; Horton et al. 1996; Niyogi 1999; Krause y Jahns 2004). La disipación térmica posible estimarla *in vivo* y de manera no intrusiva mediante la medición de la disminución no fotoquímica de la fluorescencia de la clorofila *a* (NPQ; nonphotochemical quenching) (Krause y Jahns 2004).

En plantas superiores mediante la caracterización de la cinética de formación y disipación del NPQ se ha podido dilucidar los procesos moleculares que intervienen en la disipación térmica del exceso energético en el aparato fotosintético. Se ha descrito que para la formación de NPQ es necesaria la formación de un gradiente de protones a través de la membrana tilacoide (Briantais et al. 1979), la formación de zeaxantina a través del ciclo de xantofilas (Demmig et al. 1987; Niyogi et al. 1998) y la activación y cambio conformacional de la proteína PsbS (Li et al. 2000; Li et al. 2002; Li et al. 2004). Estos procesos moleculares, participan de manera distinta durante la formación de NPQ, que ha sido dividido con base en su cinética de disipación en 4 componentes:

1.- qE, o quenching energético, es el componente de formación y disipación rápida ($t_{1/2}$ 10-200 seg) que depende esencialmente de la formación y disipación del gradiente de protones que se forma a través de la membrana tilacoide (Krause et al. 1982), el cual promueve cambios conformacionales en la antena del fotosistema II activados por la

protonación de la proteína PsbS, la zeaxantina (Zx) no es indispensable para la formación del qE, pero si la Zx está presente, el qE se acelera y la amplitud del NPQ máximo aumenta.

2.- qI, o quenching fotoinhibitorio, es el componente que está asociado al daño del FSII y su disipación es la más lenta de todos los componentes (varias horas o días) debido a que requiere la reparación de este sistema. Durante el tiempo de duración del qI, aun en oscuridad se mantienen los cambios conformacionales en la antena del FSII y se mantiene la presencia de zeaxantina hasta que el fotodaño ha sido reparado (Krause 1988; Aro et al. 1993; Murata et al. 2007);

3.- El qT, o quenching asociado a los estados de transición, se asoció originalmente a la reducción de las emisiones del FSII debido a la migración de parte de la antena periférica del FSII a la del FSI (Allen et al. 1981) y se le consideró de duración intermedia ($t_{1/2}$ 8-15 min), sin embargo este fenómeno de migración de proteínas solo se presenta en condiciones de luz subsaturante y se revierte en luz alta, por lo que se ha sugerido que su participación en el proceso de NPQ ha sido asignado erróneamente (Schansker et al. 2006);

4.- El qZ, o quenching dependiente exclusivamente de la formación de zeaxantina (Zx), ha sido caracterizado recientemente (Nilkens et al. 2010). Este componente se forma a partir de los 10-30 minutos de exposición a alta luz y depende de la presencia de zeaxantina aun en ausencia de PsbS y del gradiente de protones.

El NPQ es un proceso complejo que puede presentar variaciones entre diferentes organismos. Por ejemplo, en el alga parda *Macrocystis pyrifera* la formación de NPQ es más lenta pero alcanza valores mucho más altos que en plantas superiores ($t_{1/2}$ 3-6 min, $NPQ \approx 10$) (Colombo-Pallotta et al. 2006). Se ha demostrado que en esta alga el mecanismo de control del NPQ es dependiente del CX e independiente del gradiente de protones (García-Mendoza y Colombo-Pallotta 2007). La aceleración del NPQ, por la presencia de Zx preformada, no se presenta en *Macrocystis pyrifera* y la cinética de NPQ depende por completo de la cinética del ciclo de xantofilas (García-Mendoza et al. 2011).

En *M. pyrifera* no se encuentran los componentes que regulan el qE en plantas superiores como la proteína PsbS (Li et al. 2004). No se reporta una proteína homóloga en algas pardas (Cock et al. 2010; Dittami et al. 2010). Así mismo, este grupo de organismos

no presenta estados de transición (Fork et al. 1991). Por lo tanto, la cinética de formación y disipación del NPQ debe estar dominada por el componente qZ o un componente análogo y probablemente el componente qI . Para demostrar lo anterior, en este capítulo se caracterizó la cinética de disipación de NPQ así como de la cinética de interconversión de pigmentos en *M. pyrifera*.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1. Material de estudio

Las muestras de *Macrocystis pyrifera* fueron recolectadas en junio del 2010 en 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. Para este experimento se colectaron 5 hojas de la superficie, las cuales fueron etiquetadas, mantenidas en oscuridad y transportadas al laboratorio en hieleras con agua de mar. El tiempo entre la recolecta y el procesamiento de las muestras no excedió las 2 horas. Con un sacabocados, se obtuvieron discos de tejido de 1.2 cm de diámetro, los cuales fueron aclimatados en baja luz y después en oscuridad, para disminuir la presencia de los pigmentos fotoprotectores Zx y Ax . Del pool de discos ya aclimatados, se tomaron al azar por triplicado los discos para la medición de la cinética de disipación del NPQ y de interconversión de pigmentos xantofílicos en oscuridad, después de diferentes periodos de iluminación a condiciones de luz saturante. La formación de NPQ se realizó exponiendo el disco a $1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 60 minutos. La disipación de NPQ en oscuridad se midió en discos preiluminados a 4, 6, 10, 20 y 50 minutos, a la misma intensidad de luz. La interconversión de pigmentos se midió en submuestras a las mismas condiciones de la medición de NPQ.

La cinética de disipación de NPQ y de interconversión de pigmentos fue evaluada de acuerdo a Nilkens et al (2010), usando la función $y = A_1 \exp(-t/\tau) + y_0$, donde A representa la amplitud del primer componente cinético y τ representa el tiempo de vida medio de ese primer componente, la amplitud del segundo componente está representada por y_0 .

2.2.2. Mediciones de fluorescencia de clorofila *a*.

Las mediciones de fluorescencia de clorofila *a* (Chl *a*) para cada disco se realizaron con un fluorómetro de pulsos 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). 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 ($2600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). F_0 se determina 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) se calculó mediante la fórmula:

$$\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} E_{\text{PAR}} 0.5 0.80 \quad (4)$$

donde Φ_{PSII} es la eficiencia cuántica efectiva del FSII determinada como $(F'_m - F)/F'_m = \Delta F/F'_m$. F'_m y F son la fluorescencia máxima y mínima en presencia de luz actínica, respectivamente. E_{PAR} , es la intensidad lumínica aplicada en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 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).

2.2.3. Análisis de Pigmentos.

Durante los experimentos de formación y disipación de NPQ, se tomaron muestras para la medición de pigmentos a diferentes tiempos durante el periodo de iluminación y después de que la luz fue apagada. Cada disco colectado, fue congelado inmediatamente y almacenado en nitrógeno líquido ($-77 \text{ }^\circ\text{K}$). Los pigmentos fueron extraídos y analizados de acuerdo con Colombo Pallotta (2006). Los pigmentos fueron extraídos en 3 mL de acetona fría, luego de la molienda del disco previamente congelado en nitrógeno líquido. Para asegurar una buena extracción, se dejó el tejido con el solvente a 4°C durante toda la noche y después se centrifugó a $13,000 \times g$ ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) por 5 minutos. El sobrenadante con los

pigmentos se almacenó a -20°C antes del análisis por HPLC. El instrumento de HPLC, Shimadzu AV-10 (Kyoto, Japon) fue equipado con una columna de fase reversa (4.6 mm x 150 mm, $3.5\ \mu\text{m}$ tamaño de partícula) Zorbax Eclipse XDB C8 (Agilent Technologies, Englewood, CO). El sistema fue calibrado con estándares externos (DHI Inc., Hoersholm, Denmark).

2.3 Resultados

2.3.1. Formación de NPQ y su relación con el ciclo de xantofilas

Se calculó la tasa de transporte de electrones (ETR, Electron Transport Rate por sus siglas en ingles) con la finalidad de demostrar que la intensidad de luz utilizada era lo suficientemente alta para saturar el transporte de electrones e inducir el máximo de NPQ sin provocar daño fotooxidativo. Tal como se muestra en la figura 5A, el ETR alcanzó su nivel máximo aproximadamente a los 15 minutos y después permaneció constante lo que indicó que esta condición de luz utilizada no provocó la reducción del ETR asociada a un posible fotodaño durante el periodo de iluminación. Una vez demostrada la validez de la metodología, se evaluó la cinética de la formación de NPQ. En la figura 5B se muestra que el NPQ alcanzó su nivel de saturación con una amplitud máxima de aproximadamente 7 unidades, el cual es mayor al valor de NPQ máximo que presentan las plantas superiores (Colombo-Pallotta et al. 2006; Garcia-Mendoza et al. 2011).

La relación entre la cinética de NPQ y de interconversión de carotenoides, permitió inferir distintos procesos, específicamente los dependientes del ciclo de xantofilas. Se observó que la formación de NPQ coincide con la disminución de V_x y la formación de A_x y Z_x (Fig. 1C). Además, tal como había sido reportado previamente (Garcia-Mendoza y Colombo-Pallotta 2007; Garcia-Mendoza et al. 2011), no se observó un incremento rápido del NPQ (qE) durante los primeros segundos de iluminación, el cual es independiente de Z_x . En contraste, en los primeros segundos se registró un retraso en la formación de NPQ que también coincide con un retraso en la formación de Z_x , mientras que la formación de A_x durante los primeros segundos fue rápida (Fig. 5).

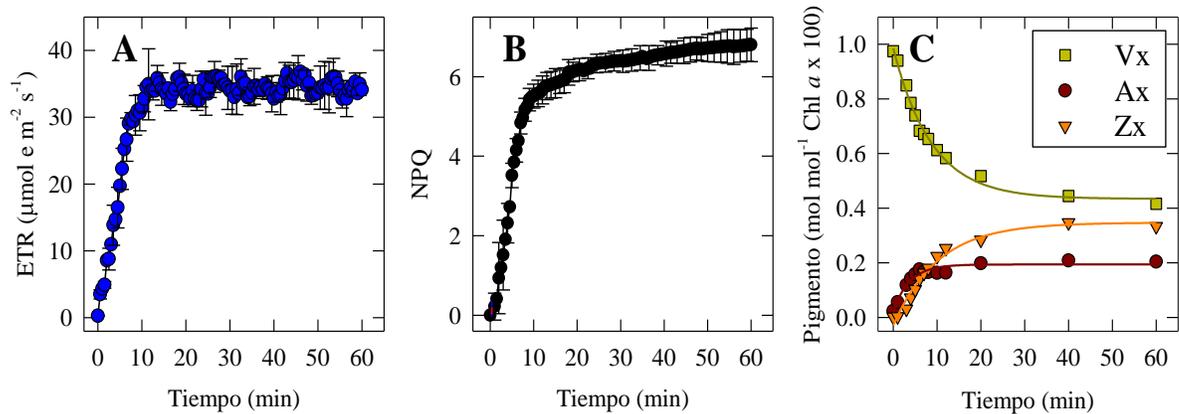


Figura 5. Tasa de transporte de electrones (ETR), nonphotochemicalquenching (NPQ) y pigmentos del ciclo de xantofilas de muestras de *M. pyrifera* expuestas a $1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 60 minutos. Se muestran los valores promedio de 5 mediciones independientes \pm desviación estándar.

El cambio de NPQ así como el cambio de la concentración relativa de los pigmentos deepoxidados expresada como DPS (Fig. 6), se ajustaron a una exponencial simple. En contraste, los cambios de NPQ se ajustan a una exponencial doble en plantas superiores (Nilkens et al 2010). Esto indica que el componente rápido presente en plantas superiores (qE) no está presente en *Macrocystis pyrifera*. El τ obtenido del ajuste al modelo exponencial simple para el NPQ (6.1 ± 0.8 , Tabla I) y para el DPS (6.9 ± 0.9 , Tabla I) no fue diferente ($t_{\alpha} = 0.05$). Esto indica que la formación de NPQ en *Macrocystis pyrifera* es dependiente de la formación de los pigmentos deepoxidados (DPS).

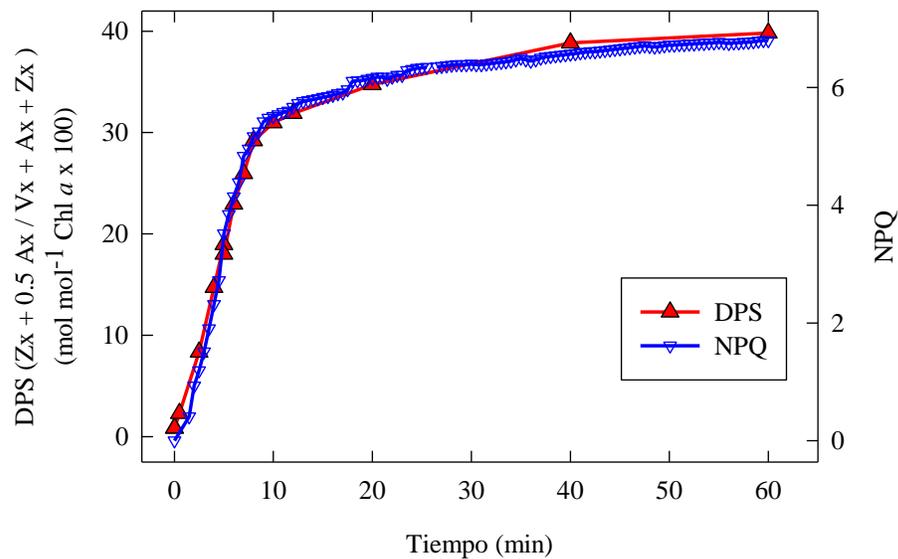


Figura 6. Estado de deepoxidación de los pigmentos xantofílicos (DPS) y el NPQ a través del tiempo.

Tabla I. Parámetros de la cinética de formación de NPQ y del cambio del estado de deepoxidación de los pigmentos xantofílicos DPS al exponer las muestras de *M. pyrifera* a 1000 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 60 minutos.

	A	τ
NPQ	7.1 ± 0.2	6.1 ± 0.8
DPS	39.6 ± 0.9	7.0 ± 0.9

El promedio de los datos de la curvas de formación de NPQ y DPS de la Figura 6 fueron ajustados a un modelo de decaimiento de una exponencial simple: $y=y_0+A(1-\exp(-t/\tau))$. Se presenta el valor del parámetro \pm el error estándar del ajuste, r^2 fue mayor a 0.99 en ambos casos.

2.3.2. Disipación de NPQ y su relación con el ciclo de xantofilas

La cinética de disipación es una herramienta para caracterizar los procesos del NPQ (Horton y Hague 1988; Demmig-Adams et al. 1989); recientemente con los parámetros obtenidos a partir del ajuste a un modelo de decaimiento exponencial doble en cinéticas de NPQ en varias cepas de *Arabidopsis* mutantes, se ha logrado describir y reclasificar los componentes cinéticos y los procesos que contribuyen al NPQ (Nilkens et al. 2010). Análogamente a la aproximación seguida por Nilkens et al (2010) se caracterizó la disipación del NPQ en *M. pyrifera* después de haber sido expuesta a periodos de tiempo de

4, 6, 10, 20 y 50 minutos a $1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 7). Los datos de cada tratamiento se ajustaron a una función de decaimiento de una sola exponencial y se obtuvieron los parámetros descritos en la Tabla II. Al igual que en la formación de NPQ el r^2 fue mayor de 0.95 con un ajuste utilizando un solo exponente, lo que indica que solamente dos componentes moleculares intervienen en el proceso de NPQ en esta alga.

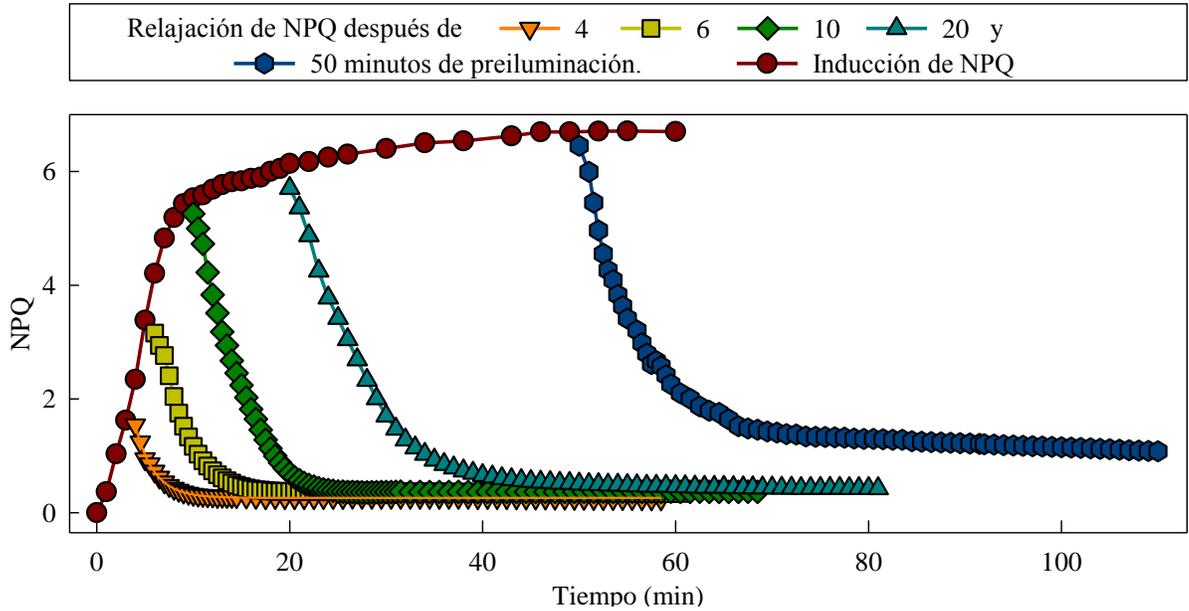


Figura 7. Formación y disipación de NPQ en muestras de *M. pyrifera* después de diferentes periodos de preiluminación. La disipación de NPQ fue medida después de 4, 6, 10, 20 y 50 minutos de iluminación a $1000 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Por claridad, solo se muestran los datos promedios de 3 a 5 mediciones independientes y se omite la DS.

Tabla II. Parámetros de la cinética de disipación de NPQ en oscuridad después de 4, 6, 10, 20 y 50 minutos de preiluminación.

Tiempo de preiluminación (min)	A	τ_1	y_0
4	1.2 ± 0.0	2.1 ± 0.2	0.3 ± 0.0
6	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.3	0.3 ± 0.0
10	5.4 ± 0.1	4.9 ± 0.4	0.3 ± 0.0
20	5.4 ± 0.1	5.6 ± 0.7	0.5 ± 0.0
50	5.5 ± 0.1	5.2 ± 0.8	1.2 ± 0.0

El promedio de los datos de NPQ de la figura 7 fue ajustado al modelo exponencial simple $y=y_0+A(1-\exp(-t/\tau))$. Se presenta el valor del parámetro \pm el error estándar del ajuste del parámetro respectivo. El r^2 fue mayor a 0.99 en todos los casos.

El tiempo de vida del componente principal de la cinética de NPQ varió desde 2.1 min en las muestras preiluminadas por 4 min hasta 5.6 minutos en la muestra preiluminada durante 20 minutos, este componente fue dominante en esta alga y su comportamiento está determinado por el cambio en la concentración de los pigmentos deepoxidados.

Como se expuso anteriormente, durante todo el periodo de iluminación no se observó una reducción en la tasa de transporte de electrones por lo que no existió fotoinhibición durante este periodo; sin embargo, la recuperación del NPQ y del estado de deepoxidación del pool de pigmentos del CX no regresó a niveles originales durante el tiempo de experimentación (60 min). El NPQ residual, identificado con el parámetro y_0 , estuvo presente incluso desde el periodo de iluminación más corto y se incrementó con el tiempo de preiluminación. Con una preiluminación de 60 min este componente representó aproximadamente el 20% del NPQ formado durante el periodo de iluminación.

La concentración de pigmentos xantofílicos durante la formación y disipación de NPQ se muestra en la Figura 8. La síntesis de Vx en oscuridad después de diferentes periodos de preiluminación nunca había sido investigada en *M. pyrifera* y no se conocía su efecto en la disipación del NPQ. En la figura 8A, se muestra la disminución de la concentración Vx durante la exposición de luz y el aumento de Vx cuando la luz se apagó. Se detectó que después de la iluminación, la concentración de Vx no fue igual que antes de la iluminación.

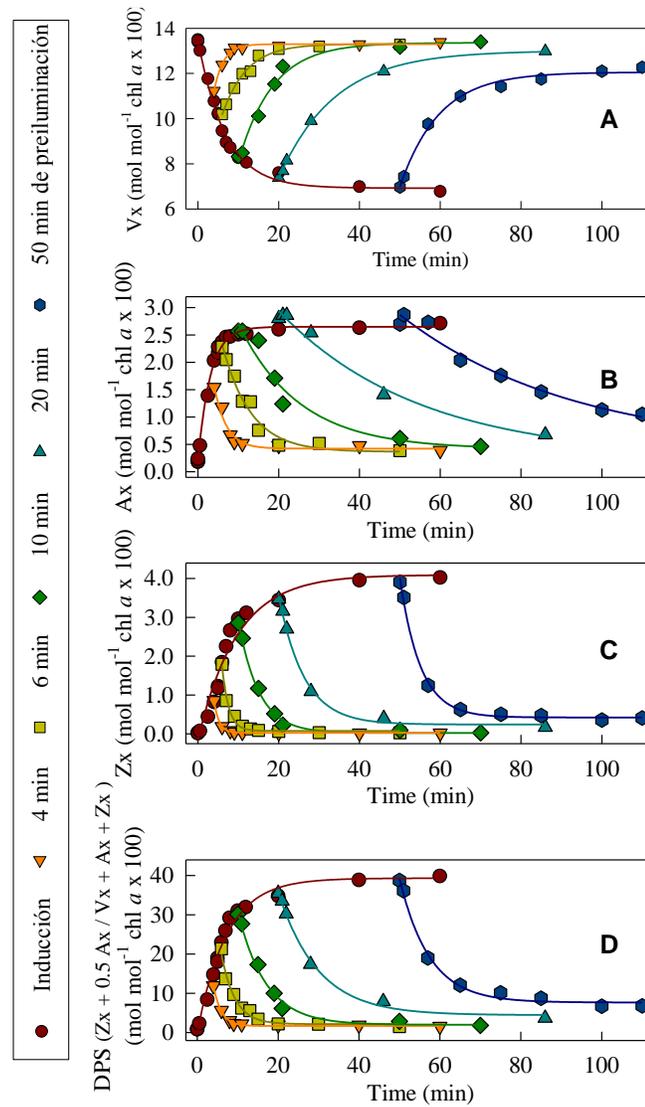


Figura 8. Concentración de violaxantina (Vx; Panel A), anteraxantina (Ax; Panel B), zeaxantina (Zx; Panel C) y el estado de deepoxidación (DPS; Panel D) del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas en muestras de tejido superficial de *Macrocystis pyrifera*. Las muestras de *Macrocystis pyrifera* del dosel fueron expuestas a $1000 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 4, 6, 10, 20 y 50 minutos. Por claridad, solo se muestran los datos promedios de 3 a 5 mediciones independientes y se omite la DS.

La concentración de Vx fue menor cuando las muestras fueron preiluminadas durante más tiempo. Después de una hora en obscuridad, en muestras preiluminadas por 50 min se detectó 13% menos Vx que la concentración medida antes del tratamiento de luz. Hasta un 8% menos Vx, cuando las muestras se preiluminaron por 20 min y 4% menos Vx cuando el periodo de iluminación fue igual o menor a 10 min.

Para evaluar la influencia de cada uno de los pigmentos xantofílicos en la formación de NPQ, se relacionaron las concentraciones individuales de los diferentes pigmentos xantofílicos y se realizaron análisis de regresión lineal (Fig. 9).

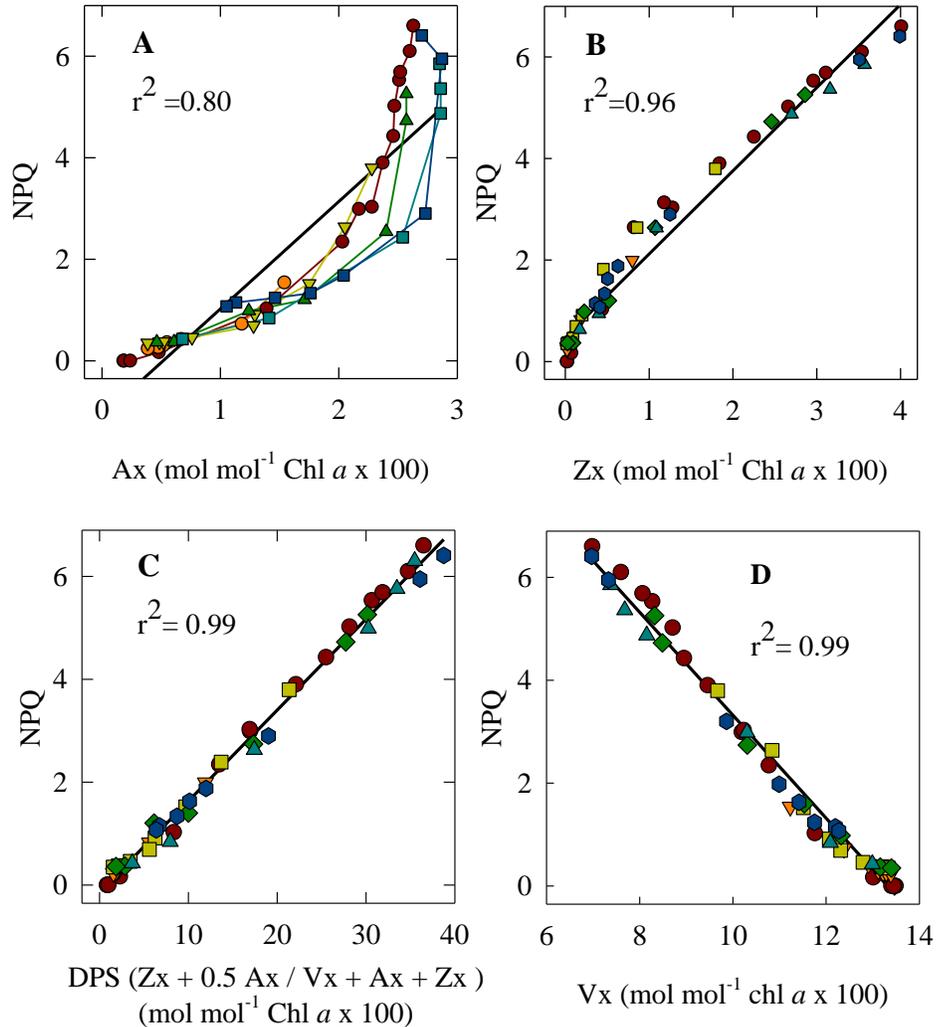


Figura 9. Relación del NPQ y la concentración de pigmentos xantofílicos. Panel A, relación entre la anteraxantina (Ax) y el NPQ. B) Relación entre la zeaxantina (Zx) y el NPQ. C) relación entre el estado de deepoxidación (DPS) y el NPQ. Los datos de pigmentos y de NPQ fueron tomados de las figuras 7 y 8 respectivamente. La identificación de colores sigue el mismo formato que en la figura 8.

Como se muestran en la figura 9A, la relación entre la concentración de Ax y el NPQ presentó un r^2 de 0.8, no obstante la relación entre la concentración de Zx y el NPQ mostró un r^2 de 0.96 tal como había sido reportado previamente (García-Mendoza y

Colombo-Pallotta 2007; Garcia-Mendoza et al. 2011). Sin embargo, al relacionar el estado de deepoxidación, el cual relaciona ambos pigmentos y no solo la zeaxantina, se encontró una relación lineal casi perfecta con un r^2 de 0.99.

Esta relación, se probó también con la concentración de V_x la cual también mostró un r^2 de 0.99. Los resultados y los análisis presentados indican que no es la concentración absoluta de Z_x la que controla la formación de NPQ sino es la relación entre los pigmentos deepoxidados y los pigmentos epoxidados que juegan un papel importante en el control de este proceso.

2.4 Discusión.

En estudios previos se ha demostrado mediante el uso de inhibidores del ciclo de xantofilas y protonoforos que el alga parda *M. pyrifera* carece del componente dependiente de la formación del ΔpH (qE), pero es dependiente de la formación de Z_x mediante el CX (Garcia-Mendoza y Colombo-Pallotta 2007). Asimismo, mediante experimentos de inducción de NPQ en muestras preiluminadas (preactivadas) se comprobó que *M. pyrifera* tampoco presenta la aceleración del NPQ cuando existe Z_x preformada en el aparato fotosintético, la cual es también característica del qE (Garcia-Mendoza et al. 2011). En el presente trabajo se analizó la cinética de disipación del NPQ y se identificaron solo dos componentes que participan en formación del NPQ en *M. pyrifera*. Estos componentes dependen de la deepoxidación de V_x a través del ciclo de xantofilas y son independientes de la formación de un gradiente de protones.

Los cambios de NPQ y DPS se pudieron explicar mediante un modelo exponencial simple, lo que confirma la presencia de dos componentes que intervienen en la formación y disipación de NPQ en *M. pyrifera* (c.f. Fig. 6 y Fig. 9C). El primer componente se desarrolló inmediatamente al exponer las muestras a luz saturante y presentó un τ de ~ 5 min. Una característica importante de este componente, es que la amplitud del mismo no cambia una vez que llega a su estado de saturación después de los 10 minutos ($A \sim 5.4$), por lo que no está relacionado con el proceso de fotoinhibición sino solo con la formación de pigmentos deepoxidados. Estas características representan una gran similitud con el qZ presente en plantas superiores (Nilkens et al. 2010). El qZ no depende de la proteína PsbS,

ya que éste componente se desarrolla por completo en el mutante deficiente de esta proteína (npq4), ni depende de la formación de estados de transición ya que se desarrolló por completo en el mutante (stn7), qZ en cambio, depende únicamente de la formación de Zx mediante el ciclo de las xantofilas (Lambrev et al. 2010; Nilkens et al. 2010; Jahns y Holzwarth 2012). En *M. pyrifera* este componente tipo qZ fue el componente principal llegando a representar más del 80% del NPQ inducido en alta luz. Este es sin duda un resultado importante ya que qZ puede ser un mecanismo ancestral (Garcia-Mendoza et al. 2011; Ocampo-Alvarez et al. 2013) al estar presente en ambos organismos evolutivamente distantes, sin embargo la evolución de los complejos proteico pigmentarios y la aparición de la proteína PsbS dio origen a un control del NPQ distinto en plantas superiores que incrementó su éxito ecológico en el ambiente terrestre y les permitió enfrentar de forma más rápida los cambios en las condiciones de luz altamente variables fuera del agua (Alboresi et al. 2010).

Un segundo componente que interviene en la formación y disipación del NPQ en *M. pyrifera* esta probablemente relacionado a la fotoinhibición ya que su tiempo de vida es relativamente largo. Este componente no se disipó después de 2 horas de mantener el tejido de *M. pyrifera* en oscuridad después de exponerlo a intensidades de luz saturante por más de 20 minutos. Una característica típica de la inducción del NPQ asociada a la fotoinhibición es que el qI aumenta a medida que el tiempo de exposición es mayor (Nilkens et al. 2010). El qI no es necesariamente inactivación de FSII debido a fotoinhibición. El qI está asociado también con la retención de los pigmentos deepoxidados y ha sido asociado con procesos de aclimatación o de regulación a la baja (“down regulation”) de la actividad del fotosistema II. El aumento de la amplitud de NPQ asociada al segundo componente de *M. pyrifera* y el incremento de la concentración de Ax y Zx en oscuridad a medida que el tiempo de exposición a luz saturante fue mayor parece estar relacionado con una disminución de la epoxidación de Zx.

Se ha reportado que existe una regulación a la baja de la ZE ante la presencia de estrés oxidativo en plantas (Reinhold et al. 2008) y en algas pardas (Fernandez-Marin et al. 2011). Se ha descrito que en el alga parda *Pelvetia canaliculata*, el ciclo de Vx permanece activo en oscuridad cuando existe presencia de estrés oxidativo como la deshidratación o el

aumento de temperatura (Fernandez-Marin et al. 2011). Por lo tanto es posible que en *M. pyrifera* al igual que en otras algas pardas, la síntesis de Zx sea un proceso continuo y que su regulación sea a la baja cuando existe algún mecanismo de estrés.

Un resultado importante de este estudio es que se observó que el NPQ en *M. pyrifera* no depende directamente de la concentración absoluta de la síntesis de Zx. El cambio de la concentración relativa de este pigmento más la anteraxantina (pigmentos deepoxidados) con respecto a la concentración total de los pigmentos del CX explica de manera directa la formación del NPQ en *M. pyrifera*. Por lo tanto, existe un efecto antagónico entre la Vx y los pigmentos deepoxidados (cf. Fig. 6 y 9C), por lo que debe existir una competencia entre estos pigmentos por los sitios de unión en proteínas específicas del aparato fotosintético de esta alga (Ocampo-Alvarez et al. 2013). *M. pyrifera* no presenta proteínas homólogas tipo CAB que en plantas superiores son las que presentan los sitios de unión de los pigmentos deepoxidados (Fork et al. 1991; Apt et al. 1995). No se conoce en algas y en *M. pyrifera* en específico que proteínas son las que intervienen en el proceso de disipación térmica en el aparato fotosintético.

Capítulo 3

Efecto del tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas sobre las reacciones de deepoxidación y epoxidación de carotenoides y la formación de NPQ

3.1 Introducción

La disipación térmica medida como la disminución no fotoquímica (NPQ) de la emisión de fluorescencia de la clorofila (Chl) *a*, es uno de los mecanismos de fotoprotección más importantes en los organismos fototróficos (Bruce y Vasil'ev 2004; Krause y Jahns 2004). Este proceso confiere a estos organismos una fuerte aptitud biológica ante la variabilidad ambiental de la luz (Kulheim et al. 2002) y resistencia al estrés ambiental (Demmig-Adams y Adams 2006; Li et al. 2009). La formación del caroteno Zx a partir de Vx y Ax (ciclo de xantofilas; CX) (Yamamoto et al. 1962) es importante para la formación del NPQ (Goss y Jakob 2010; Jahns y Holzwarth 2012). El CX en el cual están involucrados los carotenoides Vx, Ax y Zx está presente en plantas superiores, algas verdes, algas pardas, musgos y helechos (Heber et al. 2006; Jahns et al. 2009; Goss y Jakob 2010). En diatomeas, xanthophytas, haptofitas y dinoflagelados existe un ciclo de xantofilas análogo que involucra la interconversión de las xantofilas diadinoxantina y diatoxantina (Stransky y Hager 1970; Demers et al. 1991; Olaizola et al. 1994).

La formación de NPQ es altamente regulada. En plantas superiores se han descrito cuatro componentes moleculares que intervienen en la formación de NPQ: (1), qE, o quenching energético; (2), qT, quenching asociado a los estados de transición; (3), qI, quenching fotoinhibitorio; y el recientemente descrito, (4), qZ, quenching dependiente de zeaxantina (Nilkens et al. 2010). La contribución relativa de cada uno de estos procesos a la formación de NPQ depende en la intensidad y duración de la exposición del organismo a la luz (Jahns y Holzwarth 2012). En las plantas superiores, el qE es la respuesta más importante ante la exposición a luz saturante, ya que éste proceso permite un cambio

rápido y flexible entre la función captadora de luz y la función disipadora de energía del aparato fotosintético (Ruban et al. 2012).

La caracterización de la cinética de inducción y disipación de NPQ (c.f capítulo II) ha demostrado que el componente qE no está presente en el alga parda *Macrocystis pyrifera*. En este organismo, solo se detectaron los componentes del tipo qZ y qI, ambos estrechamente relacionados con la formación de Zx a través del ciclo de xantofilas. En otros organismos que contienen clorofila *c*, como las diatomeas, el NPQ también se relaciona estrechamente con la interconversión de los pigmentos del CX (Lavaud et al. (2002 a; Ruban et al. 2004; Goss et al. 2006), sin embargo, las diatomeas presentan un componente de NPQ independiente del ciclo de xantofilas y relacionado únicamente a la formación del Δ pH que se activa inmediatamente después de la iluminación (Grouneva et al. 2007). La ausencia de qE sólo se ha reportado en *M. pyrifera* (Garcia-Mendoza et al. 2011), aunque otras algas pardas presentan características de control de NPQ similares (Rodrigues et al. 2002; Fernandez-Marin et al. 2011).

Existen implicaciones evolutivas importantes del control diferencial de NPQ entre plantas superiores y algas pardas (Garcia-Mendoza et al. 2011). Probablemente el ciclo de las xantofilas apareció antes de la separación de los linajes de las algas verdes (plantas superiores) y algas rojas (algas pardas) y la evolución de los complejos antena debió haber influenciado los mecanismos de fotoprotección relacionados a este ciclo (Garcia-Mendoza et al. 2011). *M. pyrifera* es un buen modelo para investigar el estrés por luz de un organismo en el cual el NPQ es independiente del Δ pH (carente de la respuesta rápida qE), no se sabe cómo se regula el NPQ cuando este proceso depende solo en la actividad del CX

En este trabajo, se caracterizó el efecto del tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (Σ CX; $V_x + A_x + Z_x$) en la tasa de inducción y la amplitud del NPQ en *M. pyrifera*. El tamaño del Σ CX en esta alga varía significativamente en hojas expuestas a diferentes condiciones de luz (Colombo-Pallotta et al. 2006). Un incremento en la concentración de pigmentos del CX es asociada con una capacidad de fotoprotección más elevada y es una característica de organismos aclimatados a alta luz (Johnson et al. 1993a; Johnson et al. 1993b; Demmig-Adams y Adams 1996; Eskling et al. 1997). En plantas superiores una concentración alta de pigmentos del ciclo de xantofilas reduce la formación

y disipación del NPQ (Johnson et al. 2008). Se ha reportado una disminución de hasta el 40% en la tasa de formación de NPQ en mutantes de *Arabidopsis* que sobreexpresan pigmentos del ciclo de xantofilas (Johnson et al. 2008). Una reducción similar se ha encontrado en organismos que crecen en luz intermitente y que presentan ΣCX grande (Jahns 1995; Johnson et al. 2008). En un organismo que no presenta el componente del NPQ dependiente del ΔpH , un pool de pigmentos del ciclo de xantofilas grande podría representar una limitación fisiológica si la influencia de este pool sobre la cinética de formación de NPQ es negativa. En este trabajo, se investigó cómo afecta el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas en el desarrollo del NPQ en *Macrocystis pyrifera*. Se demuestra que un CX grande está asociado con un incremento en la tasa de formación de NPQ y a una aceleración en la formación de los pigmentos fotoprotectores Ax y Zx.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material de estudio

Las muestras de *M. pyrifera* (L.) C. Agardh fueron recolectadas en noviembre del 2009 en 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. Se colectaron de un mismo organismo 3 hojas de 0, 1, 2, 3 y 6 m de profundidad. Las hojas fueron etiquetadas y transportadas al laboratorio en hieleras con agua de mar del sitio de colecta.

Se obtuvieron discos de tejido de 1.2 cm de diámetro cortados con un sacabocados a partir de 10 cm del pneumatocisto de cada una de las hojas libres de epifitas. Los discos de las 3 hojas de cada profundidad fueron mezclados y mantenidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de agua de mar filtrada y aireación constante a una temperatura de 17 ± 0.5 °C. Los discos fueron iluminados con lámparas fluorescentes de 54 Watts (Tecno Life) a $75 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 4 horas. La irradiancia fue medida con un irradiómetro LI-1000 (LI-COR, Inc.) y expresada en PAR (400- 700 nm). Posterior a esto se mantuvieron las muestras al menos 8 horas en oscuridad. Este tratamiento de luz tenue y oscuridad favoreció la epoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas. Después de este tratamiento, los discos muestreados de todas las profundidades presentaron eficiencia cuántica máxima del FSII con valores superiores a 0.7, los cuales son característicos de

tejido sano, no estresado de *M. pyrifera* (Colombo-Pallotta et al. 2006). La eficiencia cuántica máxima del FSII fue estimada como F_v/F_m , donde F_v es la fluorescencia variable de la clorofila y F_m es la fluorescencia máxima de la clorofila a del FSII.

En el sitio de muestreo, se midió la irradiancia en la región de 400 a 700 nm a lo largo de la columna de agua con un sensor tipo escalar QSPL-2101 (Biospherical Instruments, San Diego CA, USA). Se realizaron 3 perfiles y los datos se promediaron a cada metro. Los datos se ajustaron al modelo de Lambert-Beer de reducción de la irradiancia en la columna de agua: $E_z = E_0 e^{-kd z}$; donde E_z es la irradiancia a la profundidad z , E_0 es la irradiancia en superficie y el coeficiente de atenuación de la luz está representado por kd (Kirk 2010).

3.2.2. Diseño experimental

Para investigar el efecto del tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) en la formación de NPQ en *M. pyrifera*, los discos recolectados de cada profundidad se expusieron a 5 intensidades de luz diferentes. Se monitoreó la fluorescencia del FSII y la concentración de pigmentos en muestras expuestas 45, 90, 550, 950, y 1550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ durante 10 min. La luz se obtuvo de lámparas dicróicas de 50 Watts (Tecno Lite) y la intensidad de la luz deseada se obtuvo colocando filtros neutros que consistían en mallas de plástico entre las lámparas y las muestras. Durante el periodo de iluminación, los discos estuvieron dentro de cámaras de acrílico con agua de mar en recirculación continua mantenida a $17 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Se añadió NaHCO_3 a una concentración final de 2 mM al agua de mar para evitar cualquier limitación de CO_2 . La intensidad de luz se midió directamente en el sitio del disco, sumergiendo el micro sensor de luz del fluorómetro Diving-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Un arreglo de varias cámaras interconectadas en serie permitió tener réplicas de las mismas condiciones. La variación de luz entre las cámaras fue menor a 10 %.

3.2.3. Mediciones de fluorescencia de clorofila *a*

La emisión de fluorescencia de la clorofila del FSII fue medida con un fluorómetro de amplitud modulada sumergible (Diving-PAM, Walz, Effeltrich, Germany). La

fluorescencia del FSII se monitoreó colocando la sonda de fibra óptica del fluorómetro en un ángulo de 60° en relación al lado del disco expuesto a la luz. Esta geometría óptica se mantuvo durante el periodo de duración del experimento (10 min). El NPQ fue monitoreado en los discos de tejido de cada una de las profundidades iluminados por 10 min a las diferentes intensidades de luz. La medición de la emisión máxima de fluorescencia del FSII (F_m en oscuridad o F_m' en luz; sin NPQ o con NPQ respectivamente) se hizo aplicando pulsos de luz saturante de $3500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad y duración de 800 ms cada 30 s a las muestras mantenidas en oscuridad y durante el periodo de iluminación. El NPQ se calculó como $F_m - F_m' / F_m'$.

La tasa de formación de NPQ se obtuvo ajustando los datos de NPQ a la función sigmoidea ($y = (ax^b) / (c^b + x^b)$) (Johnson et al. 2009; Zia et al. 2011). Donde, a es la amplitud máxima de NPQ, c es el tiempo (x) al cual $a = 50\%$ y b es el parámetro de sigmoidicidad. Por lo que, $1/c^b$ es la tasa de formación de NPQ. Para el ajuste de los datos a la función descrita se usó el algoritmo de Marquardt–Levenberg del programa Sigmaplot (Jandel SSP Scientific, Chicago, IL, USA).

3.2.4. Análisis de pigmentos

Las muestras para el análisis de pigmentos se tomaron por triplicado en los discos previamente incubados en oscuridad por 8 horas (t_0) y a 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 min durante el tratamiento de iluminación. Cada disco colectado fue congelado rápidamente y almacenado en nitrógeno líquido hasta su análisis. Los pigmentos fueron extraídos y analizados de acuerdo a Colombo-Pallotta et al. (2006). La extracción de los pigmentos se realizó con 3 ml de acetona fría al 100%, previa molienda del disco congelado con nitrógeno líquido. El extracto se mantuvo durante la noche en oscuridad a 4°C y después la muestra fue limpiada con dos ciclos de centrifugación a $13000 \times g$ (4°C) por 5 min y almacenados a -20°C antes de su análisis por HPLC (Colombo-Pallotta et al. 2006). El equipo de HPLC fue un modelo AV-10 de Shimadzu (Kyoto, Japan) y estuvo equipado con una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDBC-8 (4.6mm x 150mm, 3.5 μm) (Agilent Technologies; Englewood, CO). La calibración se llevó a cabo con estándares externos (DHI Inc., Hoersholm, Denmark).

El estado de deepoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (DPS) fue calculado como: $[Z_x] + 0.5[A_x] / \Sigma CX$ (Gilmore y Yamamoto 1993). A_x y Z_x son anteraxantina y zeaxantina, respectivamente. ΣCX es el conjunto (“pool”) de pigmentos del ciclo de xantofilas que es la suma de la concentración de V_x , A_x y Z_x . El DPS representa el estado fotoprotectivo del CX, ya que A_x y Z_x están involucrados en la disipación térmica que confiere fotoprotección al FSII (Pfündel y Bilger 1994). La tasa de deepoxidación del ΣCX se calculó ajustando los datos a la función de Hill previamente descrita para el cálculo de la tasa de formación de NPQ.

Se estimó la tasa de deepoxidación de V_x (k_1) y la tasa de formación de Z_x (k_2). La tasa de deepoxidación de V_x esta relacionada a la primera reacción de deepoxidación del ciclo de xantofilas (k_1 ; conversión de V_x a A_x). Esta tasa se calculó ajustando los datos de la disminución de V_x durante el periodo de iluminación usando la función $y = A \cdot \exp^{-k_1 t}$. A es la amplitud de la deepoxidación de V_x y k_1 es la tasa de deepoxidación de V_x . La tasa de formación de Z_x representa a la segunda reacción del ciclo de xantofilas (k_2 ; conversión de A_x a Z_x). Esta tasa se calculó ajustando los datos del incremento de zeaxantina durante el periodo de iluminación usando la función $y = y_0 + A \cdot [1 - \exp^{-k_2 t}]$, donde A es la formación máxima de Z_x , k_2 es la tasa de formación de Z_x . El ajuste de los datos a cada una de las funciones descritas, se llevó a cabo usando el algoritmo de Marquardt–Levenberg del programa SigmaPlot (Jandel SSP Scientific, Chicago, IL, USA).

3.2.5. 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, realizando pruebas ANOVA de 1 y 2 vías (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 fue de $\alpha = 0.05$. Todos los datos se presentan como la media \pm 1 desviación estándar (DS)

3.3. Resultados

3.3.1. Concentración de pigmentos del CX en hojas de diferentes profundidades

Después del tratamiento de luz tenue–oscuridad se midió la concentración de pigmentos previo a los experimentos de inducción de NPQ. La concentración de los pigmentos del CX disminuyó con la profundidad de colección de las muestras (Tabla III). El estado de deepoxidación ($DPS = [Zx] + 0.5 [Ax] / \Sigma CX \times 100$) del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas fue menor al 2% en las muestras colectadas de las profundidades de 0 a 6 m (Tabla III). El DPS en oscuridad estuvo asociado principalmente a la presencia de Ax. La concentración de Ax fue 5 veces más alta en las hojas de superficie que en las colectadas a 6 m de profundidad (Tabla III).

Tabla III Concentración de pigmentos del ciclo de xantofilas en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades en la columna de agua.

Profundidad (m)	Vx	Ax	Zx	ΣCX	DPS (%)
0	19.1 ± 0.9	0.5 ± 0.2	0.1 ± 0.1	19.7 ± 1	1.8 ± 0.6
1	14.3 ± 0.7	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	14.7 ± 0.7	1.7 ± 0.3
2	12.2 ± 0.6	0.3 ± 0.1	n.d	12.5 ± 0.5	1.3 ± 0.2
3	9.7 ± 1	0.2 ± 0.0	n.d	9.9 ± 1.0	1.0 ± 0.2
6	6.0 ± 0.5	0.1 ± 0.1	n.d	6.1 ± 0.4	1.0 ± 0.7

La concentración de los pigmentos se midió después de un tratamiento de luz tenue oscuridad. Se presenta la concentración en mol mol^{-1} Chl *a* x 100 de violaxantina (Vx), anteraxantina (Ax), zeaxantina (Zx) y el tamaño del pool de pigmentos del CX (ΣCX). Asimismo se presenta el estado de deepoxidación (DPS) de este pool (ur). El ΣCX es la suma de $[Vx] + [Ax] + [Zx]$. El DPS está expresado como $([Zx] + 0.5 [Ax] / \Sigma CX) \times 100$. Los resultados representan el promedio de 5 muestras ± 1 DS. n.d., por debajo del límite de detección del protocolo de cuantificación.

Las hojas superficiales tuvieron una concentración de Vx de $\sim 19 \text{ mol mol}^{-1}$ Chl *a* x 100 y una concentración del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) de $\sim 20 \text{ mol mol}^{-1}$ Chl *a* x 100 (Tabla III). La concentración de Vx disminuyó con la profundidad y fue tres veces menor en las hojas colectadas a 6 m en comparación a las hojas superficiales (Tabla III). En hojas de un 1 m se detectó una reducción del 25% del ΣCX presente en hojas del dosel y el ΣCX fue 3 veces menor en las hojas de 6m (Tabla III).

La figura 10 muestra que existió una reducción exponencial del ΣCX en profundidad. El cambio en el tamaño del contenido de pigmentos del CX es similar a la reducción de la luz con la profundidad (Fig. 10). Una reducción de 30% de la luz que alcanza la superficie fue detectada en las hojas de 1 m, y a 6 m la reducción de luz fue del 88% (Fig. 10). Estos resultados muestran que la luz juega un papel importante en la regulación del tamaño del ΣCX .

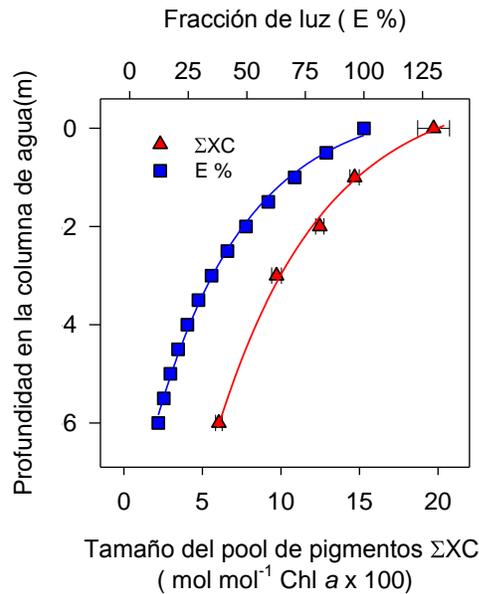


Figura 10. Variación en profundidad en la columna de agua del tamaño del pool de xantofilas (ΣCX) de *Macrocyctis pyrifera* y la intensidad de luz. La Irradiancia fue normalizada a la intensidad de luz medida en la superficie. Las mediciones de luz fueron ajustadas al modelo de reducción de la irradiancia de luz en la columna de agua (k_d) de 0.4 m^{-1} (línea azul continua). El ΣCX también fue ajustado a un modelo exponencial de reducción de este pool en profundidad.

3.3.2. Formación de NPQ en muestras con diferentes ΣCX

Se analizó el efecto del tamaño del ΣCX en la formación de NPQ. El tejido colectado en diferentes profundidades fue expuesto a 5 diferentes intensidades de luz, y se monitoreó la formación del NPQ durante 10 min. Dos de las intensidades de luz utilizadas (45 y $90 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) estuvieron por debajo del nivel de saturación de luz (E_k) reportado para hojas que crecen por encima de 9 m de profundidad ($102 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Colombo-Pallotta et al 2007) y tres intensidades de luz utilizadas (550 , 950 y $1550 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fueron superiores al E_k .

Todas las muestras colectadas de todas las profundidades mostraron un incremento en el NPQ al exponerlas a luz. El NPQ a 10 min en todas las muestras fue mayor al exponerlas a la intensidad de luz más alta ($1500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Fig. 11). El NPQ a los 10 min de iluminación fue similar en las muestras colectadas de 0 a 3 m de profundidad; sin embargo, la formación de NPQ fue más rápida en las muestras de superficie que en las colectadas a mayor profundidad (Fig. 11). En las hojas superficiales se observó además una formación transitoria de NPQ cuando estas fueron expuestas a una intensidad de luz por debajo del E_k (45 y $90 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$). El NPQ a estas irradiancias incrementó inicialmente hasta alcanzar un máximo a los ~ 4 min de iluminación y después disminuyó hasta alcanzar valores iniciales (Fig. 11).

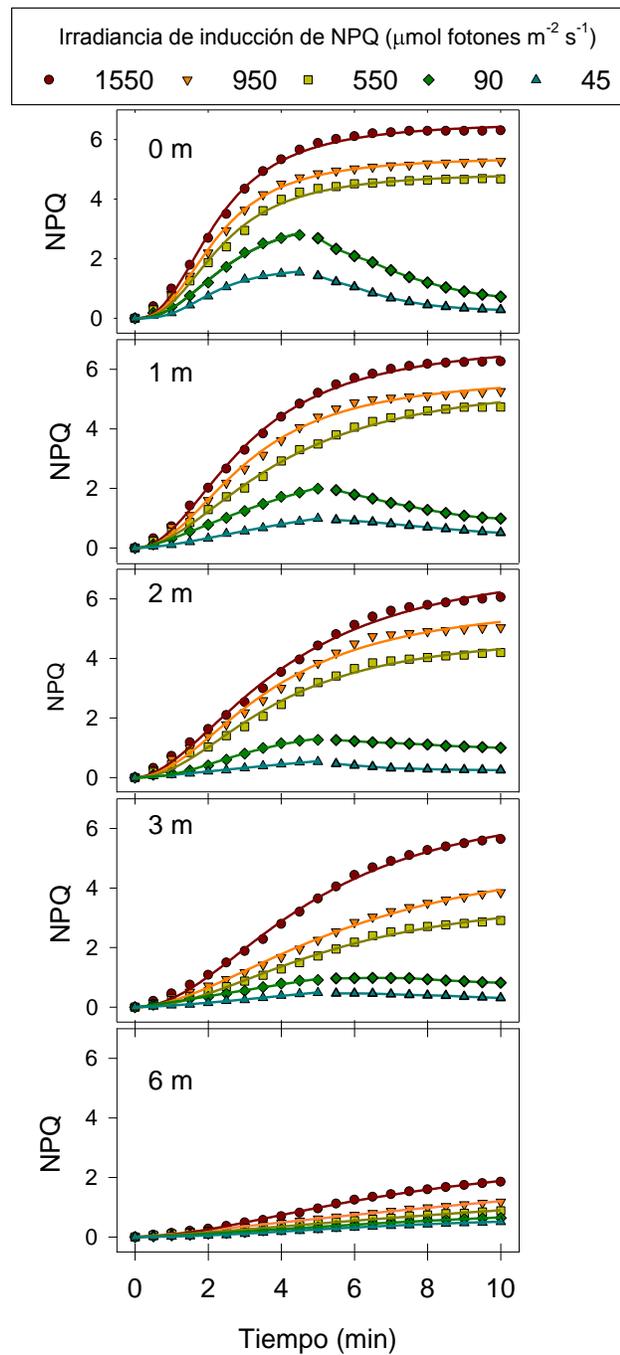


Figura 11. Formación del NPQ en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas a diferentes profundidades de la columna de agua y expuestas a 5 diferentes irradiancias. Las muestras de cada profundidad se expusieron a 45 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (triángulos azules), 90 (rombos rojos), 550 (cuadros verde claro), 950 (triángulos invertidos anaranjado) y 1550 (círculos rojos) $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los datos representan el promedio de tres réplicas.

El NPQ máximo detectado a 10 min y la tasa de formación de NPQ estuvieron relacionados con el tamaño del ΣCX de las hojas (Fig. 12A y 12B). Las muestras con un ΣCX de $\sim 6 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$ (6 m) presentaron un NPQ significativamente menor al exponerlas a 550, 950 y 1550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación a las muestras con una concentración mayor de carotenoides del ciclo de xantofilas (Fig. 12A).

Los niveles de NPQ en las hojas colectadas a 0, 1, 2 y 3 m de profundidad (ΣCX mayor a 6 $\text{mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$) no fueron diferentes (ANOVA de dos vías, $p < 0.05$; Fig. 12) después de 10 min de exposición a los diferentes tratamientos de luz. El NPQ alcanzó el valor de 6 en las muestras expuestas a 1550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y se observó una reducción del 20% y 30% de este valor de NPQ en las muestras expuestas a 950 y 550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, respectivamente (Fig. 12A)

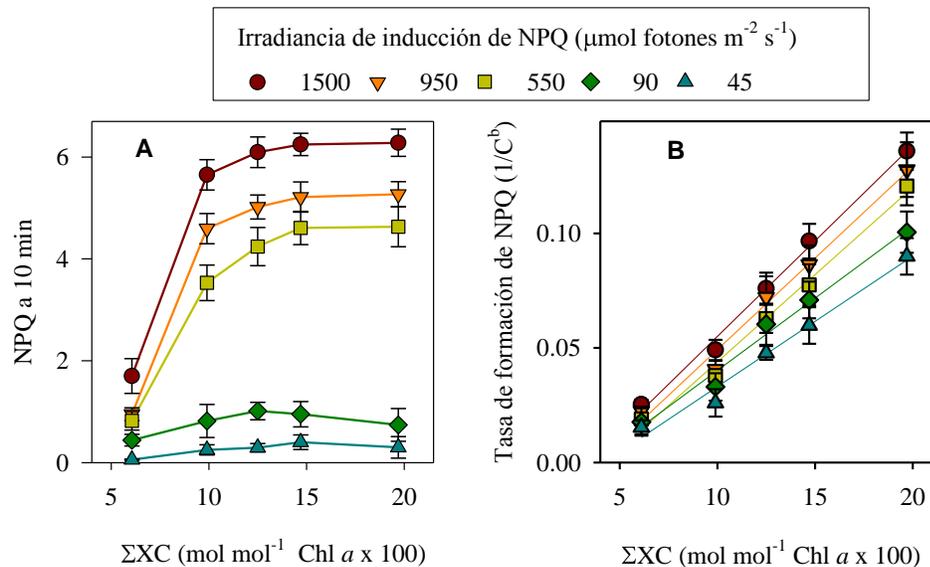


Figura 12. Relación entre la disipación no fotoquímica (NPQ) medida a los 10 minutos de iluminación con el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) en hojas de *M. pyrifera* colectadas de diferentes profundidades (Panel A). El panel B presenta la relación del ΣCX con la tasa de formación de NPQ en las muestras expuestas a diferentes irradiancias. Los datos representan el promedio de 3 replicas \pm la desviación estándar.

EL NPQ formado a los 10 min de exposición a luz fue similar en las muestras colectadas desde una profundidad de 3 m hasta la superficie; sin embargo, la tasa de formación de NPQ fue diferente entre las muestras y estuvo relacionada con el tamaño del

Σ CX (Fig. 12B). Al exponer a irradiancias saturantes las muestras de superficie presentaron una tasa de formación tres veces mayor y un Σ CX dos veces mayor que las muestras colectadas a 3 m (Fig. 12B).

3.3.3. Deepoxidación en las muestras con diferentes Σ CX

El tamaño del Σ CX y el nivel de irradiancia afectan el desarrollo del NPQ de *M. pyrifera*. En esta alga, el NPQ no es dependiente de la formación de un gradiente de protones transtilacoidal y recae solo en la actividad del CX (Garcia-Mendoza y Colombo-Pallotta 2007; Garcia-Mendoza et al. 2011). Por lo tanto, se monitoreó la deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas en las muestras de las diferentes profundidades expuestas a los diferentes tratamientos de luz y se analizó su relación con el tamaño del Σ CX. El cambio en la concentración de los pigmentos del ciclo de xantofilas en las muestras colectadas a las diferentes profundidades y expuesta a 5 diferentes irradiancias se presenta en la figura 13.

En las muestras de superficie, la concentración de V_x disminuyó de 18.7 a 12.5 mol mol^{-1} Chl *a* x 100 en 10 min de exposición a 1550 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 13). La deepoxidación de violaxantina fue menor en las muestras colectadas a mayor profundidad y expuestas a irradiancias menores (Fig. 13). En las muestras colectadas en superficie e iluminadas con irradiancias menores a E_K (45 y 90 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) se observó una reducción de la concentración de V_x de manera transitoria (Fig. 13). Este cambio transitorio también se observó en la concentración de A_x y Z_x . En muestras de superficie expuestas a 45 y 90 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ la concentración de A_x y Z_x aumentó durante los primeros 4 min y después disminuyó hacia el final del periodo de iluminación. La concentración de A_x alcanzó rápidamente su concentración máxima (~4 min), en todas las muestras iluminadas a intensidades mayores a E_K (550, 950 y 1500 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En contraste a la A_x , el incremento en la Z_x fue más lento en los primeros minutos de exposición de luz, detectándose su concentración máxima al final del periodo de iluminación (Fig. 13).

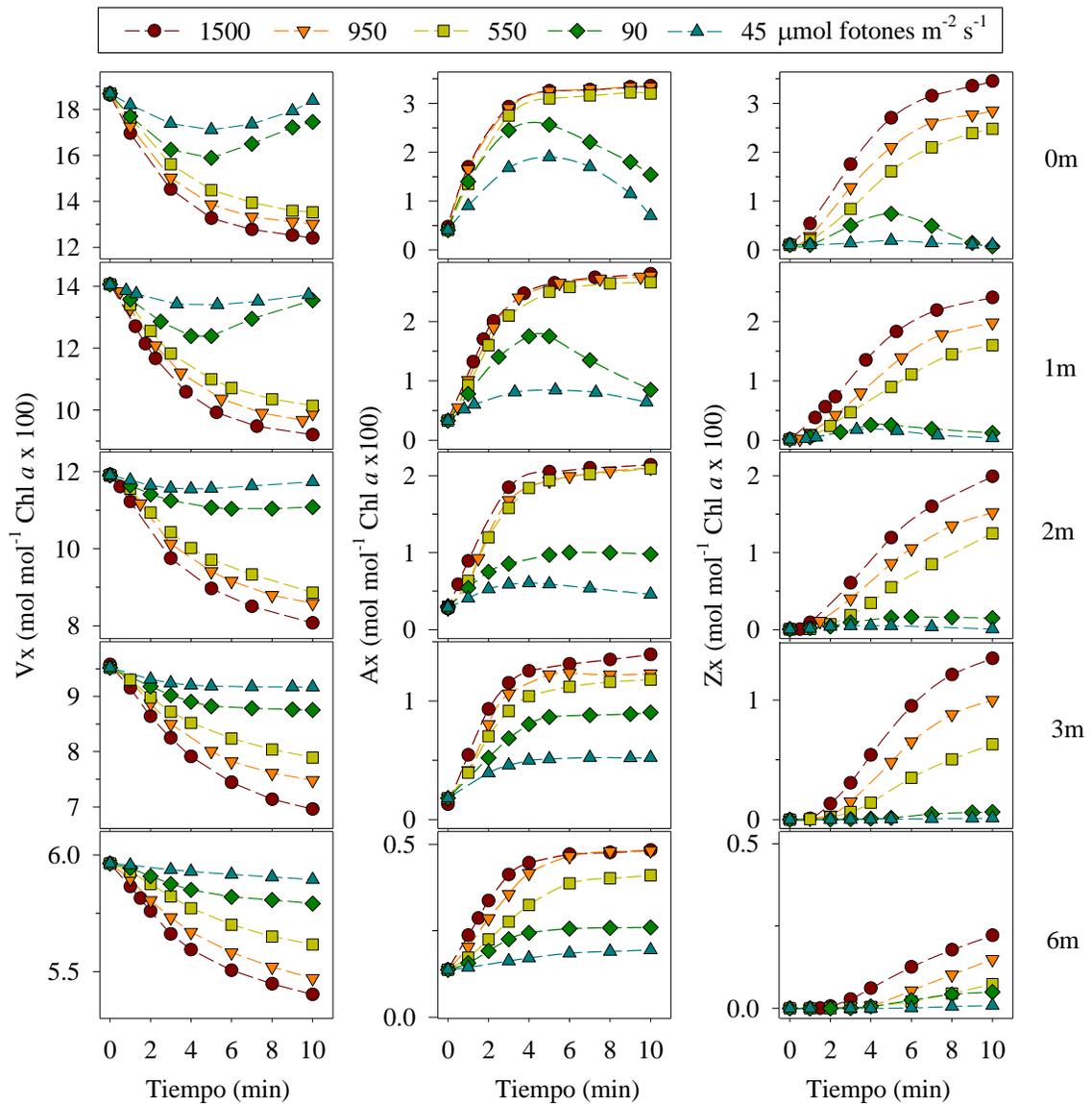


Figura 13. Variación en la concentración de pigmentos del ciclo de xantofilas. Vx, columna izquierda; Ax, columna del centro y Zx, columna derecha. Las muestras colectadas en superficie, 1, 2, 3 y 6 m de profundidad (orden de arriba hacia abajo, indicado en las figuras a la derecha) se expusieron por 10 minutos a cinco niveles de irradiancias. Los datos representan el promedio de tres réplicas.

Los cambios en el estado de deepoxidación (DPS) de los pigmentos del CX fueron analizados con relación al tamaño del ΣCX (Fig. 14).

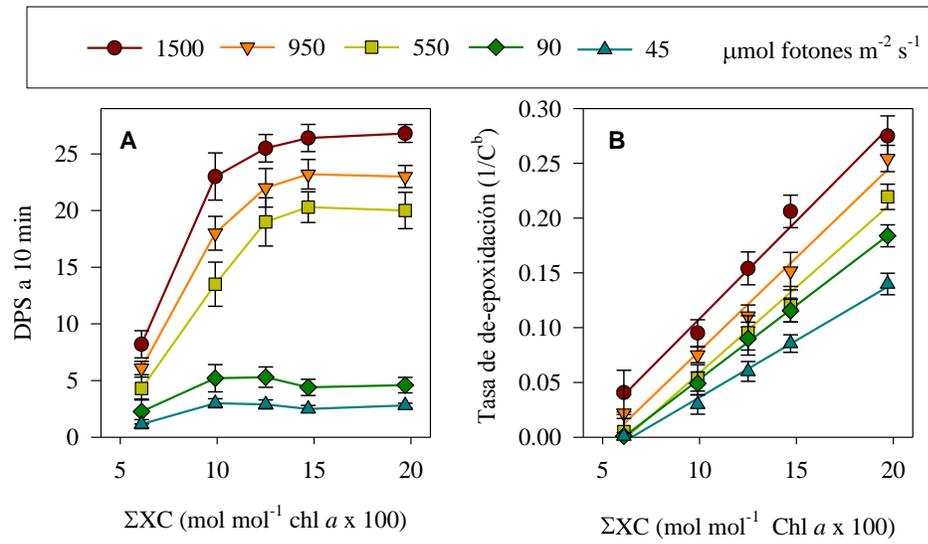


Figura 14. Relación entre el estado de deepoxidación del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (DPS) medido a los 10 minutos de iluminación con el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) en hojas de *M. pyrifera* obtenidas de diferentes profundidades (Panel A). El panel B representa la relación del ΣCX y la tasa de de-epoxidación de las muestras expuestas a cinco niveles de irradiancia. Los datos representan el promedio de tres replicas ± la desviación estándar.

El DPS más bajo a los 10 min de la exposición a luz se detectó en las muestras con un ΣCX más pequeño (muestras de 6 m; Fig. 14). En cada nivel de irradiancia el DPS a los 10 min de exposición no fue diferente en las muestras con un ΣCX mayor a 12 mol mol⁻¹ Chl *a* x 100 (Fig. 14). En contraste, el DPS fue diferente a cada nivel de irradiancia utilizado. El DPS máximo detectado a 10 min de iluminación fue de 27 en las muestras de superficie expuestas a 1500 μmol fotones m⁻² s⁻¹. Este valor de DPS fue menor en muestras expuestas a irradiancias más bajas (Fig. 14). La tasa de deepoxidación estuvo relacionada de manera lineal con el tamaño del ΣCX (Fig. 14B). Al igual que el comportamiento del NPQ (cf. Fig. 12), la tasa de deepoxidación también se vio afectada por la intensidad de luz. En las muestras con un mismo ΣCX, la tasa de DPS fue mayor a mayor intensidad de luz (Fig. 14B).

3.3.4. Relación entre el NPQ máximo y el tamaño del ΣCX

La tasa de formación de pigmentos deepoxidados y la tasa de formación de NPQ presentaron una tendencia similar en todas las muestras de distintas profundidades y

distinto tamaño del ΣCX . El análisis de regresión lineal entre el NPQ y la concentración de Zx formada en todas las muestras y en los distintos tratamientos de luz presentó un r^2 de 0.87 (Fig. 15A). La variación de esta relación estuvo asociada con la baja acumulación de Zx al inicio de los tratamientos de luz (cf. Fig. 13). Se ha reportado que la Ax también contribuye al NPQ (Gilmore y Yamamoto 1993; Goss et al. 1998). Por lo tanto se analizó la relación de la concentración de los pigmentos deepoxidados con el NPQ. Se encontró un patrón interesante en la relación de la concentración de Ax más Zx y el NPQ (Fig. 15B). El NPQ estuvo relacionado linealmente con la suma de Ax más Zx con un r^2 mayor a 0.96 cuando la relación fue analizada a cada profundidad de muestreo. La pendiente más pronunciada en esta relación se detectó en el tejido colectado a 6 m de profundidad, la cual presentó el ΣCX más pequeño. La pendiente de esta relación disminuyó de las muestras colectadas a 6 m hacia las muestras colectadas en superficie. Esto indica que se necesita una mayor concentración de Ax más Zx para inducir el mismo NPQ en muestras con un ΣCX más grande. Sin embargo, cuando se considera la cantidad relativa de pigmentos deepoxidados (DPS) en lugar de la concentración absoluta de estos pigmentos, el NPQ es comparable en todas las muestras con diferentes ΣCX y expuestas a los diferentes tratamientos de luz. La relación lineal entre el NPQ y DPS presentó un r^2 de 0.99 considerando los resultados de los diferentes tratamientos de luz, los diferentes tiempos de exposición y todas las profundidades de colección de las muestras (Fig. 15B). Así mismo, la dependencia de la formación de NPQ con el incremento relativo de los pigmentos deepoxidados es evidente en la relación entre la tasa de formación de NPQ y la tasa de deepoxidación (Fig. 15C). La relación lineal entre estas variables tienen un r^2 de 0.95 (Fig. 15C).

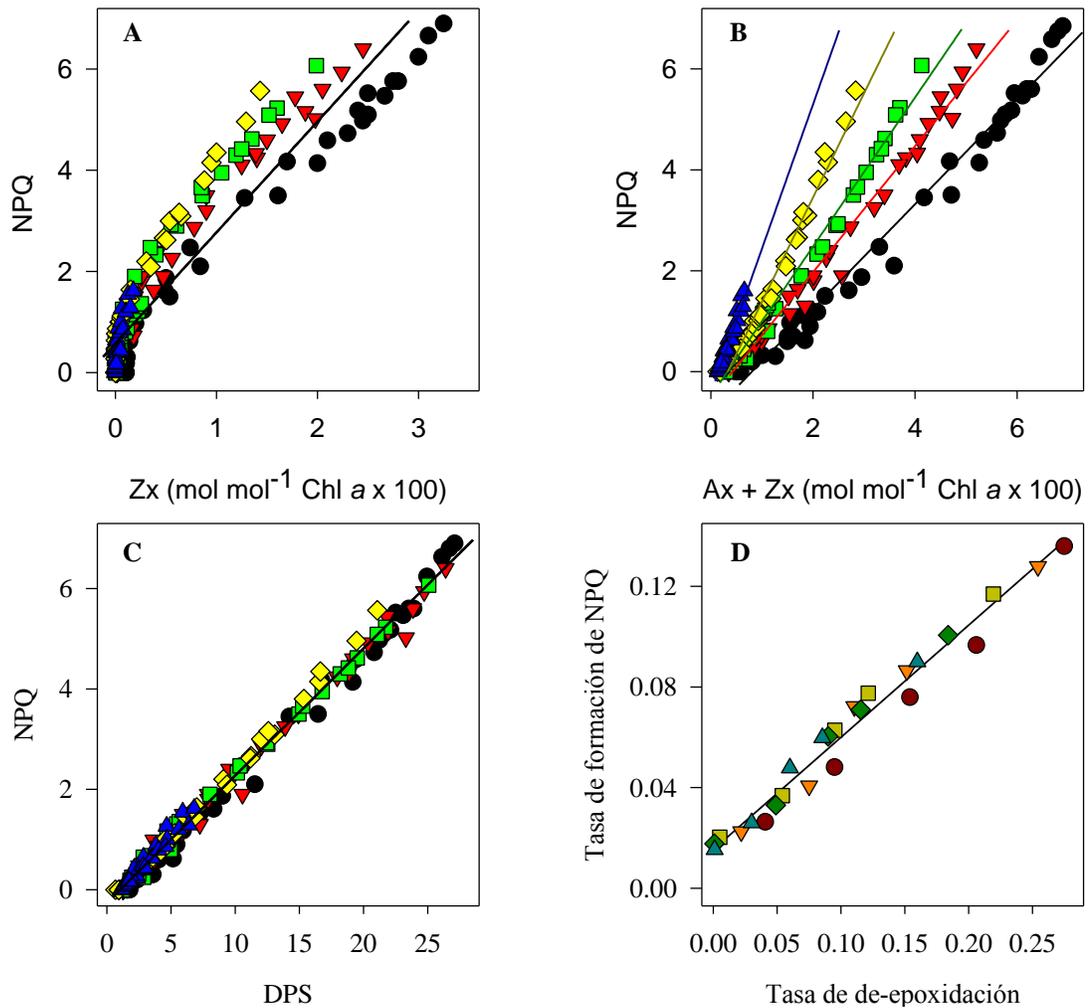


Figura 15. Relación entre la disipación no fotoquímica (NPQ) y la concentración de diferentes pigmentos del ciclo de xantofilas en hojas de *M. pyrifera* colectadas de diferentes profundidades y expuestas a diferentes irradiancias. NPQ vs Zx panel A; NPQ vs $Ax + Zx$ panel B y NPQ vs $Zx + 0.5 Ax / \Sigma CX$ (DPS) panel C. Adicionalmente, la relación entre la tasa de formación de NPQ y la tasa de deepoxidación en muestras expuestas a diferentes irradiancias es presentada en el panel D. En el panel A, B, C, los colores de los símbolos y las líneas de regresión representan datos de muestras colectadas de diferentes profundidades. En el panel D, los símbolos representan la tasa de formación y tasa de DPS en muestras expuestas a 5 diferentes irradiancias.

Se analizó la tasa de conversión de Vx a Ax y Zx en las muestras colectadas de todas las profundidades y expuestas a 550, 950 y 1550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para conocer cuál de las

reacciones que intervienen en la deepoxidación es favorecida por el incremento del tamaño del ΣCX .

La tasa menor de la conversión de V_x a A_x (k_I) se detectó en las muestras de menor tamaño del ΣCX ($6 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$) (Fig. 16A). Esta tasa aumentó linealmente en muestras con mayor tamaño del ΣCX y el incremento fue similar (Student's t-test; $p < 0.05$) en las muestras expuestas a 550, 950 y 1550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La tasa de formación de la Z_x (segundo paso de la reacción de deepoxidación del CX ; K_2) también presentó un aumento lineal con el tamaño del ΣCX . Sin embargo, la dependencia de la tasa de conversión de A_x a Z_x con el tamaño del ΣCX fue influenciada por el nivel de irradiancia a la que estuvieron expuestas las muestras (Fig. 16B). La pendiente más pronunciada de la relación entre k_{A-Z} con el tamaño del ΣCX se detectó en las muestras expuestas a 1500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 16B). En todas las muestras y bajo todas las condiciones de luz usadas, la reacción de V_x a A_x fue más rápida que la reacción de A_x a Z_x . La relación k_{V-A} entre k_{A-Z} fue ~ 3 en las muestras expuestas a 550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 16C).

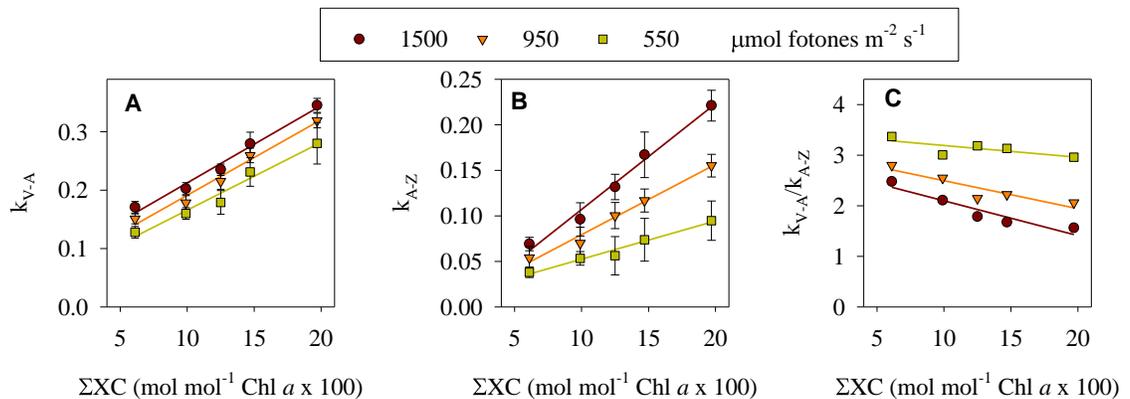


Figura 16. Relación entre el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas (ΣCX) con la tasa de formación de A_x a partir de V_x (k_{V-A} ; panel A) y la tasa de formación de Z_x a partir de A_x (k_{A-Z} ; panel B) en hojas de *Macrocystis pyrifera* colectadas de diferentes profundidades y expuestas a 3 diferentes irradiancias. La relación k_{V-A} / k_{A-Z} se presenta en el panel C

La relación k_{V-A} / k_{A-Z} fue menor cuando se utilizó una irradiancia 950 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y aún menor cuando se utilizó la irradiancia de 1550 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A esta última irradiancia el radio k_{V-A} entre k_{A-Z} fue ~ 2.5 en las muestras con un tamaño del ΣCX

de $\sim 6 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$ pero disminuyó a ~ 1.5 en las muestras con el ΣCX mayor ($\sim 20 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$).

3.4. Discusión

Se encontró que el tamaño del pool de las xantofilas (ΣCX) no afecta la amplitud máxima del NPQ en esta alga. En las muestras con un ΣCX más grande la formación de NPQ fue más rápida y estuvo asociada con la conversión más rápida de V_x en A_x y Z_x . Por lo tanto, la regulación del tamaño del ΣCX es una respuesta importante al ambiente de luz que experimenta el tejido fotosintético de esta alga.

3.4.1. El estado de deepoxidación en hojas de diferentes profundidades

En este trabajo se encontró que el tamaño del ΣCX responde a la reducción de luz en la columna de agua. Las hojas de un mismo organismo, colectadas de diferentes profundidades, mostraron una reducción exponencial del tamaño del ΣCX con la profundidad. Por ejemplo, a 1 m de profundidad las hojas tuvieron el 75% de pigmentos del CX del detectado en las hojas de la superficie.

La acumulación de carotenoides fotoprotectores en plantas y algas es una respuesta común de aclimatación a condiciones de alta luz (Thayer y Björkman 1990). En *M. pyrifera*, la regulación del tamaño del CX es una respuesta importante presentándose una concentración de carotenoides tres veces mayor en hojas de superficie en comparación a hojas de 6 m de profundidad (Colombo-Pallotta et al. 2006).

La variación del tamaño del CX asociada al ambiente lumínico ha sido descrita para varias especies de plantas superiores (Thayer y Björkman 1990; Matsubara et al. 2009). Thayer y Bjorkman (1990) reportaron que varias especies aclimatadas a condiciones de baja luz (sombra) presentaron en promedio un CX de aproximadamente $4.5 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$ mientras que el tamaño promedio en hojas aclimatadas a alta luz fue de aproximadamente $14 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$. En este trabajo, se detectó un CX en *Macrocystis* de $19.7 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$ en hojas colectadas en la superficie. Sin embargo, la concentración de pigmentos del CX puede alcanzar los $25 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$. Esta concentración es casi dos veces mayor que la concentración promedio del CX reportada en plantas aclimatadas a alta intensidad de luz (Thayer y Bjorkman 1990).

3.4.2. Efecto del tamaño del CX sobre la formación de NPQ y la deepoxidación de pigmentos del CX

Las implicaciones fisiológicas del incremento del tamaño del CX en *M. pyrifera* fueron evidentes cuando se analizó la relación entre el tamaño del CX y la tasa de formación de NPQ. En ausencia del componente de formación rápida del NPQ (qE), un CX grande en *M. pyrifera* representa una respuesta rápida a condiciones de estrés por luz. Un aumento de dos veces la concentración de pigmentos del CX está acompañado de un incremento del doble en la velocidad de formación de NPQ.

El efecto del Σ CX sobre la tasa de formación de NPQ no está claro en plantas superiores. En estos organismos la mayor proporción del NPQ está asociada a un rearrreglo de la antena dependiente del Δ pH, el cual puede ser activado sin la presencia de la zeaxantina (Betterle et al. 2009; Müller et al. 2010). Por lo tanto, la cinética de NPQ y de formación de Zx no son similares durante los primeros minutos de exposición a luz (Adams WW 1990; Ruban y Horton 1999). Se ha documentado que la formación del NPQ es más lenta en el mutante *sChyB* de *Arabidopsis thaliana* (Johnson et al. 2008) y se relacionó con una deepoxidación más lenta debido a que el tamaño del Σ CX en el mutante, es 3 veces mayor que en la cepa silvestre (Johnson et al. 2008). En diatomeas, el tamaño del Σ CX tiene una influencia importante sobre la amplitud máxima del NPQ detectada en alta luz (Lavaud et al. 2002b; Lavaud et al. 2007). Sin embargo, no es claro su efecto sobre la tasa de formación del NPQ (Lavaud et al. 2002b). Un aumento del doble del tamaño del Σ CX en *Phaeodactylum tricornutum* no presentó un efecto sobre la aceleración de la formación de NPQ (Lavaud et al. 2002b; Ruban et al. 2004). En contraste, las muestras de *M. pyrifera* con un contenido mayor de pigmentos del ciclo de xantofilas Σ CX presentaron una tasa de deepoxidación y una tasa de formación del NPQ más alta.

El aumento del tamaño del Σ CX al doble estuvo asociado a un incremento de 1.5 veces de la tasa de deepoxidación de violaxantina. La aceleración en la tasa de deepoxidación de Vx puede ser explicada por el incremento probable de un pool de Vx fácilmente accesible en muestras aclimatadas a alta luz. En plantas superiores, se han identificado diferentes pools de Vx de acuerdo a su accesibilidad a la enzima violaxantina

deepoxidasa (VDE). La deepoxidación de Vx ocurre en sitios de alto contenido en galactolípidos que presentan una configuración tipo hexagonal invertida formada por monogalactosyldiacylglycerol (MGDG). Estas estructuras de fase hexagonal promueven la deepoxidación de Vx (Schaller et al. 2010). La Vx debe estar separada de las proteínas de la antena para ser convertida en Ax y posteriormente a zeaxantina (Jahns et al. 2009). En plantas superiores, la Vx asociada a algunas proteínas de la antena menor no es accesible a la VDE. En contraste, los pigmentos asociados a las proteínas de la antena periférica del FSII son deepoxidados rápidamente (Farber et al. 1997; Jahns et al. 2001). Schaller y colaboradores (2010) reportaron la existencia de un pool de Vx disuelto en capsulas de MGDG que rodean la antena del FSII de plantas superiores. Análogamente, se ha descrito que en diatomeas existe un pool de diadinoxantina libre relacionado con los MGDG (Lepetit et al. 2010) Este pool libre es más grande en diatomeas aclimatadas a alta luz (Lepetit et al. 2010). Por lo tanto, un pool grande de pigmentos fácilmente accesibles a la VDE podría explicar el incremento en la tasa de deepoxidación de la Vx y en consecuencia, la formación más rápida del NPQ en las hojas de *M. pyrifera* aclimatadas a luz de altas intensidades. Este pool de Vx podría estar libre en la membrana tilacoide o estar asociado a una proteína específica importante para la fotoprotección en esta alga.

3.4.3. Influencia del ΣCX en la relación entre el estado de deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas y el NPQ

En *Macrocystis*, en ausencia de una respuesta rápida, la formación del NPQ se ve afectada por el tamaño del ΣCX . Se encontró que en las muestras con un ΣCX grande, se requiere de una concentración mayor de Ax y Zx para inducir el mismo NPQ que en las muestras con ΣCX pequeños. Parece paradójico que los pigmentos fotoprotectores sean más eficientes en inducir NPQ en tejido aclimatado a baja intensidad de luz comparado con tejido aclimatado a condiciones de alta intensidad de luz. Sin embargo, esto puede ser explicado si consideramos que las muestras aclimatadas a baja intensidad de luz tienen menos sitios de “quenching” y por lo tanto, estos pueden saturarse con una baja concentración de pigmentos deepoxidados.

Un resultado importante en este trabajo es que la formación del NPQ a diferentes intensidades de luz se pudo explicar solamente por el cambio en el estado de deepoxidación del Σ CX. La relación del NPQ con el DPS es la misma en hojas con diferentes características de aclimatación (hojas colectadas de diferentes profundidades). Incluso la formación transitoria de NPQ en bajas intensidades de luz, también estuvo relacionada con la interconversión de pigmentos del CX. El NPQ transitorio en baja intensidad de luz ha sido descrito en plantas y su origen ha sido un tema de controversia (D'Haese et al. 2004; Finazzi et al. 2004; Kalituho et al. 2007). Por un lado, la formación transitoria de NPQ observada en plantas expuestas a luz subsaturante se ha asociado con un quenching que se origina en el centro de reacción del FSII asociado a una reducción transitoria del pH en los primeros minutos de exposición a luz (Finazzi et al. 2004). En sentido opuesto, Kalituho et al. (2007) y D' Haese et al (2004) demostraron que la formación de Ax y Zx explica esta formación transitoria del NPQ. En *M. pyrifera*, el NPQ transicional se relacionó a los cambios en el DPS durante el periodo de iluminación. La relación entre el NPQ y el DPS en esta alga implica que existe un efecto antagonista entre la Vx y los pigmentos deepoxidados Ax y Zx. Este efecto antagonista también explica que en *Arabidopsis thaliana* genotipo *sChyB* exista una alta correlación entre el NPQ y Zx + Ax (Johnson et al. 2008).

En ausencia de qE, la relación directa entre NPQ y DPS en *M. pyrifera* indica que en el sistema colector de luz de esta alga debe de existir un número fijo de sitios de quenching en cada estado de aclimatación y existe probablemente una competencia por ellos entre las xantofilas deepoxidadas y epoxidadas. Por lo tanto, la unión y liberación de las xantofilas deepoxidadas de estos sitios podría ser el factor limitante de la tasa de formación y disipación del NPQ. Este mecanismo fue propuesto por Johnson et al (2008) para explicar la formación de NPQ en Arabidosis. Si la Zx y Ax compiten con la Vx por los sitios de quenching en la antena de *M. pyrifera*, entonces el NPQ debe estar controlado por la actividad de las enzimas involucradas en el CX.

En plantas superiores, la VDE se activa en condiciones de luz saturante mientras que la actividad de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZE) parece ser constitutiva (Jahns et al. 2009). Una observación importante referente al control del CX en algas pardas fue hecha

por Fernandez-Marin et al. (2009). Estos autores reportaron que en el alga *Pelvetia canaliculata* existe una acumulación de Zx en oscuridad bajo condiciones de estrés y cuando la enzima ZE es inhibida químicamente (Fernández-Marín et al. 2009). Ellos sugieren que la acumulación de xantofilas deepoxidadas es controlada por la actividad de la ZE ya que la VDE, en contraste con la de plantas superiores, parece tener una actividad basal constitutiva. En *P. canaliculata*, la Zx no está presente en oscuridad ya que la ZE previene su acumulación. Cuando la actividad de esta enzima se inhibe por condiciones de estrés o químicamente se observa una acumulación de Zx aun en oscuridad o irradiancia baja (Fernández-Marín et al. 2009). Nosotros encontramos que el nivel de irradiancia modula el DPS máximo formado en *M. pyrifera* y por lo tanto el NPQ detectado a los 10 min de exposición de luz. El DPS y el NPQ máximo fueron mayores en los tejidos expuestos a altas irradiancias. El balance entre la actividad de la VDE y la ZE debe controlar el nivel del DPS en *M. pyrifera* y probablemente la reducción de la actividad de ZE a altas intensidades de luz promueve la acumulación de xantofilas deepoxidadas.

La cantidad y tasa de formación de xantofilas deepoxidadas ha sido importante para la formación de NPQ en *M. pyrifera*. Sin embargo, los sitios de quenching deben existir para que el NPQ se lleve a cabo. En plantas superiores se han descrito dos sitios de quenching: uno está presente en los complejos proteico pigmentarios que conforman la antena menor y el otro está presente en la antena periférica (LHCII) en estado agregado (Holzwarth et al. 2009). La disipación térmica se lleva a cabo en estos complejos ya sea por un proceso de transferencia de cargas entre un par clorofila-carotenoide o por transferencia de energía directamente del estado excitado de clorofila a un estado excitado de luteína o zeaxantina (Pascal et al. 2005; Ahn et al. 2008). La aceleración de la formación de NPQ en mutantes que sobreexpresan la proteína PsbS (Zia et al. 2011), el retardo en la formación de NPQ en mutantes que carecen de los constituyentes de los trímeros del LHCII (Andersson et al. 2003) y la formación lenta pero efectiva de NPQ dependiente de Zx en cepas mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes de PsbS (Johnson y Ruban 2010) confirman la existencia de dos sitios de quenching en planta superiores. Estos están controlados diferencialmente por la proteína PsbS y la Zx (Holzwarth et al. 2009). Específicamente, el NPQ en la antena periférica (LHCII) en estado agregado es dependiente en PsbS y la Zx,

mientras que el NPQ en las antenas menores está relacionado solo a la formación de Zx (Holzwarth et al. 2009).

En *M. pyrifera*, un NPQ alto en las muestras colectadas en superficie y cerca de la superficie implica un incremento en el número de sitios de quenching, los cuales pueden estar relacionados con una alta concentración de complejos antena involucrados en la disipación térmica en esta alga. En contraste, debe haber menos sitios de quenching en las muestras aclimatadas a baja intensidad de luz, por lo que estos se saturan más rápidamente a una baja concentración de xantofilas deepoxidadas. No se conocen que proteínas o complejos están involucrados en la disipación térmica en algas pardas. Este grupo de organismos no presenta proteínas homólogas a las proteínas CABs de plantas (Apt et al. 1995; Cock et al. 2010; Dittami et al. 2010). Dado que estas proteínas no están presentes, entonces los pigmentos fotoprotectores deben estar asociados a otras proteínas diferentes a las que ejercen control en el NPQ de plantas superiores. Las candidatas son proteínas que pertenecen a la familia de proteínas de estrés (LHCSR). Se ha demostrado recientemente que de todos los genes de LHC, solo los del tipo LHCSR mostraron una mayor expresión en tejido superficial comparado con la expresión en tejido de profundidad (Konotchick 2012). Por lo tanto, se propone que en *M. pyrifera* las proteínas tipo LHCSR podrían ser el sitio de quenching en el aparato fotosintético de esta alga y la formación lenta de NPQ podría estar relacionada con el enlace de las xantofilas deepoxidadas a estas proteínas.

Capítulo 4

Efecto de la temperatura sobre la reacción de deepoxidación de del ciclo de las xantofilas y su efecto en la formación del NPQ en *M. pyrifera*

4.1. Introducción

Los pronósticos del calentamiento global de hasta 4 °C en los próximos 50 años según el panel intergubernamental de expertos sobre el cambio climático (IPCC) han incrementado el interés por conocer el efecto de un estrés térmico en los organismos. El estrés térmico algunas veces no puede ser medible en estudios ecológicos debido a que el crecimiento o la mortalidad de los organismos pueden no ser inmediatos. Sin embargo, a nivel fisiológico el efecto de un incremento en temperatura es inmediato y por lo tanto cuantificable. Varios procesos bioquímicos son susceptibles a la temperatura y generalmente el efecto de un estrés térmico aumenta la susceptibilidad del organismo a otros factores de estrés.

Un proceso bioquímico que es fundamental para los organismos fotótrofos que es fuertemente afectado por la temperatura es el ciclo de xantofilas (CX) (Bilger y Bjorkman 1994). Este ciclo consiste en la interconversión reversible y dependiente de luz, de las xantofilas violaxantina (Vx), anteraxantina (Ax) y zeaxantina (Zx) presentes en la membrana tilacoidea (Yamamoto et al. 1962). En condiciones de alta intensidad de luz, un pH menor a 6 en el lumen tilacoidal activa la enzima violaxantina (Vx) deepoxidasa (VDE) que convierte la Vx en anteraxantina (Ax) y luego en zeaxantina (Zx) (Yamamoto et al. 1962). En obscuridad o en luz de baja intensidad y ante un pH mayor a 6 ocurre la reacción inversa mediada por la enzima zeaxantina epoxidasa (ZE) (Yamamoto et al. 1962). La transformación reversible de estos carotenoides juega un papel central en la fotoprotección de plantas superiores, algas verdes, algas pardas, musgos y helechos (Heber et al. 2006; Jahns et al. 2009; Goss y Jakob 2010). La acción fotoprotectora del ciclo se asocia a la formación de Zx en luz saturante. La Zx es una molécula antioxidante apolar, por lo que su

formación y acumulación protege a los lípidos de la membrana tilacoide de la peroxidación lipídica y brinda estabilidad a la membrana durante condiciones de alta temperatura (Havaux y Niyogi 1999; Havaux et al. 2007). Además, la formación de Zx y Ax juegan un papel importante en la disipación térmica de energía de excitación en exceso en la antena del fotosistema II. La disipación térmica, la cual puede ser medible como la disminución de la fluorescencia no fotoquímica de la clorofila *a* (NPQ), protege al aparato fotosintético del daño por luz en exceso y por lo tanto es uno de los mecanismos de fotoprotección más importantes de los organismos fototróficos (Krause y Jahns 2004). Este proceso confiere una fuerte aptitud biológica a las plantas ante la variabilidad ambiental de la luz (Kulheim et al. 2002) e incrementa la resistencia al estrés ambiental (Demmig-Adams y Adams 2006; Li et al. 2009).

En el alga parda *M. pyrifera* el NPQ tiene una característica única. En esta alga el CX es el único mecanismo de control del NPQ (Garcia-Mendoza y Colombo-Pallotta 2007; Garcia-Mendoza et al. 2011). El tamaño del pool de carotenoides del ciclo de xantofilas, regula la tasa de formación de NPQ y la tasa de deepoxidación de Vx. La formación de NPQ en *M. pyrifera* carece del quenching energético (qE), un componente del NPQ que no requiere del CX pero sí de la formación de un gradiente de protones (ΔpH) a través de la membrana tilacoide y la activación de la proteína PsbS. El qE está presente en plantas superiores, algas verdes y diatomeas, pero no en algas pardas. Es posible que el NPQ en algas pardas sea un mecanismo de fotoprotección ancestral (Garcia-Mendoza et al. 2011). Las algas pardas evolucionaron del linaje de las algas rojas y las plantas superiores del linaje de las algas verdes. Por lo que el ciclo de xantofilas debió haber surgido antes de la separación de los linajes rojo y verde manteniendo su función fotoprotectora. En plantas superiores y algas verdes, la adquisición de la proteína PsbS brindó un nuevo mecanismo de control del NPQ, adicional a la regulación a través de las reacciones de interconversión del CX (Alboresi et al. 2010). En este sentido, es importante caracterizar el efecto que puede tener la temperatura en la interconversión de pigmentos del CX y su efecto en el NPQ. Así mismo es importante evaluar la actividad fotosintética y su relación con el NPQ ante diferentes temperaturas.

En plantas superiores la formación de Zx es afectada significativamente a temperaturas bajas, lo cual se ha relacionado a una mayor susceptibilidad a la fotoinhibición (Demmig et al. 1987; Krause 1994). En el caso contrario, las temperaturas altas aceleran la formación de Zx (Bilger y Bjorkman 1991; Arvidsson et al. 1997), ya que una temperatura alta estimula la separación de violaxantina de complejos proteico pigmentarios hacia la matriz lipídica (Arvidsson et al. 1997). En plantas superiores, la relación entre el CX y la formación de NPQ es distinta que en las algas pardas. Y en algas pardas no se sabe cómo afecta la temperatura a la actividad del CX. Si la temperatura afecta el CX y por lo tanto el NPQ, se reducirá la capacidad de fotoprotección de *Macrocystis* y probablemente esta pueda ser una de las causas del deterioro del tejido durante un aumento en la temperatura del agua, como cuando se presentan eventos del NIÑO. Alternativamente, el efecto de la temperatura sobre el CX podría representar una respuesta positiva al aumentar la capacidad o la cinética de formación del NPQ.

En este capítulo, se evaluó la influencia de la temperatura sobre la actividad fotosintética, el ciclo de xantofilas y la formación de NPQ en el alga parda *Macrocystis pyrifera*. Se demuestra que la temperatura por si sola (20 °C o más) es un factor de estrés para el alga parda *M. pyrifera*. Las temperaturas por encima de los 15°C “en oscuridad”, provocaron una respuesta típica de estrés térmico ya que se registro un aumento en del estado de deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas que son indispensables en el mecanismo de fotoprotección de esta alga, y se registró un descenso en la eficiencia cuántica del FSII que es un parámetro que indica la capacidad del proceso de fotosíntesis para utilizar la luz. Así mismo, se demostró que el ciclo de las xantofilas es un proceso altamente sensible a la temperatura. La iluminación con luz saturante de las muestras mantenidas previamente en oscuridad a temperaturas por encima de los 15°C provocó un incremento en la tasa de formación de NPQ asociado a un incremento en la tasa de deepoxidación de Vx. Sin embargo, a medida que la temperatura aumentó, también descendió la eficiencia de los pigmentos deepoxidados para hacer NPQ, por lo que se concluye que el pool de Zx formado por la acción de la temperatura no participa en la formación de NPQ pero podría estar participando en la estabilización de la membrana.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Material de estudio

Las muestras de *M. pyrifera* (L.) C. Agardh 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, en enero del 2010. Se colectaron hojas del dosel. Las hojas fueron transportadas al laboratorio en hieleras con agua de mar desde el sitio de colecta. La temperatura superficial del agua en el sitio de colecta fue de 16 °C.

De cada hoja se obtuvieron discos de tejido de 1.2 cm de diámetro cortados con un sacabocados a partir de 10 cm del pneumatocisto de cada una de las hojas libres de epifitas visibles. Los discos de 3 hojas fueron mezclados y mantenidos en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de agua de mar filtrada y aireación constante a una temperatura controlada de 16 ± 0.5 °C. Los discos fueron iluminados con lámparas de halógeno de 75 Watts a $75 \mu\text{moles fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante 4 horas, seguido de al menos 8 horas de incubación en oscuridad. Este tratamiento de luz tenue y oscuridad favoreció la epoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas. Después de este tratamiento, los discos muestreados presentaron una eficiencia cuántica máxima del FSII con valores promedio de 0.72 ± 0.05 , el cual es característico de tejido sano, no estresado de *M. pyrifera* (Colombo-Pallotta et al. 2006). Este parámetro fue estimado como F_v/F_m , donde F_v es la fluorescencia variable de la clorofila y F_m es la fluorescencia máxima de la clorofila.

4.2.2. Diseño experimental

Se realizaron experimentos de inducción de NPQ y curvas rápidas de la tasa de transferencia de electrones (ETR) en discos de tejido a 5 temperaturas diferentes: 10, 15, 20, 25 y 30 °C. Los discos se mantuvieron a cada una de las temperaturas probadas durante 30 minutos previos a la inducción de NPQ (en oscuridad) y durante la inducción de NPQ. La luz saturante ($1500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para inducir la formación de NPQ se obtuvo de lámparas dicróicas de 50 Watts (Tecno Lite) y la luz para las curvas rápidas de ETR provino de la fuente de luz interna del fluorómetro (Diving PAM; Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Se monitoreó la fluorescencia del FSII y la concentración de pigmentos en las muestras que fueron sometidas al tratamiento de temperatura. Durante el periodo de

iluminación, los discos estuvieron dentro de cámaras de acrílico con agua de mar en circulación a cada temperatura de prueba $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Asimismo, el agua de mar fue suplementada con NaHCO_3 a una concentración final de 5 mM para evitar limitación de CO_2 . La intensidad de luz se midió directamente en el sitio del disco, sumergiendo el micro sensor de luz del fluorómetro (Diving PAM; Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Un arreglo de varias cámaras interconectadas en serie permitió tener réplicas de las mismas condiciones. La variación de luz entre las cámaras fue menor a 10 %.

4.2.3. Mediciones de fluorescencia de clorofila *a*

La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del FSII fue medida con un fluorómetro de amplitud modulada sumergible (Diving PAM, Walz, Effeltrich, Germany). La fluorescencia del FSII se monitoreó colocando la sonda de fibra óptica del fluorómetro en un ángulo de 60° en relación al lado del disco expuesto a la luz. Esta geometría óptica se mantuvo durante el periodo de duración del experimento (10 min). El NPQ fue monitoreado en los discos de tejido del dosel iluminados con luz saturante y mantenidos a cada una de las temperaturas probadas. La medición de la emisión máxima de fluorescencia del FSII (F_m) en oscuridad o F_m' en luz; sin NPQ o con NPQ respectivamente, se hizo aplicando pulsos de luz saturante de $3500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad y 800 ms de duración. Los pulsos se aplicaron cada 30 s a las muestras mantenidas en oscuridad y durante el periodo de iluminación. El NPQ se calculó como: $F_m - F_m' / F_m'$. La cinética de formación de NPQ se obtuvo ajustando los datos de NPQ a la función sigmoideal ($y = (ax^b) / (c^b + x^b)$) la cual ha sido utilizada previamente para medir la tasa de formación de NPQ en diferentes mutantes de *arabidopsis thaliana* (Johnson et al. 2009; Zia et al. 2011). En esta función, *a* representa la amplitud máxima de NPQ, *c* es el tiempo (*x*) al cual *a* = 50% y *b* es el parámetro de sigmoidicidad. Por lo que, $1/c^b$ es la tasa de formación de NPQ.

La tasa de transporte de electrones (ETR) a diferentes intensidades de luz (curvas ETR-E) se calculó mediante la fórmula: $\text{ETR} = \Phi_{\text{PSII}} E_{\text{PAR}} 0.5 0.80$ donde Φ_{PSII} es la separación de cargas efectiva del FSII determinada como $(F_m' - F) / F_m' = \Delta F / F_m'$. F_m' y *F* son la fluorescencia máxima y la mínima en presencia de luz actínica, respectivamente. E_{PAR} es la intensidad de luz en $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.80 es la fracción de luz incidente absorbida

(absortancia promedio) y el factor 0.5 se utiliza ya que para el transporte lineal de electrones se requiere la absorción de un mínimo de 2 fotones. Las curvas ETR fueron realizadas al exponer secuencialmente a las muestra a 12 intensidades de luz por un periodo de 10 segundos. La irradiancia máxima utilizada fue de $1260 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La luz actínica fue provista por la fuente de luz interna del Diving PAM.

La cinética del ETR se obtuvo ajustando los datos de ETR al modelo: $\text{ETR} = \text{ETR}_{\text{max}} [\tanh (\alpha_{\text{ETR}} / \text{ETR}_{\text{max}} E_{\text{PAR}})] \exp (-\beta_{\text{ETR}} / \text{ETR}_{\text{max}} E_{\text{PAR}})$. Donde ETR_{max} es la tasa máxima de transporte de electrones; α_{ETR} , es la eficiencia en el transporte de electrones y β_{ETR} , es la reducción en el transporte de electrones en presencia de alta luz. Para el ajuste de los datos a cada una de las funciones descritas se usó el algoritmo de Marquardt–Levenberg del programa Sigmaplot (Jandel SSP Scientific, Chicago, IL, USA).

4.2.4. Análisis de pigmentos

Las muestras para el análisis de pigmentos se tomaron por triplicado en los discos previamente incubados a cada temperatura en oscuridad por 30 minutos (t_0) y a 1, 3, 5, 7, 10 y 12 min durante el tratamiento de iluminación. Cada disco colectado fué congelado inmediatamente y almacenado en nitrógeno líquido hasta su análisis posterior. Los pigmentos fueron extraídos y analizados de acuerdo a Colombo Pallotta (2006). La extracción de los pigmentos se realizó con 3 ml de acetona al 100%, previa molienda del disco congelado con nitrógeno líquido. Para asegurar una buena extracción, se dejó el tejido con el solvente a 4°C durante toda la noche y después se centrifugó a $13,000 \times g$ (4°C) por 5 minutos. El sobrenadante con los pigmentos se almacenó a -20°C antes del análisis por HPLC. El instrumento de HPLC, Shimadzu AV-10 (Kyoto, Japon) fue equipado con una columna de fase reversa (4.6 mm x 150 mm, $3.5 \mu\text{m}$ tamaño de partícula) Zorbax Eclipse XDB C8 (Agilent Technologies, Englewood, CO). El sistema fue calibrado con estándares externos (DHI Inc., Hoersholm, Denmark).

El estado de deepoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (DPS) fue calculado como: $[Z_x] + 0.5[A_x] / \Sigma\text{CX}$ (Gilmore y Yamamoto 1993). A_x y Z_x son anteraxantina y zeaxantina respectivamente. ΣCX es el pool total de pigmentos del ciclo de xantofilas, o la suma de la concentración de V_x , A_x y Z_x . El DPS representa el estado

fotoprotectivo del CX ya que Ax y Zx están involucrados en la disipación térmica, que confiere fotoprotección al FSII (Pfündel y Bilger 1994). La tasa de deepoxidación (tasa de DPS) se calculó ajustando los datos a la función de Hill previamente descrita para el cálculo de la tasa de formación de NPQ.

Se evaluaron de manera individual la tasa de deepoxidación de Vx y la tasa de formación de Zx y la tasa de acumulación de anteraxantina. La tasa constante de deepoxidación de Vx, representa a la primera reacción de deepoxidación del ciclo de xantofilas (k_1 ; conversión de Vx a Ax). Esta tasa (k_1) se calculó ajustando los datos de la disminución de Vx durante el periodo de iluminación usando la función. $y = A \cdot \exp^{-bx}$. Donde A es la amplitud de la deepoxidación de Vx y b es la tasa constante de deepoxidación. La tasa constante de formación de Zx representa a la segunda reacción del ciclo de xantofilas (k_2 ; conversión de Ax a Zx). Esta tasa (k_2) se calculó ajustando los datos del incremento de zeaxantina durante el periodo de iluminación usando la función $y = y_0 + A \cdot [1 - \exp^{-bx}]$, donde A es la formación máxima de Zx, b es la tasa constante de formación de Zx. Para el ajuste de los datos a cada una de las funciones descritas, se usó el algoritmo de Marquardt–Levenberg del programa SigmaPlot (Jandel SSP Scientific, Chicago, IL, USA).

4.2.5. 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 (SigmaPlot software, Jandel SSP scientific). Los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete Statistica 6.0, realizando pruebas ANOVA (Zar 1984), luego de corroborar que las muestras cumplieran con el supuesto de homogeneidad de varianzas usando la prueba de Cochran (Underwood 1997). En todos los casos el valor de significancia fue de $\alpha = 0.05$. Todos los datos se presentan como la media ± 1 desviación estándar (DS)

4. 3. Resultados

4.3.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad del FSII y del ciclo de xantofilas en *Macrocystis pyrifera*

Antes de los tratamientos de temperatura, las muestras obtenidas del campo fueron sometidas a un tratamiento de luz tenue–oscuridad. Al final de este tratamiento se midió la concentración de pigmentos y la eficiencia cuántica máxima del FSII. La concentración de los pigmentos del CX fue de $14.5 \pm 0.9 \text{ mol mol}^{-1} \text{ chl } a \times 100$, el estado de deepoxidación (DPS= $[Z_x]+0.5 [A_x]/\Sigma CX \times 100$) del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas ΣCX fue 2.1 ± 0.2 y la eficiencia cuántica del FSII fue 0.72 ± 0.02

Los discos de tejido aclimatado fueron expuestos en oscuridad, a las diferentes temperaturas. El cambio rápido a una temperatura mayor a la de incubación (16°C) en ausencia de luz causó un aumento en el estado de deepoxidación del ciclo de xantofilas (DPS) y una reducción en la eficiencia cuántica máxima del FSII (F_v/F_m) (Fig. 17).

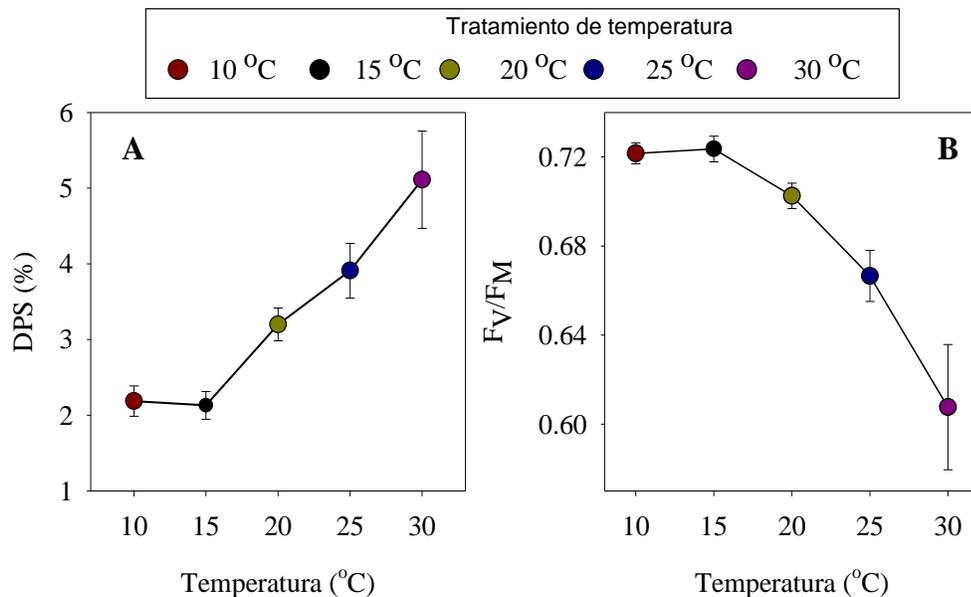


Figura 17. Estado de deepoxidación de los carotenoides del ciclo de xantofilas (DPS) (Panel A) y eficiencia cuántica máxima del FSII (F_v/F_m) en hojas del dosel de *M. pyrifera* mantenidas por 30 min en oscuridad y expuestas a diferentes temperaturas. Cada punto es el promedio de 5 replicas. Las barras de error muestran la desviación estándar. El color de los símbolos representa la temperatura del tratamiento: 10°C , rojo; 15°C , negro; 20°C , verde oliva; 25°C , azul y 30°C , morado.

El estado de deepoxidación (DPS) de los discos expuestos a 10 y 15 °C no presentó diferencias significativas (ANOVA, $p > 0.05$) con el medido a la temperatura de incubación (Fig. 18A). El estado de deepoxidación (DPS) fue de 2 en las muestras expuestas a 10 y 15 °C y de 3, 4 y 5 a 20, 25 y 30 °C, respectivamente. La temperatura también afectó la eficiencia cuántica máxima. A las temperaturas 10 y 15 °C no se registraron cambios significativos (ANOVA, $p > 0.05$) respecto a la temperatura de incubación, pero en las muestras expuesta a 20, 25 y 30 °C, la eficiencia cuántica del FSII se redujo en un 4, 9 y 15 %, respectivamente (Fig. 18B).

La exposición de las muestras a distintas temperaturas tuvo un efecto sobre la tasa de transporte de electrones del FSII (ETR). En la figura 18, se muestran las curvas ETR vs irradiancia y los parámetros derivados del ajuste al modelo de Platt. La relación ETR vs E fue similar en la muestra incubadas a 10 y 15 °C (Fig. 18A), pero fueron diferentes a 20, 25 y 30°C. Todas las muestras presentaron una reducción en ETR a irradiancia mayores de 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 18A). La diferencia de la relación ETR vs E entre tratamientos se ve reflejada en los parámetros derivados de esta relación. El ETRmax es similar en muestras expuesta a 10 y 15 °C (ANOVA, $p > 0.05$) y disminuye en los tratamientos a temperaturas mayores (ANOVA, $p < 0.05$). El ETRmax fue 20% menor en muestras expuestas a 20 °C respecto al detectado en muestras expuestas a 10 y 15 °C (Fig. 18). La reducción de ETRmax fue del 30% en muestras expuestas a 25 °C y de un 50% a 35°C.

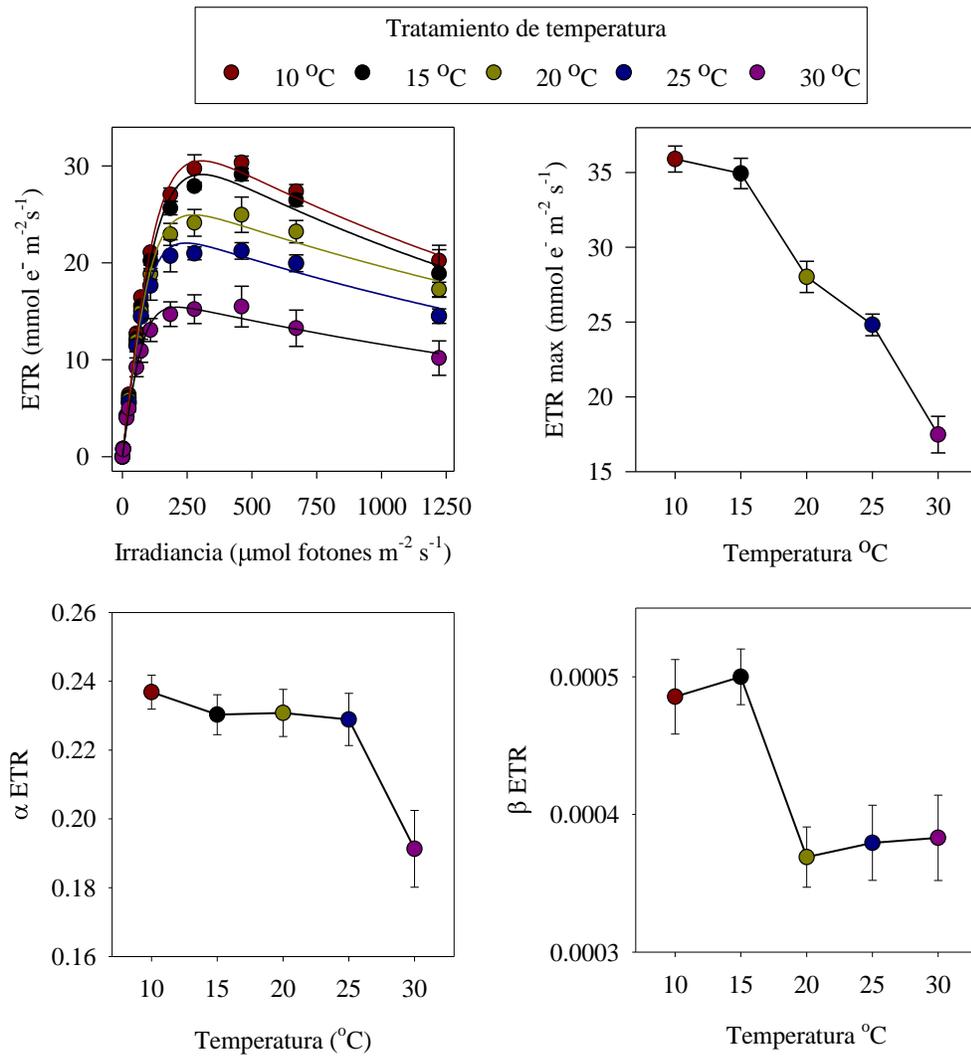


Figura 18. Relación ETR vs irradiancia obtenida mediante curvas rápidas en muestras de *M. pyrifera* mantenidas por 30 min a diferentes temperaturas en oscuridad (A). Tasa máxima del transporte de electrones del FSII (ETR max) en función de la temperatura (B). Tasa de formación del ETR (α ETR) a diferentes temperaturas (C). Tasa de inhibición del ETR (β ETR) a diferentes temperatura. Los parámetros en B, C y D fueron obtenidos del ajuste al modelo de Platt (1980), las barras muestran el error estándar del ajuste. Los colores de los símbolos representan la temperatura de cada tratamiento: rojo, 10 °C; negro, 15 °C; verde oliva, 20 °C; azul, 25 °C y morado 30 °C. Cada punto es el promedio de n=5. Las barras de error muestran la desviación estándar.

La tasa inicial de incremento del ETR (α -ETR) no se vio afectada por la temperatura en muestra expuesta desde los 10 °C hasta los 25 °C (ANOVA, $p > 0.05$). A 30 °C se observó una reducción significativa (ANOVA, $p < 0.05$) de aproximadamente 20% respecto

de la α -ETR detectada en muestras del tratamiento de 15 °C. La tasa de fotoinhibición del ETR (β -ETR) fue similar en los tratamientos de 10 y 15 °C (ANOVA, $p>0.05$) y fue significativamente menor en los tratamientos a temperaturas mayores (ANOVA, $p<0.05$). El β -ETR fue similar en las muestras expuestas a 20, 25 y 30 °C y fue 20% menor al detectado en muestras expuestas a 10 y 15 °C

4.3.2. Formación de NPQ en *Macrocystis pyrifera* en muestras expuestas a diferentes temperatura

Se realizaron curvas de inducción de NPQ a las muestras de *M. pyrifera* expuestas a diferentes temperaturas por 30 min. En la figura 19A, se muestran las curvas de formación de NPQ a cada temperatura. La formación de NPQ a través del tiempo fue diferente en cada tratamiento. Las muestras expuestas a 10 °C presentaron una formación de NPQ que puede describirse mediante una curva sigmoidea que tendió a un comportamiento tipo exponencial a medida que la temperatura incremento (fig 19A). El NPQ máximo detectado al final del periodo de iluminación fue similar en las muestras expuestas a 10, 15, 20, 25 °C. En contraste, a 30 °C el NPQ fue 50% menor del detectado a temperaturas mas bajas (Fig. 19A). Los datos de NPQ de las curvas se ajustaron a una función sigmoidea de Hill para obtener las tasas de formación de NPQ. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de formación de NPQ a 10 y 15 °C (ANOVA, $p>0.05$) (Fig 19B). Sin embargo, la tasa de formación de NPQ fue mayor a 20, 25 y 30 °C (Fig 19B). Esto indica que el valor máximo de NPQ en *M. pyrifera* se alcanza mas rápido a mayores temperaturas (Fig 19B).

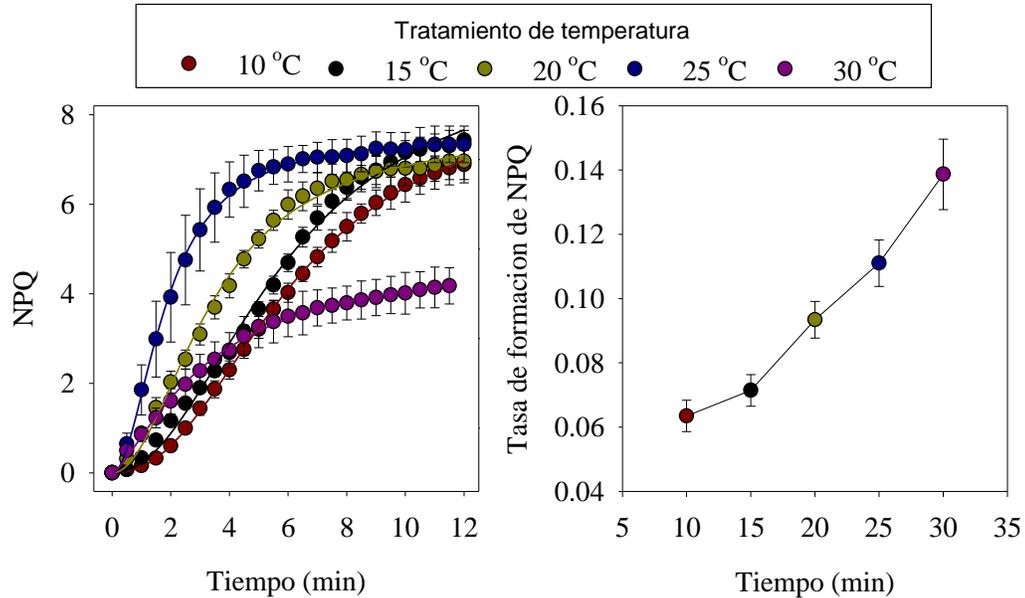


Figura 19. A) Curvas de formación de NPQ en tejido del dosel de *Macrocyctis pyrifera* expuestas a diferentes temperaturas. En el panel B, se muestra la tasa de formación de NPQ obtenida del ajuste al modelo sigmoideo. Los colores representan la temperatura del tratamiento.

4.3.3. Efecto de la temperatura sobre la deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas

Se monitoreó el curso de la deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas en las muestras expuestas a diferente temperatura. Los cambios en el contenido de Vx, Ax y Zx durante el periodo de iluminación en las muestras tratadas a 5 diferentes temperaturas, las cuales se muestran en la figura 20. En todos los tratamientos se detectó una disminución de la concentración de Vx al exponer las muestras a luz saturante (Fig. 20A). Sin embargo, la temperatura influyó en la tasa de deepoxidación de este pigmento. La deepoxidación de violaxantina fue menor en las muestras expuestas a 10 °C (Fig. 20A). En estas muestras la concentración inicial de Vx ($14.5 \text{ mol mol}^{-1} \text{ chl } a \times 100$) se redujo a $10 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$ después de 12 min de exposición a luz. La mayor deepoxidación de Vx se registró en las muestras expuestas a 25 °C, la concentración de Vx pasó de 13.5 a $7 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$.

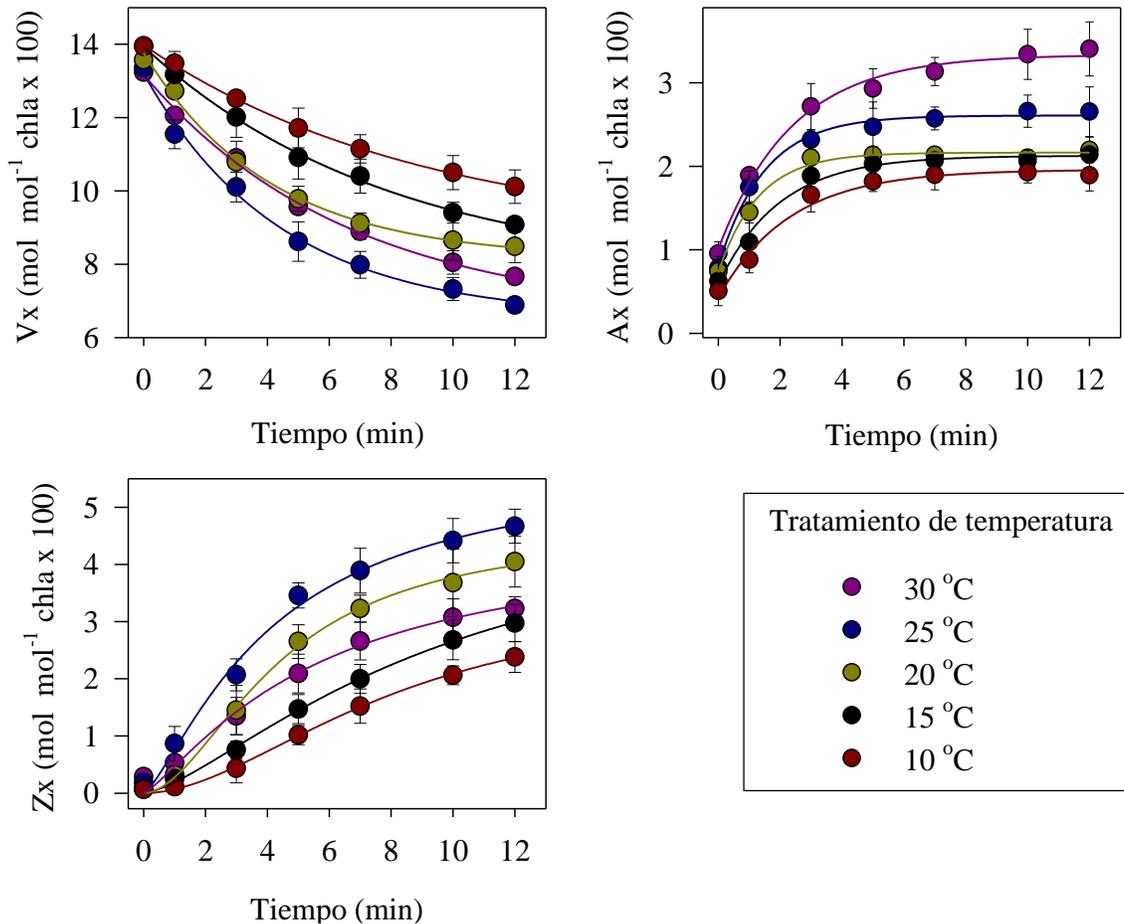


Figura 20. Deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas en luz saturante en muestras expuestas a diferentes temperaturas. Se presenta el cambio en la concentración de violaxantina (Vx), antheraxantina (Ax), zeaxantina (Zx) y en el estado de deepoxidación (DPS) durante el periodo de iluminación.

La concentración de Ax fue medida durante el periodo de iluminación en las muestras tratadas a las diferentes temperaturas (Fig. 20B). En las muestras expuestas a 10, 15 y 20 °C, la concentración máxima de Ax ($2 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$) fue similar al final del periodo de exposición a luz saturante (ANOVA, $p > 0.05$). Se detectó una concentración mayor en los tratamientos a 25 y 30 °C de 2.5 y 3.5 $\text{mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$, respectivamente (Fig. 20B). La concentración de zeaxantina más alta registrada al final del periodo de iluminación se detectó en las muestras expuestas a 25 °C ($4.5 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$) y la menor concentración se presentó en las muestras mantenidas a 10 °C ($2.1 \text{ mol mol}^{-1} \text{ Chl } a \times 100$).

Los datos de la concentración de pigmentos durante la iluminación a diferentes temperaturas de la figura 20, se ajustaron a modelos matemáticos (c.f Materiales y métodos) para obtener la tasa de deepoxidación de Vx (b₁) y la tasa de formación de Zx (b₂) (fig 21).

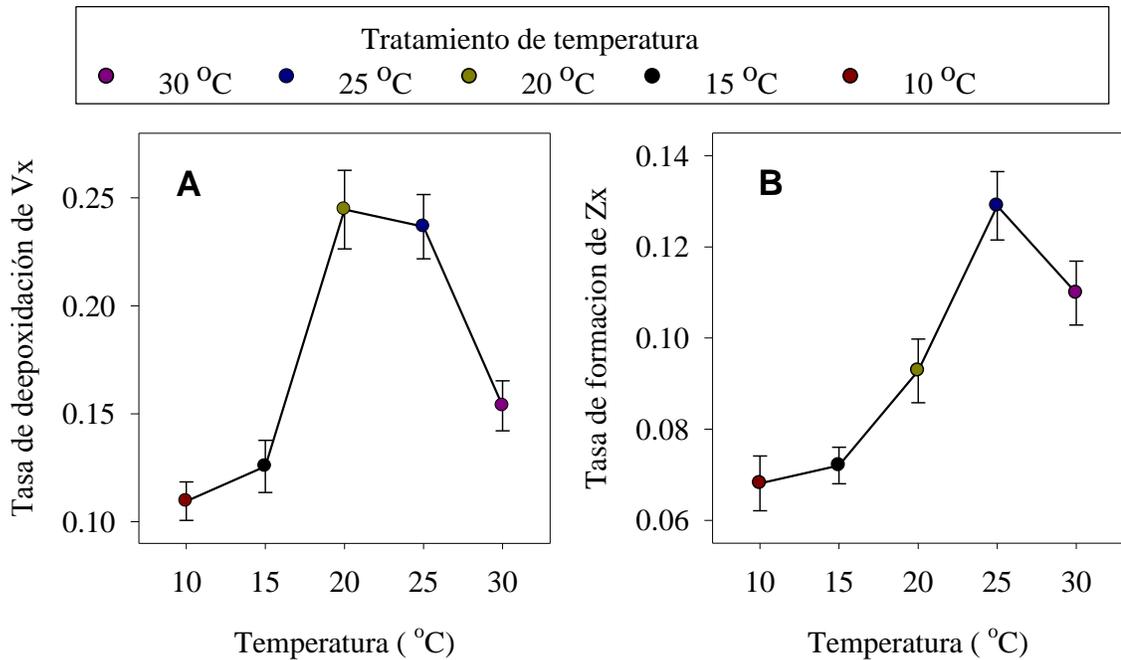


Figura 21. Relación de la tasa de formación de los pigmentos del ciclo de xantofilas en función de la temperatura. Tasa de disminución de Vx (A). Tasa de acumulación de Zx (B). Tasa de incremento del estado de deepoxidación (DPS).

Las tasas de deepoxidación de Vx en las muestras expuestas a 10 °C y 15 °C (Figura 21) fueron las más bajas (0.11 min^{-1} y 0.12 min^{-1} respectivamente) y no hubo diferencias significativas en ambas temperaturas (ANOVA, $p > 0.05$). En cambio, a 20 y 25 °C, la tasa de deepoxidación de Vx fue 0.24 min^{-1} , esto representa un incremento del doble en comparación a la tasa encontrada a 10 y 15 °C. No obstante a 30 °C la tasa de deepoxidación de Vx disminuyó drásticamente hasta 0.15 min^{-1} . La tasa de formación de Zx aumentó en función de la temperatura desde los 10 °C hasta 25 °C, pero a 30 °C la tasa de formación de zeaxantina disminuyó drásticamente.

4.3.4. Efecto de la temperatura en la relación del NPQ y el CX

Se relacionó el NPQ con el estado de deepoxidación del pool de pigmentos xantofílicos de las muestras tratadas a las diferentes temperaturas (Fig. 22A). El coeficiente de correlación r^2 de la relación del NPQ y el DPS fue superior a 0.95 tal como se ha reportado previamente (Ocampo Alvarez et al 2013). Sin embargo la pendiente de la relación entre el NPQ y el DPS fue diferente. Es posible observar en la figura 22 que las muestras expuestas a 10 °C necesitaron alcanzar un un 20% de DPS, mientras que las muestras expuestas a 25 °C necesitan un 40% de DPS. Esto indica que a menor temperatura los pigmentos deepoxidados fueron mas eficientes para inducir NPQ.

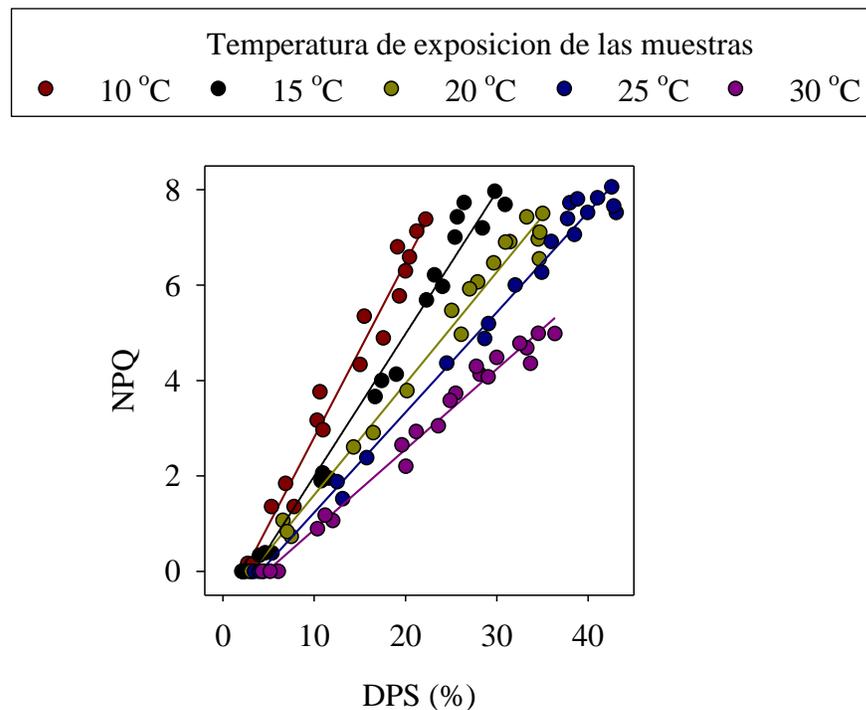


Figura 22. Relación del NPQ y el estado de deepoxidación de las muestras expuesta a las diferentes temperaturas (A). Se tomaron los valores de las tres replicas del DPS y el NPQ.

4.4. Discusión

4.4.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad fotosintética del FSII y la actividad del ciclo de xantofilas en *Macrocystis pyrifera*

En alga parda *M. pyrifera*, la temperatura de 20 °C provocó la disminución de la actividad fotosintética y la activación del ciclo de las xantofilas como una respuesta de estrés térmico. Las temperaturas de 20 °C o más, indujeron la deepoxidación de V_x (DPS) en oscuridad y en paralelo una disminución de la eficiencia cuántica del FSII (F_v/F_M) y disminución de la tasa de transporte de electrones (ETR) en *M. pyrifera*.

Los resultados mostraron que a 20 °C la capacidad fotosintética, medida como la tasa de transporte de electrones del FSII (ETR), se redujo hasta un 20% respecto a lo detectado a 10 y 15 °C. Este resultado concuerda con la reducción encontrada en el F_v/F_M, la cual indicó que a las temperaturas de 20 °C y superiores una porción de los centros de reacción del FSII se inactivaron, provocando la disminución de la capacidad fotosintética. El estrés térmico en *M. pyrifera*, se comprobó al encontrar que a 20 °C se activó el ciclo de xantofilas en oscuridad, lo que se reflejó en el aumento del estado de deepoxidación. La deepoxidación en oscuridad ha sido relacionada recientemente como una respuesta típica de estrés en algas pardas (Fernandez-Marin et al. 2011). En el alga parda *Pelvetia canaliculata* diferentes factores de estrés incluidos la desecación, la anoxia y la alta temperatura (32 °C) inducen deepoxidación de violaxantina en oscuridad y provocan disminución de la eficiencia cuántica (Fernandez-Marin et al. 2011).

Los resultados de esta investigación sugieren que *M. pyrifera* es altamente sensible a la temperatura, pues la exposición a corto plazo (30 min) y ante una temperatura relativamente baja (20 °C), presentó una respuesta característica de estrés térmico.

4.4.2. Formación de NPQ y deepoxidación de los pigmentos del ciclo de xantofilas en *Macrocystis pyrifera* expuesta a diferentes temperaturas

En *M. pyrifera* la formación de NPQ y la deepoxidación de V_x durante la formación de NPQ en luz saturante estuvieron fuertemente influenciadas por la temperatura. En plantas superiores la temperatura induce un cambio conformacional en las antenas del FSII que favorece la liberación de V_x. En este sentido un pool de V_x disponible

para ser deepoxidado incrementa la tasa de deepoxidación y por consiguiente de la tasa de formación de NPQ en plantas superiores (Bilger y Bjorkman 1991). Es posible que el aumento de temperatura en *Macrocystis pyrifera* produzca un proceso similar al que pasa en plantas al permitir una mayor interacción entre Vx y la enzima VDE. Sin embargo, la temperatura también puede afectar la tasa de deepoxidación y con ello la tasa de formación de NPQ. En un trabajo previo se demostró que en *M. pyrifera* la tasa de formación de NPQ incrementa cuando existe un pool de Ax presente previo a la formación de NPQ, por lo que se sugirió que mantener un pool de Ax en condiciones de estrés es una estrategia de fotoprotección que permite responder rápidamente ante un posible daño inducido por el exceso de luz (Garcia-Mendoza et al. 2011). El incremento en la tasa de formación de NPQ en presencia de Ax preformada no fue del tipo qE, ya que el NPQ siempre se relacionó linealmente con el estado de deepoxidación. Por lo tanto el efecto de la presencia de Ax fue incrementar la tasa de deepoxidación ya que Ax tiene un grupo epóxido menos que Vx y por lo tanto reduce los pasos de deepoxidación y provoca un incremento neto en la tasa de deepoxidación (Garcia-Mendoza et al. 2011). En este trabajo, se encontró que las muestras tratadas a 20 °C y a temperaturas mayores, presentaron un DPS mayor a las muestras mantenidas a temperaturas de 10 y 15 °C. Por lo tanto, la deepoxidación en oscuridad y en específico, la acumulación de Ax en oscuridad, también pudo contribuir a la aceleración de la tasa de deepoxidación y por consiguiente a la formación de NPQ más rápido.

De las tasas de deepoxidación de Vx (b1) y de la tasa de formación de Zx (b2), podemos concluir que la temperatura afecta de manera diferente a ambas tasas de formación, mientras que a 10 y 15 °C b1 y b2 permanecen relativamente constantes, a 20 y 25 °C el comportamiento de estas constantes fue distinto. El aumento en la tasa de deepoxidación de Vx a 20 y 25 °C fue mayor al aumento en la tasa de formación de Zx. Esto ocasionó una acumulación neta de Ax. Es posible que la temperatura influya directamente en una mayor interacción entre un pool de Vx con la enzima VDE derivada de un aumento en la fluidez de la membrana. Siguiendo con esta lógica, el hecho de que a 25 °C ya no aumente más la tasa de deepoxidación de Vx apoya la hipótesis de que existe un pool de Vx probablemente unido a proteínas tipo LHSCR, el cual puede ser fácilmente deepoxidado. Probablemente la temperatura de 20 y 25 °C favorezcan la liberación total de

este pool y por lo tanto la tasa de deepoxidación de Vx fue máxima y similar en esas dos temperaturas de exposición de las muestras. En contraste, la disminución de la tasa detectada a 30 °C puede deberse a un exceso de fluidez de la membrana en la cual la Vx presenta menos posibilidades de interaccionar con la enzima VDE o a que la interacción no es lo suficientemente estable para permitir la deepoxidación. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que a 30 °C la deepoxidación se redujo hasta en un 50 % respecto a todas las demás temperaturas. En lo que respecta a la segunda constante de deepoxidación del ciclo de xantofilas medida parcialmente con la formación de Zx. Es posible que la temperatura este influenciando a la enzima ZE, que es la encargada de la epoxidación de Zx. Se ha demostrado que la enzima ZE es clave en la regulación del CX en algas pardas ante un factor de estrés (Fernandez-Marin et al. 2011). Fernandes Marin, explica que tanto la VDE como la ZE permanecen activas a un nivel basal en oscuridad, pero la mayor actividad de la ZE en oscuridad favorece la epoxidación de Zx y Ax, dando como resultado los característicos bajos niveles del DPS en oscuridad en estas algas. No obstante, diversos factores de estrés de los que destacan, la desecación y la temperatura provocan la inactivación de la ZE, sin afectar la VDE, provocando la formación de Ax y Zx en oscuridad (Fernandez-Marin et al. 2011). En el caso de *M. pyrifera*, es posible que la temperatura tan baja como 20 °C sea suficiente para inactivar la ZE provocando la formación de Ax y Zx en oscuridad así como el aumento en la tasa de formación de Ax y Zx en presencia de luz saturante.

4.4.3. Efecto de la temperatura en la relación del NPQ y CX

El estado de deepoxidación y el NPQ guardan una relación muy estrecha en el alga parda *M. pyrifera* y esta relación se mantiene aun cuando se induce el NPQ a diferentes intensidades de luz o en muestras con distintos estados de aclimatación (Ocampo-Alvarez et al. 2013). Por lo que se sugirió la existencia de un número fijo de sitios de NPQ en el alga parda (Ocampo-Alvarez et al. 2013). En este trabajo nuestros resultados mostraron que la relación del NPQ con el DPS cambia en función de la temperatura. Las pendientes de las rectas formadas por la relación entre NPQ y DPS variaron en función de la temperatura lo que indica que una parte de los pigmentos deepoxidados, Zx y Ax no ocuparon los sitios de

quenching. Esto puede explicarse por el hecho de que la unión de los pigmentos deepoxidados a los sitios de quenching dentro de las proteínas en un ambiente de alta temperatura es más débil, además de que la membrana es más fluida y los pigmentos pueden difundir en la fase lipídica en vez de unirse fuertemente a sus sitios efectores del quenching. Esto permite explicar la menor eficiencia de quenching a temperaturas altas. El pool de xantofilas deepoxidadas que no participó en el NPQ es probable que haya difundido en la membrana tilacoidal. La presencia de un pool de Zx en la membrana del tilacoide ha sido demostrada en plantas superiores así como el análogo de la Zx, que es la diatoxantina (Dx) en diatomeas. En ambos grupos de organismos la Zx y Dx puede hallarse libre en la membrana donde realizan funciones de fotoprotección al evitar la peroxidación lipídica (fotoprotección) y brindar estabilidad de la membrana tilacoidal ante una posible separación de fases debido a la temperatura (Havaux et al. 2007). Es muy probable que en *M. pyrifera* el pool de Zx que no participa en el NPQ esté disuelto en la membrana protegiendo los lípidos y manteniendo la fluidez óptima de la membrana.

En el caso de las muestras mantenidas a menor temperatura se observó que la tasa de deepoxidación es más lenta, probablemente por la menor disponibilidad de pigmentos libres al permanecer asociados a sus sitios en las proteínas del aparato fotosintético. Sin embargo, una vez deepoxidados los pigmentos permanecen más cerca de su sitio de unión y por lo tanto la eficiencia de quenching de los pigmentos a baja temperatura es mayor.

4.4.4. Efecto de la temperatura en *M. pyrifera*.

La relación de la disminución del estado de salud de los bosques de macroalgas con episodios de incremento de temperatura en su medio es bastante conocida. No obstante, los episodios de incremento de temperatura del agua, vienen acompañados de cambios importantes en otras variables las cuales también pueden ser un factor de estrés, como como la disminución de nutrientes y la estratificación de la columna de agua. Los estudios ecológicos realizados en el medio natural en épocas de alta temperatura pero adicionando nutrientes sugieren que la falta de nutrientes típica de los episodios de incremento de temperatura tienen más influencia que la temperatura por sí misma en el estado de salud de los mantos de macrocystis. No obstante en este trabajo se ha demostrado que la temperatura

por si sola y en el rango de 20 °C en adelante, es un factor de estrés para el alga *M. pyrifera*, que ocasiona disminución de la eficiencia fotosintética y de la tasa de transporte de electrones, con un aumento de la fotoprotección. Siendo la deepoxidación de Vx en Ax y Zx en oscuridad una consecuencia importante.

Capítulo V

Discusión General

El aparato fotosintético de las algas, comparte muchas de las funciones esenciales en la fotosíntesis con las plantas superiores. Sin embargo, las plantas y las algas se han diversificado durante varios millones de años y presentan distintas estrategias bioquímicas para sobrevivir en sus respectivos ambientes. El ciclo de las xantofilas es un proceso enzimático y reversible de interconversión de pigmentos que permite absorber energía y direccionarla hacia el proceso de fotosíntesis cuando la luz es baja. En contraste, cuando la luz es alta, el CX contribuye a proteger el aparato fotosintético del daño oxidativo. En plantas y algas el CX es un componente molecular esencial en el mecanismo de fotoprotección mediante la disipación térmica, sin embargo, en algas pardas no está del todo claro cómo funciona este mecanismo de fotoprotección a nivel molecular. Los resultados obtenidos en la presente tesis indicaron que el mecanismo de NPQ en *M. pyrifera* depende de las reacciones de interconversión del ciclo de xantofilas y los factores que puedan afectar estas reacciones afectan la formación y disipación de NPQ.

En el capítulo 2 se comprobó que en la disipación del NPQ en *M. pyrifera* participan solo dos componentes con una cinética diferente. Así mismo, se comprobó que el componente rápido de formación de NPQ (qE) no está presente en esta alga. Los dos componentes asociados a la formación de NPQ en *M. pyrifera* son similares a los componentes qZ y qI descritos en plantas superiores y estos son dependientes de las reacciones de interconversión del ciclo de xantofilas. Se encontró así mismo, que en *M. pyrifera* la competencia entre xantofilas deepoxidadas y la Vx influyen directamente en la formación y disipación del NPQ y no únicamente en la concentración de Zx como se pensaba. Además, se descubrió que después de una exposición prolongada a luz saturante, se conserva un pool de Ax que puede llegar a ser hasta del 50% de la concentración

máxima de Ax formada en luz. La retención de xantofilas deepoxidadas y especialmente la retención de Ax, podrían ser una estrategia para responder más rápido cuando existe condición de transición de una condición de luz subsaturante a una condición de luz estresante. Esta propuesta es apoyada por resultados previos (Garcia-Mendoza et al. 2011) en los que se demostró que la concentración de Ax en el caso de *M. pyrifera* está relacionada con el incremento de la tasa de formación de NPQ. Por lo tanto, la anteraxantina puede funcionar como un sustrato de fácil acceso a la VDE y que favorece la formación de Zx y la formación de NPQ (Garcia-Mendoza et al. 2011).

En el capítulo 3 de esta tesis se demostró que el tamaño del pool de pigmentos del CX controla la tasa de formación de NPQ pero no controla la amplitud máxima del NPQ. Un pool grande acelera la respuesta de fotoprotección (formación de NPQ) al acelerar las reacciones de deepoxidación del ciclo de xantofilas. Además de los pigmentos deepoxidados indispensables para la formación de NPQ, un factor importante para la formación del NPQ es el sitio de unión de estos pigmentos. Estos sitios de unión probablemente estén ubicados en las proteínas tipo LHCSR ya que las proteínas tipo CAB no están presentes en algas pardas.

A partir de los resultados obtenidos de los componentes de la cinética de formación y disipación de NPQ (Capítulo II) y la influencia del tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas, sobre las reacciones de interconversión de carotenoides del ciclo de xantofilas y la formación de NPQ (Capítulo III), se propuso un modelo conceptual del mecanismo de disipación térmica para *M. pyrifera* (Fig. 23). En este modelo se presenta un arreglo hipotético de la antena de *Macrocystis pyrifera*. Este arreglo es diferente del que presentan las plantas superiores (Katoh y Ehara 1990; Douady et al. 1994) debido a que las antenas proteico-pigmentarias que contienen fucoxantina (fucoxanthin-binding proteins; FCPs) están enlazadas fuertemente en forma de oligómeros (Katoh y Ehara 1990). Se muestra el arreglo de la antena en hojas de la superficie de la columna de agua y en hojas de estratos profundos. Las hojas de superficie tienen un pool de xantofilas grande el cual está formado principalmente por un pool de violaxantina fácilmente accesible a la enzima violaxantin deepoxidasa (VDE). Este pool de Vx puede estar asociado a alguna proteína

específica o disuelto en la membrana tilacoide en el dominio hexagonal del lípido monogalactosyldiacilglicerol (MGDG). En oscuridad la VDE esta inactiva o presenta una actividad mínima (actividad basal). En luz saturante esta enzima se activa o incrementa su actividad, mientras que la actividad de la enzima zeaxantina epoxidasa (ZE) disminuye. Esto ocasiona que la concentración de Ax y Zx aumente en los dominios hexagonales del MGDG. Estas xantofilas menos polares (Ax y Zx) se difunden hacia la membrana lipídica y desplazan a la Vx de sus sitios de enlace, que es probablemente una proteína de la familia de los complejos captadores de luz relacionados al estrés (Light-Harvesting Complex Stress Related protein; LHCSR). Por lo tanto, existe una competencia entre los pigmentos epoxidados y los deepoxidados por los sitios de quenching en estas proteínas. La violaxantina enlazada a algunas FCP's no relacionadas a las LHCSR es inaccesible a la VDE. La concentración de proteínas del tipo LHCSR en las hojas de superficie es alto y en consecuencia, los sistemas antena tienen un mayor número de sitios de quenching. Las muestras aclimatadas a baja luz tienen pocos sitios de quenching y por lo tanto, se saturan a concentraciones bajas de pigmentos deepoxidados. Un pool de pigmentos del ciclo de xantofilas grande, una alta concentración de Vx accesible a la VDE, junto con una alta concentración de proteínas LHCSR (sitios de disipación) en hojas de superficie, se asocia a una respuesta rápida de *M. pyrifera* a las condiciones de estrés.

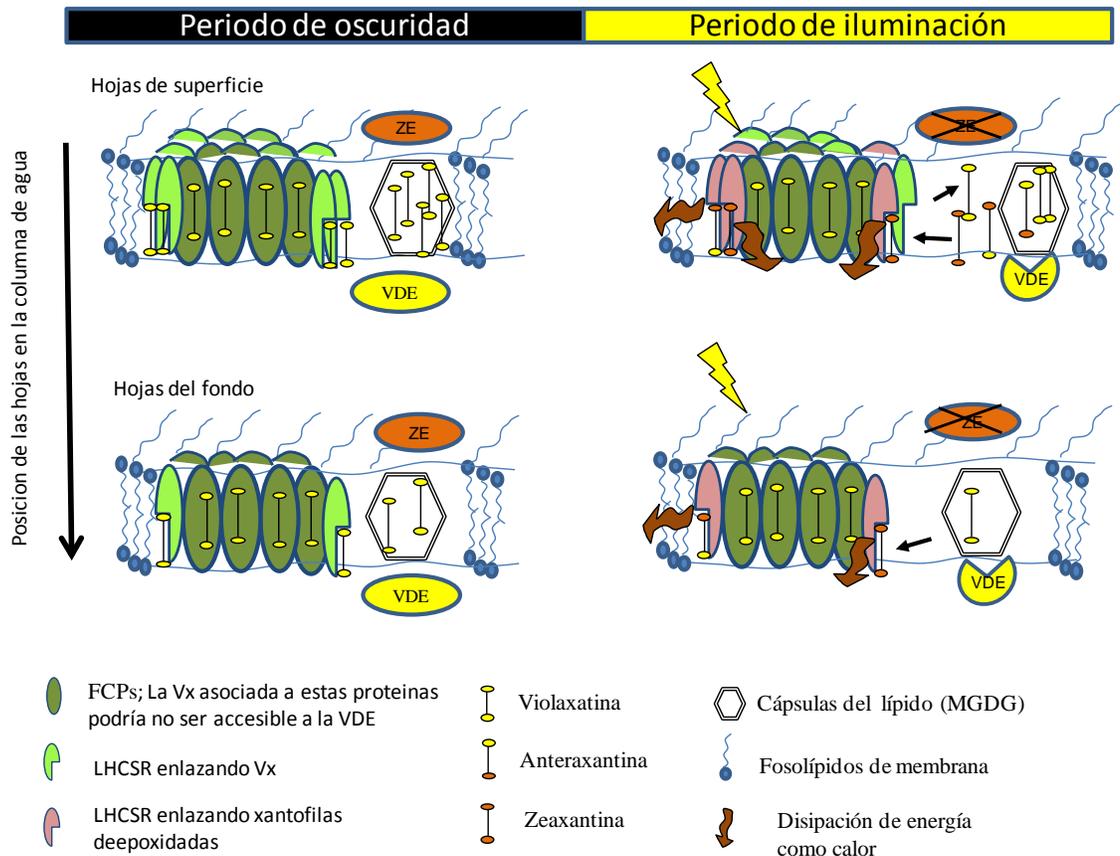


Figura 23. Modelo de control de NPQ en el alga parda *Macrocyctis pyrifera* propuesto en esta tesis y publicado en Ocampo-Alvarez et al. (2013, p. 435). FCPs, antenas proteico-pigmentarias con fucoxantina; VDE, enzima violaxantina deepoxidasa; ZE, zeaxantina epoxidasa; MGDG, dominios del lípido monogalactosyldiacilglicerol; LHCSR, complejos captadores de luz relacionados al estrés; Vx, violaxantina.

Una observación importante sobre un control diferencial del NPQ entre *Macrocyctis* y plantas superiores es que el incremento en el tamaño del pool de pigmentos del ciclo de xantofilas en las hojas aclimatadas a alta luz (dosel) no estuvo acompañado por un incremento del DPS. En plantas superiores es común encontrar un aumento en el DPS a medida que el tamaño del pool de CX es más grande (Thayer y Björkman 1990; Ruban y Horton 1999; Demmig-Adams y Adams 2006). Esto se relaciona con una reducción en el tamaño de la antena periférica en las hojas aclimatadas a alta intensidad de luz y como consecuencia un incremento en el pool de pigmentos libres del CX (Jahns et al. 2009). Es probable que en *M. pyrifera*, exista una correulación del incremento del pool de CX con

un aumento en la concentración de proteínas tipo LHCSR. Este tipo de regulación ha sido observada recientemente en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, donde en células aclimatadas a alta luz el tamaño de la antena no disminuye pero si lo hace la concentración de proteínas del tipo LHCSR (Bonente et al. 2012).

Se ha demostrado recientemente que las proteínas del tipo LHCSR son esenciales en la modulación del NPQ de otros heterokontos como las diatomeas (Bailleul et al. 2010; Zhu y Green 2010). Específicamente dos proteínas de esta familia juegan un papel importante en el control del NPQ en diatomeas. La proteína LHCX6 es inducida rápidamente en respuesta a alta luz en *Thalassiosira pseudonana*; además, el nivel basal de esta proteína concuerda con el componente qI del NPQ (Zhu y Green 2010). En contraste a LHCX6, la proteína LHCX1 no estuvo directamente involucrada en el desarrollo del NPQ (Zhu y Green 2010), pero probablemente tiene una función (estructural) de estabilización del supercomplejo FSII-FCP. Sin embargo, en *Phaeodactylum tricornutum* la proteína LHCXI es esencial para la formación del NPQ, ya que el mutante deficiente de esta proteína mostró una capacidad menor de formación de NPQ y una aptitud (“fitness”) ecológica limitada (Bailleul et al. 2010). Incluso al analizar distintos ecotipos naturales de *Phaeodactylum tricornutum* se pudo notar que la capacidad de formación de NPQ de cada uno de ellos estuvo relacionada directamente con la capacidad de expresión de LHCX1 (Bailleul et al. 2010). No se conoce cómo actúan estas proteínas en el proceso de NPQ de las diatomeas, pero la evidencia de que dos proteínas tipo LHCSR son importantes para el NPQ, indica que estos organismos tienen distintos medios para disipar la energía como calor (Wu et al. 2012).

Se necesita mayor información bioquímica y estructural sobre las proteínas LHCX y su arreglo entre los complejos proteico-pigmentarios para conocer como se controla el NPQ en diatomeas (Grouneva et al. 2011; Depaw et al. 2012). De manera similar a las diatomeas, las proteínas tipo LHCSR pueden ser importantes para el control del NPQ en *M. pyrifera* y deben ser identificadas y caracterizadas bioquímica y estructuralmente. En la presente tesis se propone que estas proteínas son los sitios de quenching y que el desarrollo de NPQ en esta alga debe estar controlado por el enlace de los pigmentos deepoxidados a estas proteínas (ver modelo, Fig. 23)

Se ha especulado que las proteínas LHCSR probablemente evolucionaron una función distinta a la de captación de luz y pudieron aparecer en organismos ancestrales con fucoxantina y clorofila *c* y posiblemente después fueron adquiridos por las algas verdes (Dittami et al. 2010). El mecanismo ancestral modulado por estas proteínas LHCSR encontrado en algas verdes y musgos fue probablemente reemplazado después por el mecanismo modulado por la proteína PsbS durante la evolución de las plantas terrestres (Alboresi et al. 2010). Sin embargo, en *M. pyrifera* puede estar presente un mecanismo aún más antiguo de control de NPQ relacionado a estas proteínas y el cual no está relacionado a los cambios alostéricos en el FSII y es controlado principalmente por la presencia de Zx y Ax. Este mecanismo confiere una respuesta adecuada a estos organismos en las condiciones de luz presentes en la columna de agua.

En las plantas superiores la aclimatación a alta intensidad de luz induce la disminución del tamaño de la antena y aumenta la capacidad de fotoprotección para evitar en lo posible el daño fotooxidativo. Sin embargo, este mecanismo es poco eficiente ya que las condiciones de máxima irradiancia de luz se presentan por unas cuantas horas mientras que el resto del día la irradiancia puede estar al nivel o por debajo del nivel de saturación de luz. Una reducción en el tamaño de la antena, reduce la capacidad de captura de fotones en las plantas aclimatadas a alta intensidad de luz, por lo que una parte de las horas de luz cuando esta no es excesiva, tampoco es suficiente para saturar la fotosíntesis.

En contraste, en *M. pyrifera*, el mecanismo de fotoprotección via la disipación térmica (NPQ), no está asociado al tamaño de la antena. Las hojas expuestas a diferentes niveles de irradiancia presentan un pool de pigmentos mayor pero el tamaño de su antena permanece constante y por lo tanto la capacidad de captación de luz permanece al máximo en condición de alta luz. Por lo tanto, *M. pyrifera* puede tener una alta capacidad de fotoprotección y al mismo tiempo una alta capacidad de captación de luz y una eficiente capacidad fotosintética

En el capítulo 4 de esta tesis se comprobó que los factores que afectan el CX también afectan la formación de NPQ tal como había sido propuesto originalmente en la hipótesis de trabajo. La exposición de las muestras de *M. pyrifera* a temperaturas igual o mayor a 20 °C causaron respuestas típicas de estrés térmico, tales como, disminución del

parámetro F_v/F_m , disminución de la tasa de transporte de electrones y aumento en la tasa de formación de NPQ.

Se comprobó que el aumento de la tasa de formación de NPQ en alta temperatura estuvo asociado al incremento de las tasas de deepoxidación de V_x y al incremento de la tasa de formación de Z_x . Así mismo la relación entre el NPQ y el DPS se mantuvo a cada una de las temperaturas de exposición de las muestras de *M. pyrifera*. Confirmando la dependencia del NPQ con los pigmentos deepoxidados.

Los diversos factores de estrés como son la desecación, la anoxia y la exposición a alta temperatura (32 °C) inducen la deepoxidación de V_x en oscuridad en otras algas pardas, tales como *Pelvetia canaliculata* (Fernandez-Marin et al. 2011). Nuestros resultados en el alga parda *M. pyrifera*, coinciden con los encontrados en *Pelvetia canaliculata*, sin embargo la temperatura que indujo estrés en *Macrocystis pyrifera* fue significativamente menor que la encontrada en *P. canaliculata*, mostrando que *M. pyrifera* es altamente sensible a los aumentos de temperatura pues la exposición de las muestras durante tan solo 30 min ante una temperatura relativamente baja (20 °C) y en oscuridad ya desencadena esta respuesta característica de estrés térmico. Ya que se encontró formación de A_x y Z_x en oscuridad.

Dado que *M. pyrifera* carece del mecanismo de control del NPQ de rápida formación (q_E), entonces los mecanismos para controlar las tasas de deepoxidación de V_x y de formación de Z_x y con ello la tasa de formación de NPQ están altamente regulados. El tamaño del pool como se ha discutido en esta sección fue un factor importante en el control de las tasas de formación de NPQ en función del ambiente luminoso al cual esta sujeto el organismo. Sin embargo cuando el tamaño del pool permanece constante otro mecanismo contribuye a modular las tasas de formación de NPQ. Nosotros encontramos que las muestras que se mantenían en oscuridad después de una exposición prolongada a alta luz retuvieron un pool de A_x . Esta retención de un pool de A_x , ha sido asociada a un incremento en la tasa de deepoxidación y por ende a un incremento en la tasa de formación de NPQ (Garcia-Mendoza et al. 2011). En el experimento de exposición de las muestras a

diferentes temperaturas se detectó la formación de pigmentos deepoxidados antes de iluminar la muestra, por lo que tan solo la temperatura indujo la formación de estos pigmentos fotoprotectores. Dado que la formación de Ax esta asociada con un incremento en la tasa de deepoxidación y en la tasa de formación de NPQ, es posible que la formación de Ax, este asociada a un mecanismo de preparación del alga para formar NPQ mas rápido y de esta manera estar mas protegida ante los daños inherentes a la variabilidad ambiental de la luz, principalmente después de que la temperatura también provocó la inactivación de centros de reacción del PSII al disminuir el Fv/Fm y afectar la tasa de transporte de electrones.

En plantas superiores existe un mecanismo de preactivación por luz dependiente de la retención de Zx en oscuridad después de una exposición prolongada a alta luz (Horton et al. 2008). La retención de Zx esta asociada con un incremento en la tasa de formación de NPQ de hasta 10 veces (Horton et al. 2008). En *Macrocystis pyrifera* se demostró previamente que este mecanismo no existe (Garcia-Mendoza et al. 2011). Sin embargo la formación de Ax en oscuridad puede funcionar de manera análoga al mecanismo de preactivación presente en plantas y con ello modular la velocidad de formación de NPQ cuando sea necesario, como en el caso de la aclimatación a alta luz en hojas cercanas a la superficie (c.f capitulo 3), el caso de exposición prolongada a alta luz (c.f. capitulo 2) y el caso de exposición a temperaturas estresantes (c.f capitulo 4). Se propone que la modulación del tamaño del pool, la retención de un pool de Ax y la competencia entre los pigmentos deepoxidados y epoxidados son los principales mecanismos de control molecular del NPQ en esta alga parda y que le permiten aprovechar la luz de manera segura aun con la deficiencia del mecanismo de control de NPQ más evolucionado (qE) presente en plantas superiores.

Referencias bibliográficas

- Adams WW, Demmig-Adams B, Winter K (1990) Relative contributions of zeaxanthin-related and zeaxanthin-unrelated types of 'high-energy state' quenching of chlorophyll fluorescence in spinach leaves exposed to various environmental conditions. *Plant Physiol.* 92:302-309
- Ahn TK, Avenson TJ, Ballottari M, Cheng YC, Niyogi KK, Bassi R, Fleming GR (2008) Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science* 320:794-797
- Alboresi A, Gerotto C, Giacometti GM, Bassi R, Morosinotto T (2010) *Physcomitrella patens* mutants affected on heat dissipation clarify the evolution of photoprotection mechanisms upon land colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107:11128-11133
- Allen JF, Bennett J, Steinback KE, Arntzen CJ (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* 291:25-29
- Andersson J, Wentworth M, Walters RG, Howard CA, Ruban AV, Horton P, Jansson S (2003) Absence of the Lhcb1 and Lhcb2 proteins of the light-harvesting complex of photosystem II - effects on photosynthesis, grana stacking and fitness. *Plant J.* 35:350-361
- Apt KE, Clendennen SK, Powers DA, Grossman AR (1995) The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol. Gen. Genet.* 246:455-464
- Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143:113-134
- Arvidsson P-O, Carlsson M, Stefánsson H, Albertsson P, Åkerlund H-E (1997) Violaxanthin accessibility and temperature dependency for de-epoxidation in spinach thylakoid membranes. *Photosynth. Res.* 52:39-48
- Bailleul B, Rogato A, de Martino A, Coesel S, Cardol P, Bowler C, Falciatore A, Finazzi G (2010) An atypical member of the light-harvesting complex stress-related protein family modulates diatom responses to light. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 107:18214-18219

- Betterle N, Ballottari M, Zorzan S, de Bianchi S, Cazzaniga S, Dall'Osto L, Morosinotto T, Bassi R (2009) Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *J. Biol. Chem.* 284:15255-15266
- Bilger W, Bjorkman O (1991) Temperature dependence of violaxanthin deepoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium-hirsutum* l. and *Malvaparviflora*l. *Planta* 184:226-234
- Bilger W, Bjorkman O (1994) Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 193:238
- Bonente G, Pippa S, Castellano S, Bassi R, Ballottari M (2012) Acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to Different Growth Irradiances. *J. Biol. Chem.* 287:5833-5847
- Briantais JM, Vernotte C, Picaud M, Krause GH (1979) A quantitative study of the slow decline of chlorophyll a fluorescence in isolated chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 548:128-138
- Bruce D, Vasil'ev S (2004) Excess light stress: multiple dissipative processes of excess excitation. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 19. Springer, Amsterdam, p 497-523
- Cock JM, Sterck L, Rouze P, Scornet D, Allen AE, Amoutzias G, Anthouard V, Artiguenave F, Aury J-M, Badger JH, Beszteri B, Billiau K, Bonnet E, Bothwell JH, Bowler C, Boyen C, Brownlee C, Carrano CJ, Charrier B, Cho GY, Coelho SM, Collen J, Corre E, Da Silva C, Delage L, Delaroque N, Dittami SM, Doulbeau S, Elias M, Farnham G, Gachon CMM, Gschloessl B, Heesch S, Jabbari K, Jubin C, Kawai H, Kimura K, Kloareg B, Kupper FC, Lang D, Le Bail A, Leblanc C, Lerouge P, Lohr M, Lopez PJ, Martens C, Maumus F, Michel G, Miranda-Saavedra D, Morales J, Moreau H, Motomura T, Nagasato C, Napoli CA, Nelson DR, Nyvall-Collen P, Peters AF, Pommier C, Potin P, Poulain J, Quesneville H, Read B, Rensing SA, Ritter A, Rousvoal S, Samanta M, Samson G, Schroeder DC, Segurens B, Strittmatter M, Tonon T, Tregear JW, Valentin K, von Dassow P, Yamagishi T, Van de Peer Y, Wincker P (2010) The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae. *Nature* 465:617-621

- Colombo-Pallotta MF, Garcia-Mendoza E, Ladah LB (2006) Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. *J. Phycol.* 42:1225-1234
- Colombo Pallotta MF (2006) Fotosíntesis y fotoprotección de *Macrocystis pyrifera* en la escala espacial y temporal. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, p. 149
- D'Haese D, Vandermeiren K, Caubergs RJ, Guisez Y, Temmerman LD, Horemans N (2004) Non-photochemical quenching kinetics during the dark to light transition in relation to the formation of antheraxanthin and zeaxanthin. *J. Theor. Biol.* 227:175-186
- De Bianchi S, Ballottari M, Dall'Osto L, Bassi R (2010) Regulation of plant light harvesting by thermal dissipation of excess energy. *Biochem. Soc. Trans.* 38:651-660
- Dean TA (1985) The temporal and spatial distribution of underwater quantum irradiation in a southern California kelp forest. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 21:835-844
- Demers S, Roy S, Gagnon R, Vignault C (1991) Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76:185-193
- Demmig-Adams B (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta* 1020:1-24
- Demmig-Adams B, Adams WW (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:599-626
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Sci.* 1:21-26
- Demmig-Adams B, Adams WW (2006) Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytol.* 172:11-21
- Demmig-Adams B, Winter K, Kruger A, Czygan F-C (1989) Zeaxanthin and the induction and relaxation kinetics of the dissipation of excess excitation energy in leaves in two percent oxygen zero percent carbon dioxide. *Plant Physiol.* 52:39-48

- Demmig B, Winter K, Krüger A, Czygan F-C (1987) Photoinhibition and Zeaxanthin Formation in Intact Leaves : A Possible Role of the Xanthophyll Cycle in the Dissipation of Excess Light Energy. *Plant Physiol.* 84:218-224
- Depaw F, Rogato A, Ribera d'Alcala M, Falciatore A (2012) Exploring the molecular basis of responses to light in marine diatoms. *J. Exp. Bot.* 63:1575-1591
- Dittami S, Michel G, Collen J, Boyen C, Tonon T (2010) Chlorophyll-binding proteins revisited - a multigenic family of light-harvesting and stress proteins from a brown algal perspective. *BMC Evol. Biol.* 10:365-379
- Douady D, Rousseau B, Caron L (1994) Fucoxanthin-chlorophyll a/c light-harvesting complexes of *Laminaria saccharina*: Partial amino acid sequences and arrangement in thylakoid membranes. *Biochemistry* 33:3165-3170
- Eskling M, Arvidsson PO, Åkerlund HE (1997) The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plant* 100:806-817
- Farber A, Young AJ, Ruban AV, Horton P, Jahns P (1997) Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants (The relationship between zeaxanthin conversion and nonphotochemical fluorescence quenching). *Plant Physiol.* 115:1609-1618
- Fernández-Marín B, Balaguer L, Esteban R, Becerril JM, García-Plazaola JI (2009) Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. *J. Plant Physiol.* 166:1734-1744
- Fernandez-Marin B, Miguez F, Becerril J, Garcia-Plazaola J (2011) Activation of violaxanthin cycle in darkness is a common response to different abiotic stresses: a case study in *Pelvetia canaliculata*. *BMC Plant Biol.* 11:181-192
- Finazzi G, Johnson GN, Dalosto L, Joliot P, Wollman F-A, Bassi R (2004) A zeaxanthin-independent nonphotochemical quenching mechanism localized in the photosystem II core complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:12375-12380
- Finazzi G, Rappaport F, goldschmidt-Clermont M (2003) From light to life: an interdisciplinary journey into photosynthetic activity. *EMBO J.* 4:752-756

- Fork DC, Herbert SK, Malkin S (1991) Light Energy Distribution in the Brown Alga *Macrocystis pyrifera* (Giant Kelp). *Plant Physiol.* 95:731-739
- Garcia-Mendoza E, Colombo-Pallotta MF (2007) The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different nonphotochemical quenching control than higher plants. *New Phytol.* 173:526-536
- Garcia-Mendoza E, Ocampo-Alvarez H, Govindjee (2011) Photoprotection in the brown alga *Macrocystis pyrifera*: Evolutionary implications. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* 104:377-385
- Gerard VA (1984) The light environment in a giant kelp forest: influence of *Macrocystis pyrifera* on spatial and temporal variability. *Marine Biol.* 84:189-195
- Gilmore A, Yamamoto H (1993) Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching. *Photosynth. Res.* 35:67-78
- Goss R, Ann Pinto E, Wilhelm C, Richter M (2006) The importance of a highly active and Δ pH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin cycle containing algae. *J. Plant Physiol.* 163:1008-1021
- Goss R, Böhme K, Wilhelm C (1998) The xanthophyll cycle of *Mantoniella squamata*; converts violaxanthin into antheraxanthin but not to zeaxanthin: consequences for the mechanism of enhanced non-photochemical energy dissipation. *Planta* 205:613-621
- Goss R, Jakob T (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth. Res.* 106:103-122
- Grouneva I, Jakob T, Wilhelm C, Goss R (2007) Evidence for the existence of a fast xanthophyll cycle-independent NPQ component in diatoms. *Photosynth. Res.* 91:PS1522
- Grouneva I, Rokka A, Aro E-M (2011) The thylakoid membrane proteome of two marine diatoms outlines both diatom-specific and species-specific features of the photosynthetic machinery. *J. Proteome Res.* 10:5338-5353
- Havaux M, Dall'Osto L, Bassi R (2007) Zeaxanthin has enhanced antioxidant capacity with respect to all other xanthophylls in *Arabidopsis* leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol.* 145:1506-1520

- Havaux M, Niyogi KK (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:8762-8767
- Heber U, Lange OL, Shuvalov VA (2006) Conservation and dissipation of light energy as complementary processes: homoiohydric and poikilohydric autotrophs. *J. Exp. Bot.* 57:1211-1223
- Holzwarth AR, Miloslavina Y, Nilkens M, Jahns P (2009) Identification of two quenching sites active in the regulation of photosynthetic light-harvesting studied by time-resolved fluorescence. *Chem. Phys. Lett.* 483:262-267
- Horton P, Hague A (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. IV. Resolution of nonphotochemical quenching. *Biochim. Biophys. Acta* 932:107-115
- Horton P, Johnson MP, Perez-Bueno ML, Kiss AZ, Ruban AV (2008) Photosynthetic acclimation: Does the dynamic structure and macro-organisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *FEBS J.* 275:1069-1079
- Horton P, Ruban A (2005) Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. *J. Exp. Bot.* 56:365-373
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:655
- Jackson GA (1977) Nutrients and production of giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, off southern California. *Limnol. Oceanogr.* 22:979-95
- Jahns P (1995) The xanthophyll cycle in intermittent light-grown pea plants (Possible functions of chlorophyll a/b-binding proteins). *Plant Physiol.* 108:149-156
- Jahns P, Holzwarth AR (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1817:182-193
- Jahns P, Latowski D, Strzalka K (2009) Mechanism and regulation of the violaxanthin cycle: the role of antenna proteins and membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1787:3-14

- Jahns P, Wehner A, Paulsen H, Hobe S (2001) De-epoxidation of violaxanthin after reconstitution into different carotenoid binding sites of light-harvesting complex II. *J. Biol. Chem.* 276:22154-22159
- Johnson GN, Scholes JD, Horton P, Young AJ (1993a) Relationships between carotenoid composition and growth habit in British plant species. *Plant Cell Environ.* 16:681-686
- Johnson GN, Young AJ, Scholes JD, Horton P (1993b) The dissipation of excess excitation energy in British plant species. *Plant Cell Environ.* 16:673-679
- Johnson MP, Davison PA, Ruban AV, Horton P (2008) The xanthophyll cycle pool size controls the kinetics of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 582:262-266
- Johnson MP, Pérez-Bueno ML, Zia A, Horton P, Ruban AV (2009) The zeaxanthin-independent and zeaxanthin-dependent qE components of nonphotochemical quenching involve common conformational changes within the photosystem II antenna in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 149:1061-1075
- Johnson MP, Ruban AV (2010) *Arabidopsis* plants lacking PsbS protein possess photoprotective energy dissipation. *Plant J.* 61:283-289
- Kalituho L, Beran KC, Jahns P (2007) The transiently generated nonphotochemical quenching of excitation energy in *Arabidopsis* leaves is modulated by zeaxanthin. *Plant Physiol.* 143:1861-1870
- Kato T, Ehara T (1990) Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes isolated from a brown alga, *Petalonia fascia*. Electron microscopic studies. *Plant Cell Physiol.* 31:439-447
- Kereiche S, Kiss AZ, Kouril R, Boekema EJ, Horton P (2010) The PsbS protein controls the macro-organisation of photosystem II complexes in the grana membranes of higher plant chloroplasts. *FEBS Lett.* 584:759-764
- Kirk JT (1992) The nature and measurements of the light environment in the ocean. In: Falkowski PG, Woodhead AD (eds) Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea. Plenum, New York, p 550

- Kirk JT (2010) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*, Third Edition. Cambridge University Press. p.150
- Konotchick TH (2012) Transcriptomic profiling of the giant kelp, *Macrocystis pyrifera*, across environmental gradients, PhD Thesis. University of California, San Diego, p.200
- Krause GH (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol. Plant* 74:566-574
- Krause GH (1994) Photoinhibition induced by low temperatures. In: Baker NR, Bowyer JR (eds) *Photoinhibition of Photosynthesis*. Bios Scientific Publishers, p 31–348
- Krause GH, Jahns P (2004) Non-photochemical energy dissipation determined by chlorophyll fluorescence quenching: Characterization and function. In: Papageorgiou GC, Govindjee (eds) *Chlorophyll a fluorescence: A signature of photosynthesis*. Springer, Dordrecht, p 464–495
- Krause GH, Veronotte C, Briantais JM (1982) Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochim. Biophys. Acta* 679:116-124
- Kulheim C, Agren J, Jansson S (2002) Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science* 297:91-93
- Ladah LB, Zertuche-González JA, Hernández-Carmona G (1999) Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, phaeophyceae) recruitment near its southern limit in Baja California after mass disappearance during ENSO 1997–1998. *J. Phycol.* 35:1106-1112
- Ladah LB, Zertuche-González JA (2004) Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*) survival in deep water (25-40 m) during El Niño of 1997-1998 in Baja California, Mexico. *Botanica Marina*, p 367-372
- Lambrev PH, Nilkens M, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR (2010) Kinetic and spectral resolution of multiple nonphotochemical quenching components in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 152:1611-1624
- Lavaud J, Rousseau B, Etienne AL (2002a) In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching. *FEBS Lett.* 523:163-166

- Lavaud J, Rousseau B, van Gorkom HJ, Etienne AL (2002b) Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 129:1398-1406
- Lavaud J, Strzepek RF, Kroth PG (2007) Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnol. Oceanogr.* 52:1188-1194
- Lepetit B, Volke D, Gilbert M, Wilhelm C, Goss R (2010) Evidence for the existence of one antenna-associated, lipid-dissolved and two protein-bound pools of diadinoxanthin cycle pigments in diatoms. *Plant Physiol.* 154:1905-1920
- Li XP, Björkman O, Shih C, Grossman AR, Rosenquist M, Jansson S, Niyogi KK (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403:391-395
- Li XP, Gilmore AM, Caffarri S, Bassi R, Golan T, Kramer D, Niyogi KK (2004) Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *J. Biol. Chem.* 279:22866-22874
- Li XP, Müller-Moule P, Gilmore AM, Niyogi KK (2002) PsbS-dependent enhancement of feedback de-excitation protects photosystem II from photoinhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:15222-15227
- Li Z, Wakao S, Fischer BB, Niyogi KK (2009) Sensing and responding to excess light. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60:239-260
- Matsubara S, Krause GH, Aranda J, Virgo A, Beisel KG, Jahns P, Winter K (2009) Sun-shade patterns of leaf carotenoid composition in 86 species of neotropical forest plants. *Funct. Plant Biol.* 36:20-36
- Müller MG, Lambrev P, Reus M, Wientjes E, Croce R, Holzwarth AR (2010) Singlet energy dissipation in the photosystem II light-harvesting complex does not involve energy transfer to carotenoids. *Chem. Phys. Chem.* 11:1289-1296
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.* 125:1558-1566

- Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI (2007) Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1767:414-421
- Nilkens M, Kress E, Lambrev P, Miloslavina Y, Muller M, Holzwarth AR, Jahns P (2010) Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1797:466-475
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:333-359
- Niyogi KK, Bjorkman O, Grossman AR (1997a) *Chlamydomonas* Xanthophyll Cycle Mutants Identified by Video Imaging of Chlorophyll Fluorescence Quenching. *Plant Cell* 9:1369-1380
- Niyogi KK, Björkman O, Grossman AR (1997b) The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:14162-14167
- Niyogi KK, Grossman AR, Björkman O (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant cell* 10:1121-1134
- North WJ (1971) Introduction and background. In: North WJ (ed) *The biology of giant kelp beds (Macrocystis) in California.*, vol 32. *Nova Hedwigia, Lehre.* p 1-97
- Ocampo-Alvarez H, Mendoza EG-, Govindje (2013) Antagonist effect between violaxanthin and de-epoxidated pigments in nonphotochemical quenching induction in the qE deficient brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Biochim. Biophys. Acta* 1827:427-437
- Olaizola M, Roche J, Kolber Z, Falkowski PG (1994) Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.* 41:357-370
- Pascal AA, Liu ZF, Broess K, van Oort B, van Amerongen H, Wang C, Horton P, Robert B, Chang WR, Ruban A (2005) Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting. *Nature* 436:134-137

- Peers G, Truong T, Elrad D, Grossman A, Niyogi K (2007) A non-photochemical quenching mutant of *Chlamydomonas* reveals a role for L1818/LHCSR proteins. *Photosynth. Res.* 91:250-250
- Peers G, Truong TB, Ostendorf E, Busch A, Elrad D, Grossman AR, Hippler M, Niyogi KK (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature* 462:518-U215
- Pfündel E, Bilger W (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.* 42:89-109
- Quick WP, Stitt M (1989) An examination of factors contributing to nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in barley leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 977:287-296
- Reinhold C, Niczyporuk S, Beran KC, Jahns P (2008) Short-term down-regulation of zeaxanthin epoxidation in *Arabidopsis thaliana* in response to photo-oxidative stress conditions. *Biochim. Biophys. Acta* 1777:462-469
- Rodrigues MA, Dos Santos CP, Young AJ, Strbac D, Hall DO (2002) A smaller and impaired xanthophyll cycle makes the deep sea macroalgae *Laminaria Abyssalis* (Phaeophyceae) highly sensitive to daylight when compared with shallow water *Laminaria Digitata*. *J. Phycol.* 38:939-947
- Ruban AV, Horton P (1999) The xanthophyll cycle modulates the kinetics of nonphotochemical energy dissipation in isolated light-harvesting complexes, intact chloroplasts, and leaves of spinach. *Plant Physiol.* 119:531-542
- Ruban AV, Johnson MP, Duffy CDP (2012) The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochim. Biophys. Acta* 1817:167-181
- Ruban AV, Lavaud J, Rousseau B, Guglielmi G, Horton P, Etienne AL (2004) The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photosynth. Res.* 82:165-175
- Schaller S, Latowski D, Jemiola-Rzeminska M, Wilhelm C, Strzalka K, Goss R (2010) The main thylakoid membrane lipid monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) promotes the de-epoxidation of violaxanthin associated with the light-harvesting complex of photosystem II (LHCII). *Biochim. Biophys. Acta* 1797:414-424

- Schansker G, Tóth SZ, Strasser RJ (2006) Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochim. Biophys. Acta* 1757:787-797
- Stransky H, Hager A (1970) The carotenoid pattern and the occurrence of the light-induced xanthophyll cycle in various classes of algae. VI. Chemosystematic study. *Arch. Microbiol.* 73:315-323
- Thayer SS, Björkman O (1990) Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth. Res.* 23:331-343
- Wilhelm C, Selmar D (2011) Energy dissipation is an essential mechanism to sustain the viability of plants: The physiological limits of improved photosynthesis. *J. Plant Physiol.* 168:79-87
- Wing SR, James J. Leitcher, Denny. MW (1993) A dynamic model for wave-induced light fluctuations in a kelp forest. *Limnol Oceanogr* 38:396-407
- Wu H, Roy S, Alami M, Green BR, Campbell D (2012) Photosystem II photoinactivation, repair, and protection in marine centric diatoms. *Plant Physiol.* 160:464-476
- Yamamoto HY, Nakayama TOM, Chichester CO (1962) Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Arch. Biochem. Biophys.* 97:168-173
- Zhu S-H, Green BR (2010) Photoprotection in the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Role of LI818-like proteins in response to high light stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1797:1449-1457
- Zia A, Johnson M, Ruban A (2011) Acclimation- and mutation-induced enhancement of PsbS levels affects the kinetics of non-photochemical quenching in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 233:1253-1264