

**Centro de Investigación Científica y de
Educación Superior de Ensenada**



**EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LOS MECANISMOS DE
FOTOPROTECCIÓN EN UNA DIATOMEA MARINA (*Phaeodactylum tricornutum*)**

TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS

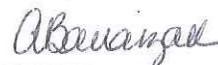
SILVANA RAQUEL HALAC

Ensenada, Baja California, México, marzo del 2008.

TESIS DEFENDIDA POR
Silvana Raquel Halac
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Ernesto García Mendoza
Co-Director de tesis



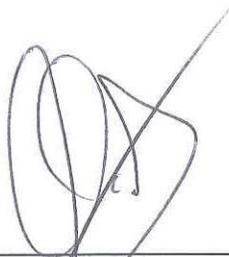
Dra. Anastazia Banaszak
Co-Director de tesis



Dr. Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité



Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Miembro del Comité



Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera
*Coordinador del programa de
posgrado en Ecología Marina*



Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
*Encargado del Despacho de la
Dirección de Estudios de Posgrado*

13 de marzo de 2008

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



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA MARINA**

**EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LOS MECANISMOS DE
FOTOPROTECCIÓN EN UNA DIATOMEA MARINA (*Phaeodactylum tricornutum*)**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

SILVANA RAQUEL HALAC

Ensenada, Baja California, México, marzo del 2008.

RESUMEN de la tesis de SILVANA RAQUEL HALAC, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en Ecología Marina. Ensenada, Baja California, México, Marzo 2008.

EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA SOBRE LOS MECANISMOS DE FOTOPROTECCIÓN EN UNA DIATOMEA MARINA (*Phaeodactylum tricornutum*)



Dr. Ernesto García Mendoza

Co-Director de tesis



Dra. Anastazia Banaszak

Co-Director de tesis

Uno de los blancos principales de la radiación ultravioleta (UVR, 280 a 400 nm) en el aparato fotosintético es el fotosistema II (PSII), lo que se refleja en un aumento de la fotoinhibición durante exposiciones a esta radiación. La radiación fotosintéticamente activa (PAR, 400 a 700 nm) también puede producir daño en el PSII cuando las intensidades de esta radiación son saturantes. Los organismos fotosintéticos pueden expresar respuestas de fotoprotección al PAR, de las cuales la disipación térmica del exceso de energía (NPQ) es una de las más importantes. Este mecanismo se relaciona directamente con la conversión de pigmentos del ciclo de las xantofilas (XC). Si el potencial de fotoprotección se ve afectado, la sensibilidad de fotoinhibición puede aumentar. Se plantea que la UVR afecta la expresión de los mecanismos de fotoprotección al PAR, específicamente, la disipación de calor asociada al XC. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue comprobar que la fotoinhibición causada por la UVR en lapsos de tiempo cortos se debe en mayor parte a la disminución de la capacidad fotoprotectora al PAR más que al efecto directo de esta radiación sobre el PSII. La especie de estudio seleccionada fue *Phaeodactylum tricornutum*, la cual posee una alta capacidad de fotoprotección por estar adaptada a altas y frecuentes fluctuaciones en la intensidad de luz. Las células fueron aclimatadas a dos diferentes intensidades de luz: alta (HL, 200 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y baja (LL, 50 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). En HL, la mayor reducción de la eficiencia cuántica máxima en presencia de UVR, se debió principalmente a una reducción de los mecanismos de regulación rápida asociados a una disminución en la deepoxidación de los pigmentos del XC. Por otro lado, en LL el efecto de la UVR fue diferente, ya que el mecanismo de fotoprotección por disipación de calor no fue el proceso más afectado, en cambio, la UVR afectó significativamente el balance entre reparación y daño del PSII. Aunque ambas aclimataciones presentaron una síntesis *de novo* de pigmentos del XC durante la exposición a luz saturante, en HL fue mayor, y el efecto negativo de la UVR sobre dicho proceso fue más pronunciado que en LL. Lo anterior, confirma que en células que poseen mayor capacidad de fotoprotección, el efecto negativo de la UVR sobre la síntesis de pigmentos fotoprotectores es más marcado y ocasiona un aumento del daño debido al PAR.

Palabras clave: Radiación ultravioleta (UVR), Fotoinhibición, Ciclo de Xantofilas.

ABSTRACT of the thesis presented by SILVANA RAQUEL HALAC in partial requirement for the degree of MASTER OF SCIENCE in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, Mexico. March 2008.

ULTRAVIOLET RADIATION EFFECTS ON PHOTOPROTECTIVE MECHANISMS IN A MARINE DIATOM (*Phaeodactylum tricornutum*)

Photosystem II (PSII) is one of the main targets of ultraviolet radiation (UVR, 280 to 400 nm) in the photosynthetic apparatus, resulting in an enhancement of photoinhibition during exposures to UVR. Photosynthetically active radiation (PAR, 400 to 700 nm), also results in damage to PSII at high intensities. Photosynthetic organisms possess photoprotective responses to PAR and one of the most important of them is thermal dissipation of excess absorbed light energy, which is related to the conversion of xanthophyll cycle (XC) pigments. If the photoprotective potential is affected photoinhibition can potentially increase. This study hypothesizes that UVR affects the expression of photoprotective mechanisms in response to PAR, mainly through thermal dissipation associated with XC. The main objective was to confirm that the photoinhibition caused by UVR on a short time scale is mostly due to the reduced photoprotective capacity as opposed to a direct effect of UVR on PSII. The species selected was *Phaeodactylum tricornutum*, which is adapted to frequent light fluctuations and has well-developed photoprotective mechanisms. Cells were acclimated to two different PAR intensities: high light (HL, 200 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and low light (LL, 50 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). High-light acclimated cells showed a higher reduction of maximum quantum yield in UVR treatments, mostly due to a decrease in fast-regulation mechanisms associated with a reduction in the deepoxidation of XC pigments. The effect of UVR was different in LL acclimated cells because the photoprotective mechanism, via heat dissipation, was not the most affected process. In LL acclimated cells, UVR significantly affected the balance between PSII damage and repair. Although *de novo* xanthophyll synthesis was active in both HL and LL acclimations during the high light exposures, the HL acclimated cells synthesized more pigments than the LL acclimated cells and the negative effect of UVR on this synthesis was more pronounced in HL acclimated cells. Such responses confirm that cells that have a highly developed photoprotective capacity suffer a more pronounced negative effect of UVR on synthesis of photoprotective pigments causing an enhancement of damage by PAR.

Key words: Ultraviolet radiation (UVR), Photoinhibition, Xanthophyll Cycle.

**“Los más fascinante de la ciencia es que nunca se
acaban las preguntas”**

**A mis pequeños luchadores, NATALIA, NICOLAS y
MARCOS.**

Agradecimientos

Antes que todo agradezco a mi comité de tesis por el apoyo en cada una de las fases del proyecto. A la Dra. Anastazia Banaszak por sus aportes al anteproyecto, su incansable apoyo en la fase experimental y su ayuda continua en la interpretación de resultados, así como en el seguimiento de los avances y revisión final de la tesis. Al Dr. Ernesto García-Mendoza por su valiosa guía en el anteproyecto, diseño experimental y trabajo de laboratorio, por su orientación en el análisis e interpretación de datos y por la revisión y corrección exhaustiva del escrito final. A ellos dos les agradezco el esfuerzo y tiempo invertidos en mi formación profesional, así como el apoyo moral brindado durante el desarrollo de mi posgrado. Mi agradecimiento a la Dra. Ma. del Pilar Sánchez Saavedra, por el incondicional suministro de cultivos y nutrientes, y por las sugerencias aportadas en el anteproyecto y escrito final. Al Dr. Helmut Maske Rubach por su buena disposición para el préstamo de instrumentos de su laboratorio, por las ideas aportadas en la interpretación de los resultados y por las correcciones del anteproyecto, informes de avances de tesis y escrito final.

Quiero reconocer el valioso apoyo en el préstamo de instrumentos, orientación en la fase experimental y discusión de los avances de mi proyecto a los Dres. Roberto Iglesias Prieto, Susana Enriquez y Paty Thomé de la Unidad Académica Puerto Morelos, ICMYL, UNAM. Además, a las sugerencias aportadas en el plan experimental por el estudiante de doctorado Xavier Hernández Pech.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado durante el curso de mi posgrado. Mi gratitud a los investigadores que colaboraron en mi formación académica,

especialmente al M.C. Vicente Ferreira y a los Dres. Sharon Herzka, Juan Carlos Herguera y Axayacatl Rocha del Posgrado de Ecología Marina, CICESE.

Mil gracias a mi compañera de laboratorio y amiga, Nadine Schubert que me acompañó en este camino, durante todas las etapas, aportando ideas desde la elaboración de mi anteproyecto, apoyándome en la fase experimental, orientándome en la interpretación de los resultados, revisando mi primera versión de tesis, y muchos etcéteras más. Y lo mejor de todo, brindándome su amistad incondicional.

A los compañeros del seminario CONGAL, Ernesto García-Mendoza, Antonio Almazán Becerril, Nadine Schubert, José Luis Peña Manjarrez, Jushiro Cepeda Morales y Marcos Martínez Gaxiola, que de manera constructiva se encargaron de deshacer y rehacer los avances de mi estudio. Asimismo a todos los colegas del seminario JOURNAL CLUB, que con la exposición de sus trabajos y cuestionamiento de mi investigación, enriquecieron mi formación. A las chicas que con su interés en la investigación me apoyaron en las fases experimentales, en Ensenada, Alma Ruiz Bernal y Michel Rodríguez Cortez y en Pto. Morelos a la estudiante de maestría Diana Bermejo Quintana.

Quiero agradecer especialmente a mis papás que siempre me alentaron a superarme y a mis hermanos, Gaby, Pablo, Marcelo y Silvia que me apoyaron siempre sin importar la distancia. También a mis dos hermanas mejicanas, Gloria y Maribel. Y a mis amigos, Carlos Galán y Arturo Torres que me dieron ánimo en los momentos áridos de la tesis.

Y como broche de oro, les doy mucho más que las gracias a aquellos que me mantuvieron despierta y animada durante todo este trayecto, NATALIA, NICOLAS, MARCOS y HECTOR. Sin su apoyo este camino hubiera sido mucho más difícil.

CONTENIDO

| | Página |
|---|-----------|
| I. CAPÍTULO 1..... | 1 |
| <i>I.1. Introducción.....</i> | 1 |
| <i>I.2. Materiales y Métodos.....</i> | 5 |
| <i>I.2.1. Condiciones de la caracterización del crecimiento.....</i> | <i>5</i> |
| <i>I.2.2. Indicadores de crecimiento</i> | <i>6</i> |
| <i>I.3. Resultados.....</i> | 7 |
| <i>I.3.1. Densidad celular y tasa de crecimiento poblacional</i> | <i>7</i> |
| <i>I.3.2. Densidad óptica y concentración de clorofila <i>a</i></i> | <i>10</i> |
| <i>I.4. Discusión.....</i> | 14 |
| <i>I.4.1. Verificación de la aclimatación</i> | <i>14</i> |
| <i>I.4.2. Identificación de la fase exponencial</i> | <i>16</i> |
| <i>I.4.3. Evaluación de los estimadores de biomasa alternativos</i> | <i>17</i> |
| II. CAPÍTULO 2..... | 18 |
| <i>II.1. Introducción.....</i> | 18 |
| <i>II.2. Materiales y Métodos.....</i> | 30 |
| <i>II.2.1. Cultivos de microalgas.....</i> | <i>30</i> |
| <i>II.2.2. Determinación del estado fisiológico de los cultivo</i> | <i>31</i> |
| <i>II.2.3. Cálculo de atenuación del campo de luz</i> | <i>33</i> |
| <i>II.2.4. Mediciones de la eficiencia cuántica máxima.....</i> | <i>34</i> |
| <i>II.2.5. Experimentos de fotoinhibición</i> | <i>35</i> |

| CONTENIDO (Continuación) | Página |
|---|---------------|
| <i>II.2.6. Medición de NPQ.....</i> | 38 |
| <i>II.2.7. Cuantificación de pigmentos.....</i> | 39 |
| <i>II.2.8. Análisis de datos.....</i> | 41 |
| <i>II.3. Resultados.....</i> | 42 |
| <i>II.3.1. Estado fisiológico de las microalgas usadas en los experimentos de exposición a UVR</i> | 42 |
| <i>II.3.2. Efecto de la exposición a PAR y PAR+UVR en cultivos aclimatados a una irradiancia alta (HL).....</i> | 44 |
| <i>II.3.3. Efecto de la exposición a PAR y PAR+UVR en cultivos aclimatados a una irradiancia baja (LL).....</i> | 66 |
| <i>II.3.4. Comparación del efecto de UVR sobre las respuestas fotoprotectivas en células aclimatadas a baja y alta intensidad de PAR.....</i> | 85 |
| <i>II.4. Discusión.....</i> | 94 |
| <i>II.4.1. Características fotoprotectivas de células aclimatadas a baja y alta luz y su relación con la respuesta al UVR.....</i> | 94 |
| <i>II.4.2. Efecto de la UVR sobre la eficiencia cuántica máxima y la disipación térmica. Su relación con el ciclo XC.....</i> | 97 |
| <i>II.4.3. Síntesis “de novo” de pigmentos XC y su posible relación con UVR.</i> | 102 |
| <i>II.4.4. Conclusiones.....</i> | 107 |
| <i>II.5. Bibliografía.....</i> | 109 |
| <i>II.6. Anexo.....</i> | 116 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1a | Caracterización del crecimiento celular en tres cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una alta irradiancia..... | 9 |
| 1b | Caracterización del crecimiento celular en tres cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una baja irradiancia | 9 |
| 2a | Caracterización del crecimiento por dispersión de luz a 730 nm en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una alta irradiancia..... | 11 |
| 2b | Caracterización del crecimiento por dispersión de luz a 730 nm en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una baja irradiancia..... | 11 |
| 3a | Caracterización del crecimiento por concentración de Chl <i>a</i> en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una alta irradiancia..... | 11 |
| 3b | Caracterización del crecimiento por concentración de Chl <i>a</i> en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una baja irradiancia | 11 |
| 4a | Regresión lineal entre densidad celular y densidad óptica en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una alta irradiancia | 13 |
| 4b | Regresión lineal entre densidad celular y densidad óptica en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una baja irradiancia | 13 |
| 4c | Regresión lineal entre densidad celular y concentración de Chl <i>a</i> en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una alta irradiancia | 13 |
| 4d | Regresión lineal entre densidad celular y concentración de Chl <i>a</i> en dos cultivos consecutivos de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> mantenidos a una baja irradiancia | 13 |

| LISTA DE FIGURAS (Continuación) | | Página |
|--|--|---------------|
| 5a | Atenuación de la irradiancia (200-800 nm) emitida por la lámpara a lo largo del recipiente de exposición con cultivos aclimatados a HL y LL..... | 34 |
| 5b | Atenuación de la irradiancia (200-800 nm) emitida por la lámpara a lo largo del recipiente de exposición en cultivos de dos densidades celulares diferentes | 34 |
| 6 | Espectro de radiación de la lámpara de Xenon en la banda de UVR | 36 |
| 7 | Relación ETR vs irradiancia para cultivos de <i>Phaeodactylum tricorutum</i> aclimatados a una irradiancia alta y baja | 44 |
| 8a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricorutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR durante el tiempo de exposición a luz saturante | 47 |
| 8b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricorutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR durante el tiempo de recuperación en luz tenue..... | 47 |
| 9 | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células HL de <i>P. tricorutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR | 49 |
| 10 | Estado de deepoxidación del ciclo XC1 y XC2 a los 60 min de exposición a luz saturante PAR+UVR y PAR para <i>P. tricorutum</i> aclimatada a HL. | 51 |
| 11a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricorutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control sin inhibidores y en el tratamiento +DTT durante el tiempo de exposición a luz saturante | 54 |
| 11b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricorutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control sin inhibidores y en el tratamiento +DTT durante el tiempo de recuperación en luz tenue..... | 54 |
| 12 | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células HL de <i>P. tricorutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR en control y el tratamiento +DTT | 56 |

| LISTA DE FIGURAS (Continuación) | | Página |
|--|--|---------------|
| 13a | Comparación del pool de XC1 entre el control y el tratamiento +DTT de células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR | 58 |
| 13b | Comparación del estado de deepoxidación (DPS) entre el control y el tratamiento +DTT de células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a a luz saturante con PAR+UVR y PAR | 58 |
| 14a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento +CAP durante el tiempo de exposición a luz saturante | 60 |
| 14b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento +CAP durante el tiempo de recuperación en luz tenue | 60 |
| 15a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento DTT+CAP durante el tiempo de exposición a luz saturante | 62 |
| 15b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento DTT+CAP durante el tiempo de recuperación en luz tenue | 62 |
| 16a | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR en control y tratamiento +CAP | 64 |
| 16b | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR en control y tratamiento DTT+CAP | 64 |
| 17a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR durante el tiempo de exposición a luz saturante | 67 |
| 17b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR durante el tiempo de recuperación en luz tenue..... | 67 |

| LISTA DE FIGURAS (Continuación) | | Página |
|--|---|---------------|
| 18 | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR | 69 |
| 19 | Estado de deepoxidación del ciclo XC1 y XC2 a los 60 min de exposición a luz saturante PAR+UVR y PAR para <i>P. tricornutum</i> aclimatada a LL..... | 71 |
| 20a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control sin inhibidores y en el tratamiento +DTT durante el tiempo de exposición a luz saturante | 73 |
| 20b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control sin inhibidores y en el tratamiento +DTT durante el tiempo de recuperación en luz tenue | 73 |
| 21 | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR en control y el tratamiento +DTT | 75 |
| 22a | Comparación del pool de XC1 entre el control y el tratamiento +DTT de células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR | 77 |
| 22b | Comparación del estado de deepoxidación (DPS) entre el control y el tratamiento +DTT de células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a a luz saturante con PAR+UVR y PAR | 77 |
| 23a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento +CAP durante el tiempo de exposición a luz saturante | 79 |
| 23b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento +CAP durante el tiempo de recuperación en luz tenue | 79 |
| 24a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento DTT+CAP durante el tiempo de exposición a luz saturante | 81 |

| LISTA DE FIGURAS (Continuación) | | Página |
|--|--|---------------|
| 24b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR en el control y en el tratamiento DTT+CAP durante el tiempo de recuperación en luz tenue..... | 81 |
| 25a | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR en control y tratamiento +CAP..... | 83 |
| 25b | Inducción de la disipación térmica del exceso de energía en células LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a luz saturante con PAR+UVR y PAR en control y tratamiento DTT+CAP..... | 83 |
| 26a | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL y HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR durante el tiempo de exposición a luz saturante..... | 86 |
| 26b | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL y HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR durante el tiempo de exposición a luz saturante..... | 86 |
| 26c | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL y HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR durante el tiempo de recuperación en luz tenue..... | 87 |
| 26d | Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células LL y HL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR durante el tiempo de recuperación en luz tenue..... | 87 |
| 27 | Modelo hipotético de la ruta de síntesis de los pigmentos del ciclo XC en diatomeas..... | 104 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| I | Tasa de crecimiento calculada a partir de las densidades celulares para cultivos de <i>P. tricornutum</i> aclimatados a HL y LL..... | 10 |
| II | Cambio en la concentración de de pigmentos del XC1 y XC2 después de una hora de exposición a luz saturante en células de <i>P. tricornutum</i> aclimatadas a HL..... | 50 |
| III | Diferencia entre el tratamiento PAR+UVR y PAR en el porcentaje de disminución de la máxima eficiencia cuántica en células HL de <i>P. tricornutum</i> a los 60 min de exposición y después de 60 min de recuperación en luz tenue para el control y los tratamientos +DTT, +CAP y +DTT + CAP | 61 |
| IV | Cambio en la concentración de de pigmentos del XC ₁ y XC ₂ después de una hora de exposición a luz saturante en células de <i>P. tricornutum</i> aclimatadas a LL. | 70 |
| V | Diferencia entre el tratamiento PAR+UVR y PAR en el porcentaje de disminución de la máxima eficiencia cuántica en células LL de <i>P. tricornutum</i> a los 60 min de exposición y después de 60 min de recuperación en luz tenue para el control y los tratamientos +DTT, +CAP y +DTT + CAP | 80 |
| VI | Comparación de la máxima eficiencia cuántica, proporciones y tasas de inhibición rápida y lenta y tiempo medio de recuperación en células HL y LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR durante la exposición a luz saturante y su recuperación posterior en luz tenue. | 90 |
| VII | Diferencia entre el tratamiento PAR+UVR y PAR en el porcentaje de disminución de la máxima eficiencia cuántica en células HL y LL de <i>P. tricornutum</i> a los 60 min de exposición y después de 60 min de recuperación en luz tenue para el control y los tratamientos +DTT, +CAP y +DTT + CAP..... | 91 |
| VIII | Comparación de los valores máximos y de tasas de inducción de NPQ entre las células HL y LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas a PAR+UVR y PAR. | 92 |

| LISTA DE TABLAS (Continuación) | | Página |
|---------------------------------------|---|---------------|
| IX | Comparación del contenido de XC_1 inicial, del cambio del contenido de XC y de Dtx, del DPS y de la tasa de deepoxidación entre células HL y LL de <i>P. tricornutum</i> expuestas durante 60 min a PAR+UVR y PAR. | 93 |
| X | Parámetros de la curva ETR: ETR_{max} , pendiente y estimación de E_k para células HL y LL de <i>P. tricornutum</i> | 109 |

LISTA DE ABREVIATURAS

Ax = anteraxantina, pigmento del ciclo de las xantófilas en estado epoxidado

CAP = cloranfenicol, inhibidor de la síntesis proteica de procariontes

DPS = estado de de-epoxidación del ciclo de las xantofilas. Calculado como $[(Dtx)/(Dtx+Ddx)]$

Ddx = diadinoxantina, pigmento del ciclo de las xantófilas en estado epoxidado

Dtx = diatoxantina, pigmento del ciclo de las xantófilas en estado deepoxidado

DTT = ditioneitol, inhibidor de la enzima deepoxidasa

ETR = tasa del transporte linear de electrones

ETR_{max} = valor máximo de la tasa de transporte de electrones

E_k = irradiancia de saturación

F₀, F_m = fluorescencia mínima y máxima de la clorofila, respectivamente, en células adaptadas a la oscuridad

F_v/F_m = eficiencia cuántica máxima del fotosistema II de células aclimatadas a oscuridad

$(F_v = F_m - F_0)$

F'_m = fluorescencia máxima en células expuestas a luz

F = fluorescencia basal durante exposición a luz

ΔpH = Gradiente de protones formado a travez de la membrana tilacoide

ΔF/F_m' = eficiencia cuántica efectiva del fotosistema II durante exposición a luz

HL = cultivos aclimatados a $\sim 200 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$

LL = cultivos aclimatados a $\sim 50 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$

LISTA DE ABREVIATURAS (Continuación)

NPQ = “*quenching*” (disipación) no fotoquímico

PAR = radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm)

PSI = fotosistema I

PSII = fotosistema II

qE = componente de alta energía de NPQ dependiente del Δ pH transtilacoidal

qI = componente de relajación lenta de NPQ independiente del Δ pH transtilacoidal y debido a la fotoinhibición

UVR = radiación ultravioleta (280 a 400 nm)

V_x = violaxantina, pigmento del ciclo de las xantófilas en estado epoxidado

XC = ciclo de las xantofilas

XC₁ = ciclo de las xantofilas donde están involucrados los pigmentos Ddx-Dtx

XC₂ = ciclo de las xantofilas donde están involucrados los pigmentos Vx-Ax-Zx

Z_x = zeaxantina, pigmento del ciclo de las xantófilas en estado deepoxidado.

Capítulo 1

Caracterización del crecimiento de cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* aclimatados a dos irradiancias diferentes

I.1. Introducción

En los estudios sobre la fisiología fotosintética y caracterización de la producción de metabolitos es necesario cultivar las especies de estudio en condiciones controladas. En el caso de microalgas se han utilizado tres tipos de sistemas de cultivo, estáticos (*batch*), semicontinuos y continuos. Los cultivos continuos se caracterizan por recibir un flujo permanente de medio de cultivo fresco con una misma tasa de suministro y remoción. Esta técnica permite a los cultivos permanecer en crecimiento exponencial indefinidamente, siempre y cuando la tasa de dilución del cultivo sea la adecuada para mantener una tasa de crecimiento celular específico constante. En este caso, la concentración del cultivo es estable y determinada ya sea por la concentración de un nutriente limitante en los quimiostatos, o por la densidad celular en los turbidostatos. Los cultivos estáticos, en cambio, son aquellos que son provistos de medio de cultivo fresco cuando la población celular alcanza el máximo de densidad; en este punto se realiza un recambio total del medio. Estos tienen la ventaja de ser más económicos, de fácil manipulación y de requerir volúmenes de medio reducidos (Wood et al., 2005). En los cultivos estáticos, el crecimiento poblacional sigue diversas fases. La primera etapa es la fase de reposo (*lag*), donde el crecimiento es mínimo. Se ha demostrado que esta fase es más corta si el inóculo inicial es grande y el cultivo del que proviene estuvo aclimatado a las mismas condiciones. Este

período parece ser más un artefacto del recambio de cultivo que una etapa del crecimiento. A continuación sigue la fase exponencial de crecimiento, cuya característica principal es que la tasa de crecimiento es la máxima para las condiciones de cultivo y se mantiene estable hasta que haya limitación de nutrientes o de luz. El descenso de la tasa de crecimiento marca el inicio de la fase estacionaria, donde no hay crecimiento poblacional neto. En esta etapa, la acumulación de biomasa en los cultivos, cambia la disponibilidad de luz y nutrientes. La reducción en la irradiancia promedio dentro del cultivo, debido al autosombreado, provoca una respuesta de incremento de pigmentación (MacIntyre y Cullen, 2005).

El monitoreo del crecimiento de cultivos generalmente se realiza por medio del cálculo de densidad celular. Los procedimientos estándares para enumerar poblaciones de microalgas requieren el uso de microscopio óptico y hematocitómetro. Estos son utilizados preferentemente cuando el cultivo tiene una densidad celular en la que no se produce sobreposición de células. Lo anterior, permite lograr una estimación estadísticamente aceptable, siempre y cuando el número de células no sea demasiado bajo. Dependiendo del número de muestras y la densidad celular de las mismas, este procedimiento puede ser tedioso, consumir mucho tiempo y ser menos preciso que otros métodos (Soto et al., 2005). Sin embargo, la inspección visual es muy importante en la experimentación con cultivos ya que provee información sobre la morfología de las células y la presencia de contaminantes. Debido a los inconvenientes que presenta el conteo por microscopía óptica, se han aplicado otras técnicas de conteo celular tales como la microscopía de epifluorescencia y la citometría de flujo (Olson et al., 1985). Asimismo, se han utilizado mediciones alternas al conteo celular directo más sencillas y rápidas, dentro de las cuales, las más usadas para el

cálculo de la tasa de crecimiento de cultivos son la medición de la fluorescencia *in vivo* y la densidad óptica. También se utilizan como indicadores (“*proxy*”) de crecimiento la determinación de la concentración de clorofila, proteína, carbohidratos y lípidos. Para que un parámetro pueda ser utilizado como “*proxy*” de la densidad celular es fundamental demostrar que está correlacionado linealmente con ésta y conocer las condiciones de crecimiento bajo las cuales se cumple dicha linearidad (MacIntyre y Cullen, 2005). Para algunos de estos estimadores (*e.g.*: clorofila por célula, proteína por célula) existe un período de aclimatación a cualquier nueva condición de crecimiento, durante la cual, la relación entre el valor del parámetro y el número de células es variable. Dicho período puede durar desde 20 a más generaciones (Brand et al., 1981), después del cual se alcanza un estado de crecimiento balanceado, donde la concentración por célula de los principales constituyentes y la tasa de cambio de estos componentes en la población celular son constantes. Por lo tanto, la relación entre el número de células y los parámetros utilizados como “*proxy*” se mantiene estable. En los cultivos estáticos, la relación constante del número celular y la concentración promedio de los principales componentes celulares, ocurre solamente durante la fase exponencial de crecimiento (Wood et al., 2005).

La fotoaclimatación consiste en el ajuste de la función y composición del aparato fotosintético a determinadas condiciones lumínicas, lo que incluye la síntesis y degradación selectiva de pigmentos, proteínas de la cadena de transferencia de electrones y enzimas del Ciclo de Calvin (Geider et al., 1985, 1996). Los organismos aclimatados a alta luz (HL) poseen generalmente un contenido menor de clorofila y de pigmentos accesorios que aquellos que han crecido en condiciones de baja luz (LL) (Falkowski et al., 1985; Falkowski y La Roche, 1991). Se ha comprobado que la disminución en el contenido de

pigmentos constitutivos es consistente con el decremento en el tamaño y número de centros de reacción del PSI y PSII, siendo ésta una estrategia de protección del aparato fotosintético bajo condiciones de luz saturante (MacIntyre et al. 2002, Suggett et al. 2004). Asimismo, el aumento de la síntesis de pigmentos fotoprotectores carotenoides, principalmente del ciclo de las xantofilas (XC), es otra de las respuestas de aclimatación a irradiancias altas (Franklin y Forster, 1997). Rodríguez et al. (2005) compararon los cocientes de pigmentos entre LL/HL en diferentes especies de fitoplancton, y comprobaron que la razón entre los pigmentos colectores de luz (constitutivos y accesorios) entre las dos condiciones de cultivo fue mayor o igual a 1 y para los pigmentos carotenoides fotoprotectores fue menor a 1. Harris et al. (2005), reportaron para *Emiliana huxleyi* un incremento en las tasas de crecimiento específico en células que crecieron a $200 \mu\text{mol.cuanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (0.82 d^{-1}) en comparación a aquellas que lo hicieron a $50 \mu\text{mol.cuanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (0.38 d^{-1}). Además observaron un contenido 2.5 veces mayor de pigmentos del XC y un decremento del contenido de clorofila por célula.

Planteamiento del estudio.

Debido a que este trabajo se plantea el estudio del efecto de la radiación ultravioleta en una diatomea marina a partir de la medición de parámetros fisiológicos, es necesario experimentar con organismos que posean condiciones fisiológicas comparables. De esta forma, se pretende evitar una variabilidad en la respuesta debido a diferentes condiciones fisiológicas y atribuir las diferencias observadas a los tratamientos aplicados. Además, se requiere aclimatar a los cultivos a dos irradiancias diferentes, para así poder comparar la

respuesta de organismos que poseen distinta capacidad de fotoprotección. Por último, se necesita hacer la experimentación con cultivos que estén en la fase exponencial por que en esta condición la tasa de crecimiento es máxima y por lo tanto su estado fisiológico óptimo.

Por lo tanto, el objetivo general de esta parte del estudio fue establecer el inicio y la duración de la fase exponencial de crecimiento de poblaciones de *Phaeodactylum tricornutum* aclimatadas a baja y alta intensidad de luz. Para esto, se realizó un estudio de comparación de curvas de crecimiento en tiempos consecutivos y se comprobó de esa manera que los cultivos se encontraban aclimatados a las diferentes condiciones de irradiancia. Además se exploró la utilidad de otros indicadores de biomasa alternativos a la densidad celular para estimar el crecimiento poblacional de cultivos de *Phaeodactylum tricornutum*.

1.2. Materiales y Métodos

1.2.1. Condiciones de la caracterización del crecimiento.

El crecimiento poblacional de *P. tricornutum* se caracterizó por medio de tres réplicas de cultivos para cada aclimatación y durante tres períodos consecutivos de tiempo con una duración aproximada de 8 días cada uno (Series I, II y III). En el primer día de la fase estacionaria (T1), se realizaron los recambios para el inicio de la siguiente serie de cultivos. Se inocularon aproximadamente 2×10^6 células. ml^{-1} para la serie I y 5×10^5 células ml^{-1} para las series II y III en cuatro matraces Erlenmeyer de 125 ml con 75 ml de medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962) para cada aclimatación. Los cultivos se mantuvieron a $18^\circ\text{C} \pm$

2 y con luz PAR con una fotoperiodicidad de 16:8 horas y una intensidad de ~200 μmol cuanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (HL) y a ~50 μmol cuanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LL).

1.2.2. Indicadores de crecimiento.

Para la estimación del crecimiento poblacional se colectaron 3 ml de cultivo diariamente a la misma hora ($13.30 \pm \frac{1}{2}$ hora): 0.5 ml fueron conservados en solución de Lugol inmediatamente después del muestreo para el conteo de células con microscopio óptico en un hematocitómetro (Hausser Scientific, USA) y el resto se utilizó para la medición de absorbancia a 730 nm y a 675 nm en un espectrofotómetro (Elyptica, México). La absorción a 675 nm se puede atribuir a la clorofila a. La densidad celular fue estimada a partir del conteo celular de 3 muestras para cada cultivo y la caracterización del crecimiento fue realizada a partir del promedio de tres cultivos independientes. La tasa de crecimiento o la tasa proporcional de cambio (μ ; día⁻¹) fue calculada a partir de la ecuación:

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / \Delta t \quad (1),$$

donde N_0 y N_t es el tamaño de la población celular (cel ml^{-1}) a un tiempo de muestreo t_0 y t_t respectivamente. El intervalo de tiempo entre muestreos ($t_t - t_0$) está definido por Δt (24 hrs para todos los muestreos). A partir del segundo período de caracterización del crecimiento (Serie II) se realizaron mediciones de concentración de la clorofila *a* por espectrofotometría (Aminco, DW2-C, USA). Las muestras fueron extraídas con acetona al 90% (V:V) y conservadas en oscuridad a 4°C durante 24 hs. Antes de realizar la medición

por espectrofotometría las muestras fueron centrifugadas a 7500 rpm durante 5 min. La concentración fue calculada por la ecuación de Jeffrey y Humphrey (1975) formulada para diatomeas:

$$\text{Chl } a \text{ [ug ml}^{-1}\text{]} = (11.47 \text{ OD}_{664} - 0.04 \text{ OD}_{630}) \nu l^{-1} V^{-1} \quad (2),$$

donde OD_{664} y OD_{630} son las densidades ópticas a las longitudes de onda respectivas, ν es el volumen de acetona (ml), l el paso del haz de luz por la cubeta (cm) y V el volumen de muestra (ml).

1.3. Resultados

1.3.1. Densidad celular y tasa de crecimiento poblacional.

Las densidades celulares calculadas durante las tres series de tiempo (Fig. 1) muestran un solapamiento entre las series II y III en ambas aclimataciones, mientras que la serie I muestra un comportamiento diferente a las otras dos series tanto en HL como en LL. Las densidades celulares máximas alcanzadas en HL y LL fueron 1.6×10^7 y 1.2×10^7 células ml^{-1} respectivamente, siendo la diferencia entre ambas aclimataciones no significativa ($p \leq 0.05$). Por otro lado, sí se observaron diferencias en las tasas de crecimiento entre las aclimataciones, tanto en los valores máximos como en el tiempo en que se presentaron. El cambio celular respecto al tiempo mostró en HL un aumento importante de la densidad celular a partir del tercer día y una reducción de la tasa de

aumento al día 5 en las series II y III. El máximo crecimiento encontrado en la aclimatación a alta luz fue al tercer día, manteniéndose este máximo hasta el cuarto día en las series II y III. Por lo anterior, se considera que la fase exponencial de crecimiento en la aclimatación HL ocurrió desde el día 3 al día 4. En LL, las tasas de crecimiento fueron aproximadamente un 35% menores que en HL durante los días correspondientes a la fase exponencial de HL. Durante el sexto y séptimo día, la tasa de crecimiento en LL fue aproximadamente un 20% menor en comparación con HL. La fase de crecimiento exponencial en la aclimatación a baja luz, tuvo una duración mayor, desde el día 3 hasta el día 7 (Tabla I).

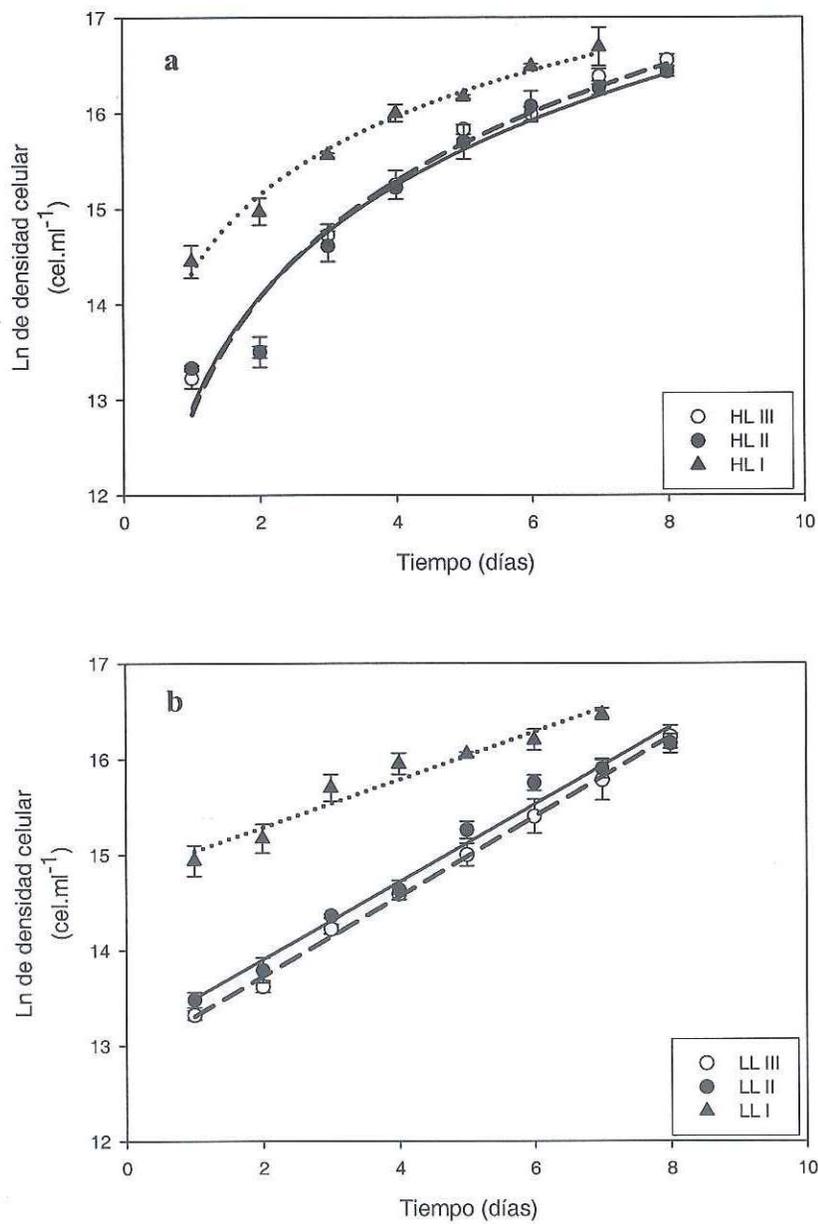


Figura 1 a y b. Caracterización del crecimiento celular en tres cultivos consecutivos de *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos a una alta irradiancia (HL; a) y baja irradiancia (LL; b). Las líneas representan un ajuste a un modelo lineal.

Tabla I. Tasa de crecimiento calculada para los días 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 (d2, d3, d4, d5, d6, d7 y d8 respectivamente) para cada serie de cultivos consecutivos (I, II y III) a partir de las densidades celulares. En negrita se destacan los días correspondientes a la fase exponencial de crecimiento. Resultados del análisis t-Student entre las tasas intrínsecas de crecimiento en los cultivos I y II (primer renglón) y II y III (tercer renglón): n.s, diferencias no significativas, * $p \leq 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

| μ (día ⁻¹) | d2 | d3 | d4 | d5 | d6 | d7 | d8 |
|----------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| HL I | 0.53±0.05 | 0.56±0.07 | 0.52±0.03 | 0.43±0.05 | 0.41±0.04 | 0.37±0.06 | |
| HL II | 0.23±0.01*** | 0.66±0.07 ^{n.s.} | 0.63±0.07* | 0.57±0.05* | 0.56±0.04* | 0.49±0.006* | 0.44±0.002 |
| HL III | 0.28±0.09 ^{n.s.} | 1.01±0.05 ^{n.s.} | 0.84±0.03 ^{n.s.} | 0.65±0.02 ^{n.s.} | 0.55±0.03 ^{n.s.} | 0.53±0.02 ^{n.s.} | 0.49±0.02 ^{n.s.} |
| LL I | 0.23±0.06 | 0.38±0.08 | 0.33±0.03 | 0.28±0.04 | 0.25±0.06 | 0.26±0.04 | |
| LL II | 0.28±0.06 ^{n.s.} | 0.45±0.03 ^{n.s.} | 0.41±0.08* | 0.44±0.08*** | 0.46±0.03** | 0.41±0.09*** | 0.39±0.03 |
| LL III | 0.30±0.01 ^{n.s.} | 0.63±0.04** | 0.53±0.03* ^{n.s.} | 0.42±0.02 ^{n.s.} | 0.41±0.03 ^{n.s.} | 0.41±0.03 ^{n.s.} | 0.41±0.01 ^{n.s.} |

1.3.2. Densidad óptica y concentración de clorofila *a*.

El crecimiento poblacional caracterizado por densidad óptica y concentración de chl *a*, muestran un patrón similar al de la densidad celular (Figs. 2 y 3), observándose para ambas variables una fase exponencial más larga en LL. Además, las curvas de crecimiento obtenidas a partir de dichos estimadores de biomasa se ajustan al igual que las obtenidas por densidad celular a una función lineal con $r^2 > 0.90$.

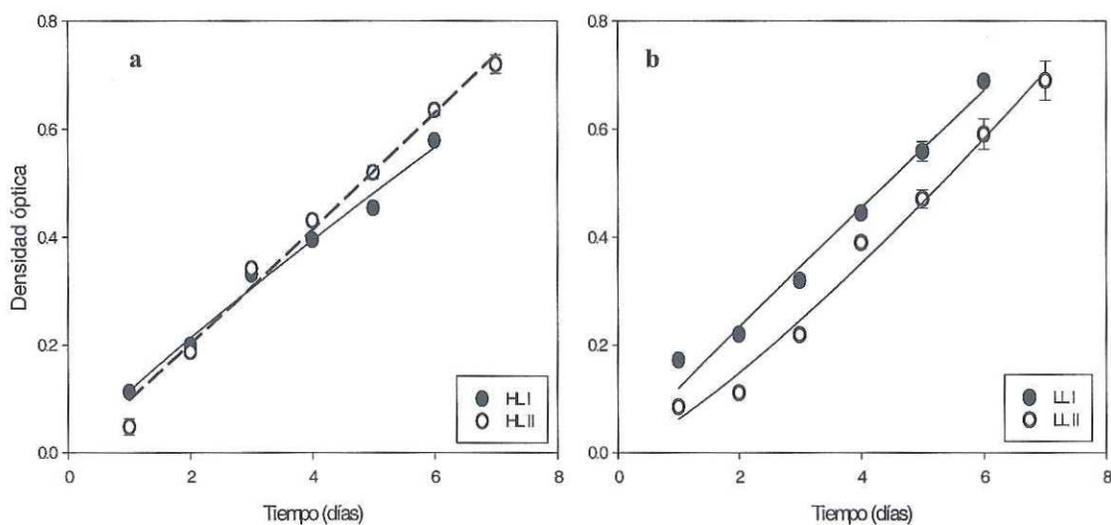


Figura 2 a y b. Caracterización del crecimiento por dispersión de luz a 730 nm en dos cultivos consecutivos de *Phaeodactylum tricornerutum* mantenidos a una alta irradiancia (HL; a) y baja irradiancia (LL; b). Las líneas representan un ajuste a un modelo lineal.

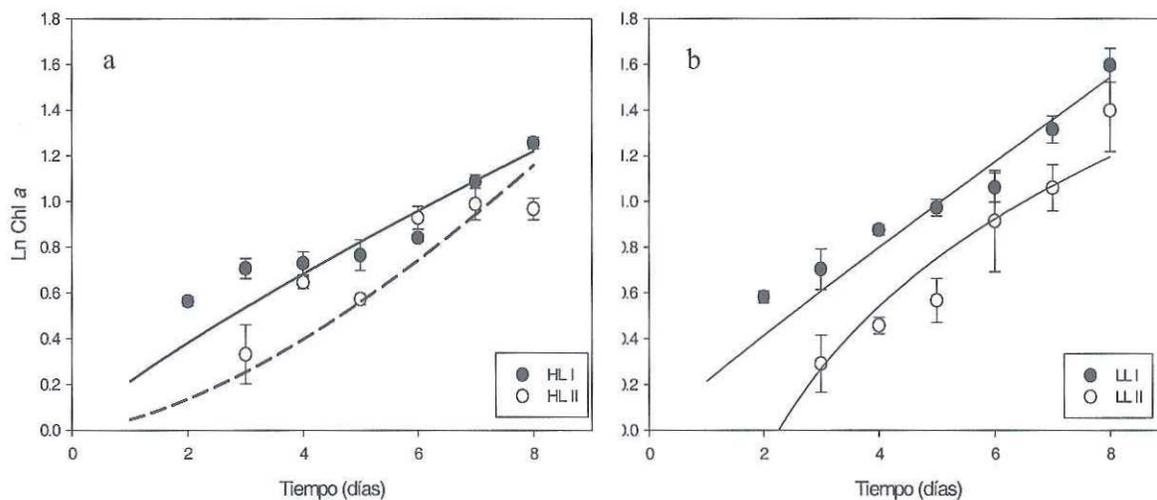


Figura 3 a y b. Caracterización del crecimiento por concentración de Chl *a* ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en dos cultivos consecutivos de *Phaeodactylum tricornerutum* mantenidos a una alta irradiancia (HL; a) y baja irradiancia (LL; b). Las líneas representan un ajuste a un modelo lineal.

La razón densidad celular/densidad óptica mostró valores muy similares desde el día 1 al 7 tanto en HL como en LL. Las diferencias entre los cultivos I, II y III fueron no significativas ($p \leq 0.05$) en ambas aclimataciones (datos no mostrados). La regresión lineal calculada entre la densidad celular y la densidad óptica en HL mostraron pendientes diferentes en las tres series de cultivos (Fig. 4a), mientras que en LL las pendientes fueron muy similares (Fig. 4b) y mostraron un $r^2 > 0.90$. La relación entre la densidad celular y la concentración de clorofila *a* fue cambiando a lo largo del tiempo en todas las series de cultivos, tanto en HL como en LL. Las series de cultivos II y III presentaron razones significativamente diferentes en la mayoría de los días en HL y LL, aunque muy similares en los días correspondientes a la fase exponencial de crecimiento (datos no mostrados). Asimismo, las pendientes calculadas a partir de una regresión lineal, fueron distintas entre las dos series en ambas aclimataciones (Fig. 4c y d) y el $r^2 > 0.65$.

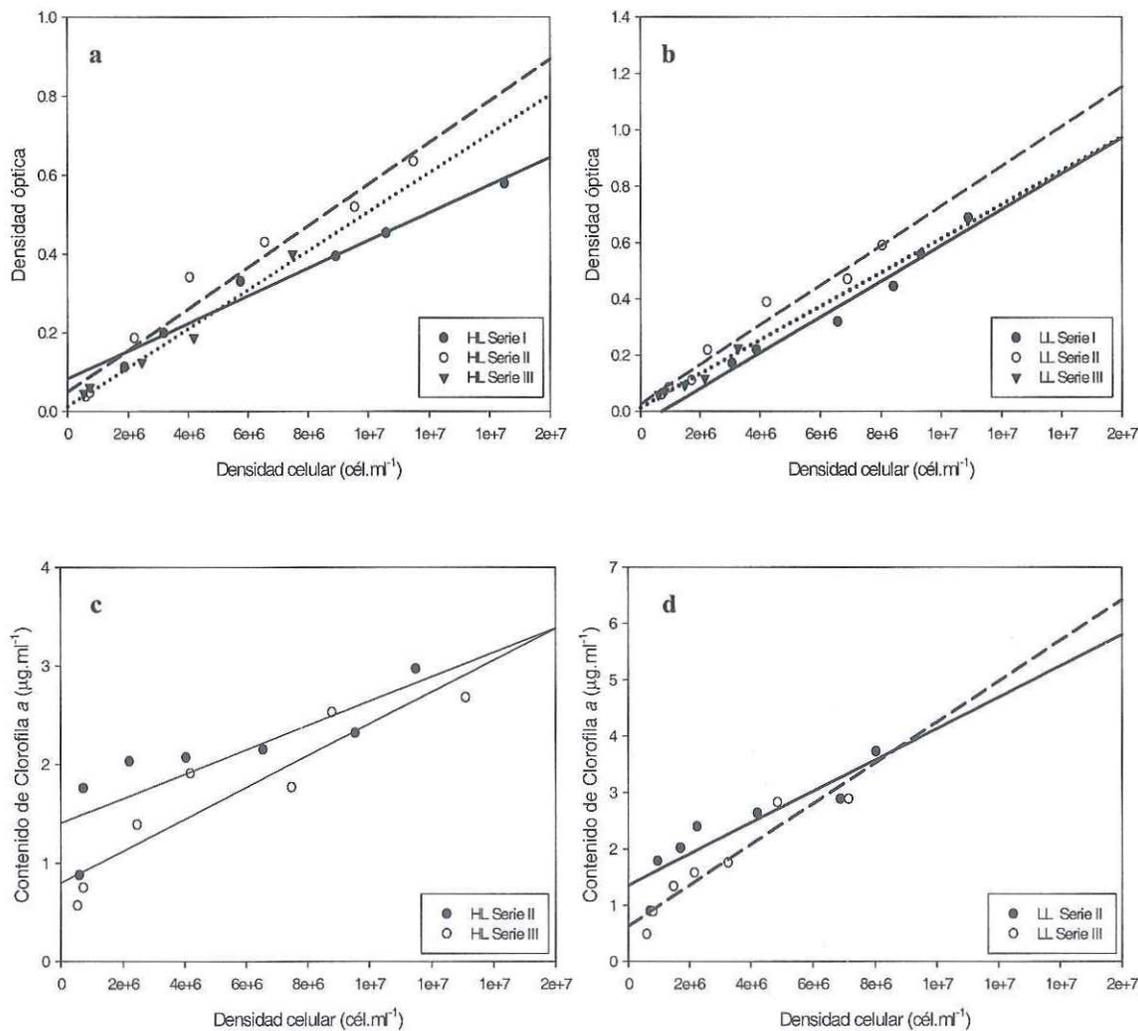


Figura 4 a, b, c y d. Regresión lineal entre densidad celular (cél. ml⁻¹) y densidad óptica (a-b) y entre densidad celular (cél. ml⁻¹) y concentración de Chl a (µg.ml⁻¹) (c-d) en dos cultivos consecutivos de *Phaeodactylum tricornutum* mantenidos a una alta irradiancia (HL; a) y baja irradiancia (LL; b). Los ajustes a un modelo de regresión lineal presentaron una $r^2 > 0.90$.

I.4. Discusión

I.4.1. Verificación de la aclimatación.

Según Wood et al. (2005), para demostrar que el crecimiento de un cultivo es constante (estado de crecimiento balanceado), se recomienda realizar tres curvas de crecimiento consecutivas con una fase exponencial de tres días de duración al menos. Asimismo, es de fundamental importancia el cálculo de un volumen de inóculo inicial lo suficientemente pequeño como para que el medio de cultivo mantenga en crecimiento al menos a 3 generaciones de células. También es importante realizar los recambios sin limitación por nutrientes (antes de llegar a la fase estacionaria) ya que cuando las células de un cultivo experimentan cambios de fases (exponencial a estacionaria), el tiempo necesario para llegar a un crecimiento balanceado en el nuevo cultivo es mayor. Cuando estas condiciones se cumplen, el solapamiento de las fases exponenciales de crecimiento entre las series de curvas de crecimiento y las tasas de crecimiento constantes indicarían que los cultivos se encuentran aclimatados. De acuerdo al crecimiento observado en este estudio durante la segunda y tercera serie de muestreo (II y III) se comprueba que los cultivos se encuentran aclimatados a las respectivas condiciones de luz (HL y LL). El solapamiento de las curvas II y III obtenidas a partir de la densidad celular (Fig.1) y las diferencias no significativas ($p \leq 0.05$) de las tasas de crecimiento en los días 2, 3, 4, 5, 6 y 7 entre los cultivos consecutivos II y III, demuestran el establecimiento de las respectivas aclimataciones (Tabla I). Por otro lado, la curva de crecimiento I no se solapa ni con la II ni con la III y las tasas de crecimiento muestran valores significativamente diferentes entre los cultivos I-II (Tabla I) y I-III. Dentro de los factores que pueden haber influido en dicha

diferencia es que la densidad celular inicial fue más alta en I, por lo que se llegó a la fase estacionaria más rápidamente. Además el inóculo provenía de cultivos que habían tenido cambios en las condiciones lumínicas y de temperatura debido a problemas con el incubador once días antes de iniciar la primera serie de cultivos. Debido a lo anterior, se creyó conveniente sólo considerar las curvas II y III para la interpretación de los datos.

Si se comparan las tasas intrínsecas de crecimiento entre las aclimataciones, la aclimatación HL presentó un valor un 35% más alta durante la fase exponencial de crecimiento (Tabla I) que LL. De manera similar, Harris et al. (2005) reportan para *Emiliana huxleyi* una tasa de crecimiento de un 45% mayor en células aclimatadas a 200 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con respecto a aquellas que crecieron a 50 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Sin embargo, estudios realizados con diatomeas (Falkowsky et al., 1985), reportan una tasa intrínseca de crecimiento de aproximadamente un 75% mayor en células aclimatadas a 150 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en comparación a aquellas aclimatadas a 30 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En base a lo anterior, se comprueba que en este estudio existen diferencias de crecimiento entre las aclimataciones aunque esta diferencia no es tan pronunciada teniendo en cuenta que LL recibió una irradiancia cuatro veces menor que HL.

1.4.2. Identificación de la fase exponencial.

Con el fin de establecer los días correspondientes a la fase exponencial se compararon las tasas de crecimiento en cada aclimatación, concluyendo que en HL los días correspondientes al crecimiento exponencial son los días 3° y 4° y en LL los días 3°, 4°, 5°, 6° y 7°, iniciando la fase estacionaria en el 5° y 8° día respectivamente (Tabla I; Fig. 1).

Esta caracterización es de fundamental importancia para planear la experimentación durante los días correspondientes a la fase de crecimiento.

1.4.3. Evaluación de los estimadores alternativos de biomasa.

Se considera que la densidad óptica a 730 nm es un buen estimador de biomasa en ambas aclimataciones, ya que las razones entre ambas variables se mantienen constantes a lo largo de los 7 días y no hay diferencias significativas entre las tres series de cultivos consecutivas. Las regresiones lineales calculadas confirmaron que existe una relación lineal entre ambas variables en HL ($r^2=0.97$) y en LL ($r^2=0.90$). Aunque la pendiente es diferente entre las tres series de tiempo evaluadas en HL, se atribuye esta diferencia al inicio de cada serie con diferentes densidades celulares. Por otro lado, en LL las pendientes son muy similares entre las tres series de tiempo, con ordenadas al origen casi iguales en las series II y III.

Para el caso de la concentración de clorofila *a*, la variación de la razón con la densidad celular a lo largo de los 7 días, demuestra que sólo es un estimador confiable de densidad celular en los días correspondientes a la fase exponencial de crecimiento. El coeficiente de determinación obtenido de la regresión lineal entre ambas variables durante los 7 días monitoreados es bajo, por lo que se demuestra que no hay una relación lineal satisfactoria entre los dos indicadores de crecimiento. Asimismo, en ninguna de las dos aclimataciones se observaron pendientes similares, lo que sugiere que la relación entre dicha variable y la densidad celular no tienen un patrón definido. Lo anterior, no coincide con lo reportado por Parkhill et al. (2001) en cultivos continuos de *Thalassiosira pseudonana* aclimatados a condiciones de luz y nutrientes determinadas. Estos autores

observaron valores constantes de densidad celular, de fluorescencia y de concentración de clorofila y nutrientes durante al menos tres días en estado de crecimiento balanceado. Probablemente la diferencia en los resultados de este estudio es debido a que en los cultivos estáticos, la progresiva acumulación de biomasa cambia la disponibilidad de nutrientes y luz. Estos cambios conducen a respuestas aclimativas en el contenido de pigmentos. La reducción de la irradiancia promedio disponible para las células por autosombreo del cultivo, causa un incremento de la clorofila *a*. Por lo tanto, en los días correspondientes a la fase estacionaria (apartir del 5° día en HL y 8° día en LL), la concentración de clorofila puede haber variado debido a las condiciones de luz diferentes (Falkowsky et al., 1985). En base a lo anterior, no se cree conveniente utilizar en este estudio el contenido de clorofila *a* como indicador de crecimiento.

1.4.4. Conclusiones.

Las características de crecimiento de las poblaciones celulares aclimatadas a las dos intensidades de luz fueron diferentes, presentandose una tasa intrínseca de crecimiento mayor y una fase exponencial de menor duración en la aclimatación HL en comparación a LL. Lo anterior refleja que existieron diferencias a nivel fisiológico entre las dos aclimataciones, por lo que se considera que la comparación entre ambas, podrá ser de gran utilidad en el estudio del efecto de la UVR sobre los mecanismos de fotoprotección.

Capítulo 2

Efecto de la radiación ultravioleta sobre los mecanismos de fotoprotección en una diatomea marina (*Phaeodactylum tricornerutum*)

II.1. Introducción

El espectro solar está compuesto por unidades llamadas fotones, los cuales poseen una energía característica. Dicha energía, es inversamente proporcional a la longitud de onda del fotón. La fracción del espectro comprendida entre los 400 a 700 nm de longitud de onda constituye la radiación fotosintéticamente activa (PAR), que es la absorbida por los organismos fotosintéticos para obtener la energía necesaria destinada a la síntesis de compuestos orgánicos. La luz de longitud de onda menor, comprendida entre los 280 a 400 nm, es denominada radiación ultravioleta (UVR) y, aunque no es utilizada para la fotosíntesis, produce efectos importantes sobre este proceso. Lo anterior es debido principalmente a la alta energía emitida por la UVR y a su absorción por moléculas críticas en el funcionamiento celular. La fracción de luz ultravioleta que llega a la superficie terrestre, se divide en UV cercano o UV-A (320 a 400 nm) y UV medio o UV-B (280-320 nm), siendo la calidad espectral un factor de variación en la intensidad del efecto sobre los organismos vivos (Kirk, 1994).

Los organismos fotosintéticos han desarrollado estrategias que regulan la capacidad de colección de luz y de transporte de electrones, para hacer frente a las variaciones de luz que se presentan en el medio. En especial, los organismos unicelulares que no se encuentran fijados a un sustrato, como el fitoplancton, pueden experimentar variaciones de

irradiancia grandes e impredecibles en lapsos cortos de tiempo (Falkowski y La Roche, 1991). Lo anterior promueve la adaptación a condiciones cambiantes, siendo las diatomeas consideradas como el grupo fitoplanctónico con más habilidad para adaptarse a fluctuaciones de luz (Mitrovic et al. 2003; Wagner et al. 2006) ya que expresan mecanismos rápidos de regulación de la actividad fotosintética como adaptación a las condiciones de mezcla en la columna de agua (Huisman et al. 2004; Tozzi et al. 2004).

Cuando los niveles de PAR son altos, ocurre un desbalance entre el número de fotones absorbidos y su utilización para la fotosíntesis, lo que puede causar la fotoinhibición. Este fenómeno es comúnmente definido como la disminución de la eficiencia cuántica máxima y es dependiente de la intensidad de la luz y de la duración de la exposición (Ting y Owens, 1994). La disminución en la eficiencia cuántica máxima puede estar asociada a una regulación del fotosistema II (PSII), que implica la disipación como calor del exceso de energía absorbida (fotoinhibición dinámica o fotoinactivación), o ser causada por el daño en los centros de reacción (CR) del PSII, ocurriendo una caída del número de CR funcionales (fotoinhibición crónica) (Hanelt, 1996; Osmond, 1994).

Se ha demostrado que la fotoinhibición crónica, se debe al daño fotooxidativo que ocurre en el aparato fotosintético, específicamente en el centro de reacción del fotosistema II, PS II (Andersson y Barber, 1996). El daño fotooxidativo, es el resultado de la acumulación de energía de excitación que no puede ser eficientemente canalizada hacia la ruta fotoquímica, con el potencial de generar especies tóxicas de oxígeno ($^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2). Estas especies, pueden provocar la destrucción de una de las subunidades protéicas del PSII, la denominada proteína D1. Al ocurrir la degradación de esta proteína, el PSII deja de ser funcional, por lo que se interrumpe el transporte electrónico. La proteína D1 es

rápida y sintetizada “*de novo*” y reemplazada en los fotosistemas. Cuando la tasa de reparación del PSII es más lenta que la tasa de daño, ocurre este tipo de inhibición (Balaguer et al., 2002). Un buen indicador de la fotoinhibición, es la medición de la disminución de la eficiencia cuántica máxima de los centros de reacción del PSII (F_v/F_m) durante la exposición a intensidades de luz saturantes y la recuperación subsecuente. Diversos autores han demostrado que la exposición a altas intensidades de PAR provocan una disminución en la producción de la fluorescencia de la clorofila *a* (Kiefer, 1973; Sakshaug et al., 1987), y que ese descenso se relaciona con la reducción del número de los centros de reacción del PSII fotoquímicamente activos (Kolber et al., 1988; Hofstraat et al., 1994; Jin et al., 2003).

Los organismos fotosintéticos han desarrollado estrategias de respuesta para evitar el daño fotooxidativo. Una de las respuestas más importantes, es la disipación térmica del exceso de energía en el aparato fotosintético. Existen varios mecanismos moleculares que intervienen en esta respuesta fotoprotectiva y si alguno de estos se ve afectado por condiciones ambientales adversas existirá un nivel de fotoprotección subóptimo. Se ha reportado que la radiación ultravioleta puede afectar la síntesis de pigmentos fotoprotectores involucrados en la disipación térmica del exceso de energía, sin embargo hay trabajos donde se reporta lo contrario.

La disipación de calor como mecanismo de fotoprotección.

Existe una variedad de estrategias que los organismos fotosintéticos utilizan para reducir el impacto del exceso de PAR, siendo la conversión a calor de la energía absorbida

en exceso, el principal mecanismo de fotoprotección a corto plazo. Cuando la luz absorbida excede la capacidad de su utilización en los fotosistemas (PS), aumenta considerablemente la concentración de H^+ en el lumen, y el gradiente de H^+ entre el estroma del cloroplasto y el lumen de los tilacoides se hace mayor (ΔpH aumenta). La disminución del pH del lumen, activa mecanismos que regulan la eficiencia fotosintética protegiendo al fotosistema II (PSII) del daño oxidativo. Estos mecanismos fotoprotectores generan un aumento en la disipación de energía como calor en las antenas del PSII en lapsos de segundos a minutos (Gilmore y Yamamoto, 1993). Dicha disipación de calor resulta en una disminución de la fluorescencia en el PSII durante condiciones de luz saturante (Demmig et al., 1987; Külheim et al., 2002; Holt et al., 2004; Stroch et al., 2004; Horton et al. 2005), la cual no involucra a la vía fotoquímica (qP), por lo que se lo denomina “*Non photochemical quenching*” (NPQ o qN). El NPQ es un proceso de gran importancia en la protección del aparato fotosintético contra el exceso de radiación (Olaizola et al., 1994; Pfündel y Bilger, 1994; Müller et al., 2001; Morosinotto et al., 2003). Para la inducción de NPQ máximo, no sólo es necesaria la acidificación del lumen tilacoidal, sino también la activación del ciclo de las xantófilas (XC) (Morosinotto et al., 2003; Strotch et al., 2004). Este mecanismo de fotoprotección, es activado por la disminución del pH del lumen y consiste en la interconversion de pigmentos carotenoides del tipo de las xantófilas por medio de la deepoxidación de violaxantina (Vx) a anteraxantina (Ax) y de ésta a zeaxantina (Zx) en el grupo de algas verdes y plantas superiores o de diadinoxantina (Ddx) a diatoxantina (Dtx) en varios grupos de las cromófitas. Se cree que los pigmentos deepoxidados (Zx y Dtx) absorben parte de la energía de excitación en exceso y la disipan en forma de calor, protegiendo así al PSII del daño oxidativo (Niyogi, 1999).

Los mecanismos moleculares involucrados en la disipación de calor incluyen una respuesta rápida y una lenta. La función de la primera, producida por la protonación de algunos complejos antena del PSII al existir un pH bajo en el lumen, podría ser promover una asociación cercana entre el pigmento deepoxidado con la Chl* o, producir un cambio conformacional en los complejos antena que incrementarían la pérdida de calor desde la Chl*. La respuesta lenta se debe a la deepoxidación de los pigmentos XC y como consecuencia la disipación de calor desde la Chl* hacia la Dtx o Zx (Govindjee, 2002). La activación del ciclo XC no sólo depende de la reacción de deepoxidación, sino que incluye varios pasos estimulados por el descenso del pH tilacoidal: (1) la liberación del pigmento epoxidado desde los complejos antena; (2) la activación de la enzima Vio-deepoxidasa; (3) la producción del pigmento deepoxidado en la fase lipídica de la membrana tilacoidal y (4) la difusión por la membrana del pigmento deepoxidado y acoplamiento al complejo proteico-pigmentario donde se lleva a cabo mayormente la disipación térmica (Morosinotto et al., 2003).

El rol de fotoprotección del XC ha sido demostrado por diversos estudios: Demers et al., (1991) y Marshall y Newman (2002) observaron el aumento de los pigmentos deepoxidados en algas aclimatadas a altas irradiancias y bajo exposición a altos niveles de PAR acompañado de un “quenching” de la fluorescencia de la clorofila *a*. La disminución de la fluorescencia se debe a la disipación térmica de la energía (Ting y Owens, 1993; Ting y Owens, 1994). Por lo tanto, existe una asociación entre el ciclo XC y el NPQ, lo que se ha confirmado para varios organismos fotosintéticos (Gilmore y Yamamoto, 1993; Olaizola et al., 1994; Müller-Moule et al., 2002).

Componentes del NPQ.

El NPQ puede ser dividido en tres componentes diferentes de acuerdo a su cinética de disipación en la oscuridad después de haber sido inducidos durante un período de iluminación. El componente más rápido es el que depende del pH, denominado qE, o componente debido a un estado de energía alto. El qE se disipa en segundos una vez que el ΔpH se pierde (transición luz-oscuridad). El segundo componente, qT, se relaja en pocos minutos después de exposición a luz saturante y es debido al fenómeno de los estados de transición (movimiento de la antena periférica del PSII hacia el PSI), el cual parece no tener un rol muy importante en la fotoprotección (Müller et al., 2001). El tercer componente, qI, muestra una relajación más lenta en oscuridad y está relacionado en parte con la fotoinhibición, reflejando el balance entre la fotoprotección y el fotodaño.

Para distinguir entre los mecanismos de fotoinhibición y fotoprotección se pueden comparar las mediciones de fluorescencia de la clorofila *a*, donde F_0 (fluorescencia del PSII después de un período de oscuridad, con todos los centros de reacción abiertos) disminuye en proporción directa a F_m (fluorescencia del PSII después de un pulso de luz saturante, con todos los centros de reacción cerrados), cuando se trata del mecanismo de fotoprotección de qE. Por otro lado, en qI, F_0 aumenta mientras F_m disminuye (Gilmore, 1997). Este último componente, independiente de la concentración de Dtx, se dispara cuando los centros de reacción dañados de los PSII atrapan la energía disipándola como calor. Sin embargo, estos centros que son capaces de hacer separación de cargas, pero no de reducir a QB, constituyen una válvula de escape del exceso de energía de excitación sólo si ocurre transferencia de energía entre los centros de reacción del PSII (Olaizola et al., 1994).

Expresión de los mecanismos de fotoprotección.

La respuesta a exposiciones altas de PAR varía de acuerdo a la historia lumínica de cada organismo. Un organismo aclimatado a condiciones de alta luz expresará estrategias de fotoprotección que minimizen la fotoinactivación y facilite el balance entre daño y reparación. Dentro de los componentes importantes en la aclimatación a alta irradiancia (HL) se encuentra el decremento del tamaño de la antena con el fin de reducir el área efectiva de absorción de los fotosistemas. Esto está asociado a una disminución de pigmentos constitutivos y accesorios y a un aumento de la síntesis de pigmentos del XC. Asimismo, los organismos aclimatados a HL presentan valores más altos de deepoxidación en condiciones de luz saturante y epoxidación más rápida en irradiancias bajas. Lo último permitiría una recuperación más rápida del PSII en condiciones de luz tenue en las algas aclimatadas a HL (Franklin y Forster, 1997; Harris et al. 2005; van de Poll et al., 2006).

Diversos estudios confirman que existe una mayor capacidad de fotoprotección en microalgas aclimatadas a HL cuando son expuestas a condiciones de luz saturante. Casper-Lindley y Björkman (1998) observaron un conjunto (“pool”) de pigmentos del XC mayor en varias especies de microalgas aclimatadas a HL en comparación a organismos aclimatadas a baja luz. Lavaud et al. (2002) reportaron para *P. tricornutum* un DPS $[Dtx/(Ddx+Dtx)]$ y NPQ alto en algas aclimatadas a HL. Dimier et al. (2007), demostraron para *Chaetoceros sociales* y *Thalassiosira rotula*, mayor contenido de Dtx y valores máximos de NPQ de 5 a 10 veces más altos en HL en comparación a LL. Asimismo, se han encontrado concentraciones altas de Dtx en condiciones de oscuridad (epoxidación incompleta de Dtx) en organismos aclimatados a HL (Demers et al. 1991).

Phaeodactylum tricornutum (Bohlin) como especie modelo de estudio de la disipación térmica del exceso de energía.

La especie seleccionada para este estudio pertenece al grupo de Bacillariophyceae, el cual tiene una gran importancia ecológica ya que contribuye aproximadamente al 40% de la producción primaria neta oceánica (Falkowski et al., 2003). Las diatomeas planctónicas florecen en aguas con turbulencia, tanto en ambientes costeros, oceánicos o estuarinos, donde ocurren frecuentes fluctuaciones de intensidad de luz. Por ello, estos organismos han desarrollado estrategias para mantener la fotosíntesis eficientemente en ambientes de luz muy variables (Kashino et al., 2002). Uno de los mecanismos más importantes, es su elevada capacidad de disipación del exceso de energía por medio del XC de Ddx a Dtx.

P. tricornutum es una especie estuarina que ha sido utilizada extensamente en estudios fisiológicos, dentro de los cuales son de especial interés para este estudio aquellos relacionados con fotoprotección (Ting y Owens 1993; Arsalane et al., 1994; Olaizola et al., 1994; Casper-Lindley y Bjorkman 1998; Goss et al., 1999; Mewes y Richter 2002). Se ha demostrado, que las diatomeas estuarinas poseen una capacidad de fotoprotección más alta y flexible que las especies costeras u oceánicas, y que cuando son expuestas a luz saturante, presentan menor reducción de su eficiencia fotosintética (Lavaud et al., 2007). Asimismo, la concentración de pigmentos del XC por unidad de clorofila *a* que se reportan para esta especie es mucho más alto que en plantas superiores (Lavaud et al., 2003), al igual que los valores de NPQ que superan hasta 5 veces al de plantas terrestres. Además se ha comprobado que el NPQ en esta especie tiene efectivamente un efecto fotoprotector para el PSII bajo condiciones de luz saturante ya que existe una relación lineal entre la concentración de Dtx y NPQ bajo exposiciones a altas intensidades de PAR (Arsalane et

al., 1994; Olaizola et al., 1994; Lavaud et al., 2002; Ruban et al., 2004). Lavaud et al., (2004) observaron que este patrón se repite en otras especies de diatomeas como son *Cylindrotheca fusiformis*, *Ditylum brightwellii* y *Thalassiosira weissflogii*, de mayor importancia ecológica que *P. tricornutum*; por lo contrario, en especies pertenecientes a otros grupos taxonómicos no se encuentra una correlación entre la de-epoxidación de XC y NPQ, tal como se observa en *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta), *Euglena gracilis* (Euglenophyta) y *Ochromonas danica* (Chrysophyceae) (Casper-Lindley y Björkman, 1998).

En diatomeas se ha demostrado que la activación tanto del XC como del NPQ se produce a un pH del lumen más alto que en plantas superiores (Jakob et al., 2001; Grouneva et al., 2005), lo que ocasiona una rápida reactivación de la enzima deepoxidasa, asegurándose de esta forma, un veloz suministro de NPQ vía moléculas Dtx. Este mecanismo es importante para producir un rápido cambio de función de las antenas de colectores de luz a disipadores de energía en ambientes de luz altamente variable (Lavaud y Kroth, 2006).

Por lo tanto, el estudio de la fotoprotección y mecanismo de NPQ en esta especie, puede aportar importantes evidencias de los mecanismos involucrados en dicha función.

Efecto del UVR sobre el PSII.

El UVR tiene un efecto negativo sobre la capacidad fotosintética. Heraud y Beardall (2000) demuestran efectos inhibitorios durante exposiciones a UVR solamente, lo cual se refleja en una disminución de F_v/F_m . El blanco principal de esta radiación es el PS II y se

modifica específicamente la estructura del complejo protéico D1/D2 (Renger et al., 1989). Además, existen evidencias de que el UVR inactiva el complejo de oxidación del agua y tiene efectos sobre los residuos donadores de electrones de la tirosina Z y D y en los aceptores quinona A y B (Turcsanyi y Vass, 2000).

Sin embargo, considerando que en exposiciones naturales, los organismos fotosintéticos están expuestos simultáneamente a PAR y UVR, es necesario medir el efecto conjunto de ambas fracciones espectrales. La disminución de F_v/F_m , de evolución de O_2 , constantes de transporte de electrones y concentración de proteína D1 en algas expuestas a PAR+UVR confirman el efecto conjunto o sinérgico de esta radiación (Montero et al., 2002; Shelly et al., 2003; Bouchard et al., 2005).

Efecto del UVR sobre el XC.

La susceptibilidad de los organismos fotosintéticos al PAR, puede incrementarse considerablemente si no se expresan eficientemente los mecanismos de fotoprotección, en particular, si el XC se ve afectado, disminuirá la capacidad de disipación térmica del exceso de energía. Diversos autores han demostrado que la UVR causa la reducción de la síntesis de Zx o Dtx en condiciones de luz saturante y que la menor recuperación de la eficiencia fotosintética observada después de exposiciones cortas a PAR + UVR podría ser consecuencia de la disminución del rol fotoprotector del XC. Mewes y Richter (2002), demuestran en la diatomea *P. tricornutum* expuesta a altas intensidades PAR y UVR, una disminución de Dtx debido a un aumento en la reacción de epoxidación de Dtx a Ddx. Dichos autores proponen que el UVR provoca la ruptura del ΔpH , lo que activaría a la Dtx

epoxidasa. En coincidencia con la disminución del estado de deepoxidación o DPS, observan una disminución de la evolución de oxígeno. A partir de lo anterior, se deduce que se produce una pérdida de la función fotoprotectora mediada por Dtx y que las células se vuelven más vulnerables a la fotoinhibición por PAR. Asimismo, García-Mendoza et al. (2005) observan para la diatomea *Thalassiosira weissflogii* una reducción del 20% en la tasa de conversión de Ddx a Dtx en cultivos expuestos a radiación solar natural respecto a aquellos sólo expuestos a PAR, demostrándose una relación entre el decremento de formación de Dtx y la recuperación más baja de F_v/F_m para el tratamiento PAR + UVR. A partir de los resultados de dicho estudio, se sugiere que la mayor fotoinactivación en el tratamiento con UVR es debida a la disminución de la síntesis de Dtx y que el efecto del UVR sobre la deepoxidación podría ser explicada por la limitación del sustrato (Ddx). Al respecto, Morossinoto et al. (2003), proponen que el paso limitante en la deepoxidación de XC, es la liberación del pigmento epoxidado desde los complejos colectores de luz. Por otro lado, en plantas superiores se reporta una disminución de la actividad de la enzima violanxantina deepoxidasa durante tratamientos con UVR en paralelo a la reducción de la tasa de transporte de electrones (Pfündel et al., 1992).

Aunque no es claro cuál es el mecanismo molecular que se ve afectado durante exposiciones a UVR que reduce los niveles de xantófilas deepoxidadas, las evidencias presentadas sustentan que dicha radiación produce una disminución del DPS que concuerda con una disminución de la eficiencia fotosintética. Por el contrario, otros autores observan que el UVR aumenta la deepoxidación de xantófilas y NPQ en algunas especies de microalgas. Goss et al. (1999) reportan que la conversión de Ddx a Dtx en *P. tricornutum* es estimulada por UVR durante exposiciones a altas intensidades de PAR, lo que coincide

con un incremento en NPQ y una reducción en la capacidad fotosintética en el tratamiento con UVR. Asimismo, Sobrino et al. (2005) observan una mayor conversión de Vx y Ax a Zx en *Nanochloropsis gaditana* en condiciones de radiación solar simulada (PAR + UVR). Como sugieren diversos autores (Goss et al., 1999; Mewes y Ritcher, 2002; García-Mendoza et al., 2005; Sobrino et al., 2005), es necesaria más investigación bajo condiciones de luz solar natural que confirmen los resultados obtenidos en estudios con luz artificial, así como el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el efecto del UVR sobre el XC.

Planteamiento del estudio e hipótesis.

En el presente trabajo se plantea que la fotoinhibición en exposiciones cortas a PAR + UVR se debe principalmente al efecto negativo de la UVR sobre los mecanismos de fotoprotección al PAR, específicamente de la disipación de calor asociada al XC.

Por lo tanto, la hipótesis de trabajo de este estudio es que el daño sobre el PSII por PAR se potencia en la presencia de UVR, ya que este último afecta negativamente la capacidad de respuesta fotoprotectiva de la diatomea *Phaeodactylum tricornutum*.

Objetivo general.

El objetivo general de este estudio es comprobar que la fotoinhibición causada por la UVR en lapsos de tiempo cortos es debida en mayor parte a la disminución de la capacidad fotoprotectora al PAR más que al efecto directo de esta radiación sobre el PSII. Para este fin se plantean los siguientes objetivos:

Objetivos específicos.

- 1.- Confirmar que las exposiciones cortas a PAR+UVR tienen un efecto fotoinhibitorio sobre el PSII de *Phaeodactylum tricornutum*.
- 2.- Caracterizar el efecto de exposiciones cortas a PAR+UVR sobre la disipación de calor y sobre la interconversión de los pigmentos del ciclo XC.
- 3.- Determinar si el efecto del UVR sobre la proteína D1 o sobre la reparación de la misma es mayor o menor que el efecto sobre los mecanismos de fotoprotección.
- 4.- Evaluar la relación entre la fotoinhibición y la disminución de la capacidad fotoprotectora durante exposiciones cortas a PAR + UVR.

II.2. Materiales y Métodos

II.2.1. Cultivos de microalgas.

Los cultivos estáticos de *Phaeodactylum tricornutum* fueron mantenidos en medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962) a condiciones constantes de temperatura (18°C) y con un fotoperíodo de 16:8 hrs (luz-oscuridad) en matraces Erlenmeyer de 500 ml dentro de un incubador digital de cultivos (*Shel lab, Orlando, USA*). Los cultivos fueron aclimatados a dos irradiancias: ALTA LUZ (HL) expuestos a aproximadamente $200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y BAJA LUZ (LL) expuestos a $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionados con lámparas fluorescentes de luz blanca fría. La irradiancia fue medida con un sensor 4π (*Biospherical Instruments, San Diego, USA*), sumergiendo el sensor en el matraz con medio de cultivo. Para todos los experimentos se utilizaron células de cultivos que se encontraban en la fase

exponencial de crecimiento. Las células fueron concentradas por centrifugación a 3000 xg durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en medio F/2 a una densidad final de 7×10^6 cél.ml⁻¹. El cultivo concentrado fue mantenido en las mismas condiciones de aclimatación durante tres horas antes de los tratamientos de exposición. Mediciones de la eficiencia cuántica máxima realizadas en células concentradas por centrifugación antes de iniciar la experimentación, demostraron que no hay diferencias significativas en los valores de F_v/F_m en comparación a cultivos que no fueron concentrados.

II.2.2. Determinación del estado fisiológico de los cultivos.

Cada día de experimentación se determinó el nivel de saturación de luz (E_k) para el cultivo respectivo. Este fue obtenido a partir de curvas de tasa de transporte de electrones (ETR) vs irradiancia medidas con un flouometro tipo Diving PAM (*Heinz Walz, Effeltrich, Germany*). Se colocaron 2 ml de cultivo en una celda con agitación constante y se midió la tasa de flujo de electrones durante 16 minutos para una serie de 24 intensidades de luz actínica proveniente del PAM con un intervalo de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Antes de la exposición a luz actínica se midió la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) de cultivos mantenidos en oscuridad durante 5 minutos. Posteriormente se determinó la fluorescencia mínima (F_0) y máxima (F_m') durante la exposición a cada intensidad de luz. Este procedimiento se realizó por triplicado.

La tasa de transporte de electrones se calculó a partir de la fórmula propuesta por Schreiber et al. (1994) considerando la absorptancia medida cada día para el cultivo respectivo.

$$ETR = E * A * \Delta F / F_m * 0.5 \quad (3),$$

donde E corresponde a la irradiancia de incubación, A es la absorptancia celular, $\Delta F / F_m$ es la eficiencia cuántica efectiva y 0.5 el factor que considera sólo los fotones absorbidos por el PSII.

Se midieron los espectros de absorción desde 400 a 750 nm para cada muestra inmediatamente después de las determinaciones de ETR con un espectrofotómetro (*Aminco DW2-C, USA*) controlado por un sistema de colección de datos OLIS (*USA*). La absorptancia fue calculada como el promedio de la densidad óptica a cada longitud de onda, de acuerdo a la fórmula:

$$A = x (1 - 10^{-OD_i}) \quad (4),$$

donde OD_i es la densidad óptica de cada longitud de onda entre 400 y 700 nm (Kirk, 1994).

Se realizó una relación ETR vs irradiancia para determinar los parámetros ETR máximo (ETR_{max}) y la pendiente de la curva. ETR_{max} se calculó a partir de la media de los cuatro valores máximos y la pendiente mediante una regresión lineal de los primeros valores de la curva. La irradiancia a la que se alcanza P_{max} (intersección con α), es denominada E_k y es usada frecuentemente para describir la irradiancia óptima para la fotosíntesis de una especie determinada; ésta se obtuvo como la razón $ETR_{max} / \text{pendiente}$.

Simultáneamente a la medición de la tasa de transporte de electrones, se determinó la máxima eficiencia cuántica del PSII, calculada como F_v / F_m con un fluorómetro de

medición continua, PEA, Plant Efficiency Analyzer, (*Hansatech Instruments, Norfolk, Inglaterra*), a partir de la medición de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* de muestras previamente adaptadas a la oscuridad durante 10 minutos. Los adquisición de datos del PEA fue de 10 μ s durante los primeros 300 μ s para obtener una alta resolución de la cinética de inducción de la fluorescencia en este intervalo de tiempo.

II.2.3. Cálculo de atenuación del campo de luz.

Con el fin de asegurar que los experimentos llevados a cabo en diferentes días y con distintas aclimataciones no presentaron variabilidad en la dosis de luz debido a la atenuación diferencial del campo lumínico dentro de la celda de exposición, se realizaron mediciones de irradiancia entre los 280 a 800 nm con un radiómetro (*Ocean Optics, Florida, USA*). La fibra óptica del radiómetro se colocó en ángulo recto debajo de una celda de cuarzo con dimensiones de 1cm x 1cm x 4 cm de altura; en la misma se colocaron sucesivamente seis volúmenes diferentes de cultivo en un rango de 0.5 ml a 3 ml. Las muestras se iluminaron con la misma lámpara e intensidad de luz utilizada en los tratamientos de exposición (ver *Experimentos de fotoinhibición*). Se midieron los espectros de irradiancia para cada volumen de muestra y medio de cultivo por triplicado. Dichas mediciones se realizaron para las dos aclimataciones y para dos concentraciones celulares distintas ($\sim 11 \times 10^6$ y 7×10^6 cél.ml⁻¹).

A partir de los cálculos de atenuación del campo de luz a lo largo de los 3 cm de profundidad, se concluyó que no existieron diferencias en la intensidad de luz recibida por HL y LL (Fig. 5a). Sin embargo, en las pruebas realizadas con diferentes densidades celulares, se observó que los cultivos HL control y con DTT, por tener una concentración

celular mayor, recibieron aproximadamente una irradiancia 15% menor que los demás tratamientos (Fig. 5b).

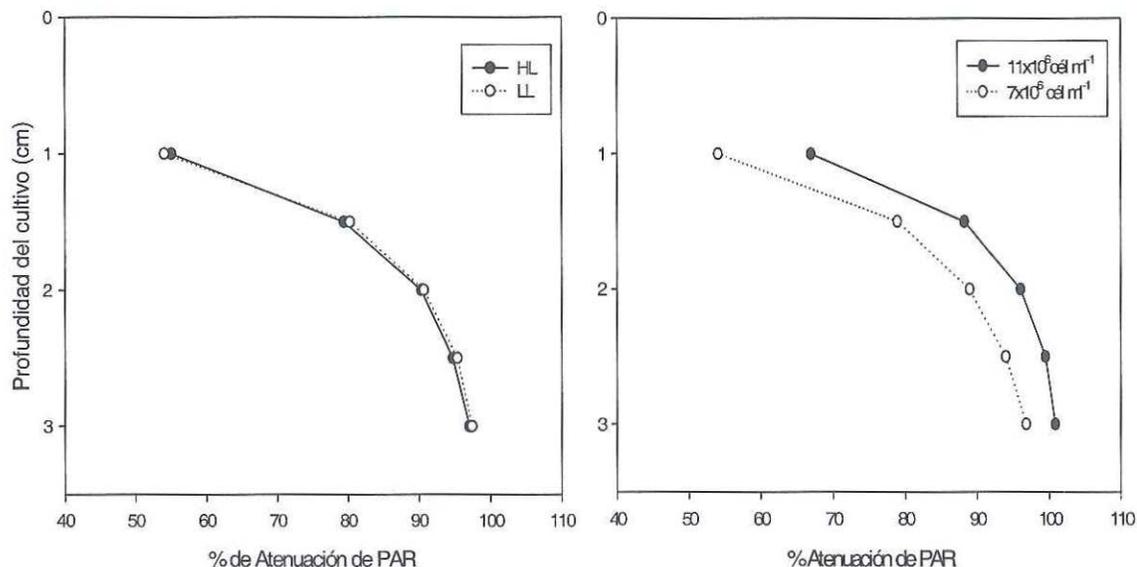


Figura 5 a y b. Atenuación de la irradiancia (200-800 nm) emitida por la lámpara a lo largo del recipiente de exposición con cultivos aclimatados a HL y LL (a) y en cultivos de dos densidades celulares diferentes 11×10^6 y 7×10^6 cél.ml⁻¹ (b). La atenuación se presenta como porcentaje de la irradiancia medida en el recipiente sin cultivo.

II.2.4. Mediciones de la eficiencia cuántica máxima.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron con el PEA. La fluorescencia mínima (F_0) se midió en cultivos aclimatados a oscuridad de 5 a 10 min, con el fin que todos los centros de reacción estuvieran abiertos; la fluorescencia máxima (F_m) fue medida con un pulso de luz saturante de 0.6 s de duración con la finalidad de cerrar todos los centros de reacción. A partir de estos parámetros se calculó la máxima eficiencia cuántica como F_v/F_m , siendo $F_v = F_m - F_0$. Con el fin de obtener estimaciones de F_v/F_m lo más exactas posibles, se realizaron pruebas previas de medición de dicho parámetro con muestras

mantenidas en oscuridad a diferentes períodos de tiempo (5 a 20 min). A partir de dichas mediciones, se determinó que F_v/F_m no varió entre las muestras adaptadas a oscuridad por diferentes lapsos (datos no mostrados).

II.2.5. Experimentos de fotoinhibición.

Las exposiciones se llevaron a cabo con una lámpara de *Xenon* de 1000 W conectada a un suministrador de energía LPS-256 SM (*Spectral Energy, NY, USA*). Se aplicó una misma irradiancia en ambas aclimataciones y en todos los tratamientos de luz e inhibidores; además fueron realizadas a la misma hora para evitar variabilidad en los resultados debido a la fotoperiodicidad de los cultivos.

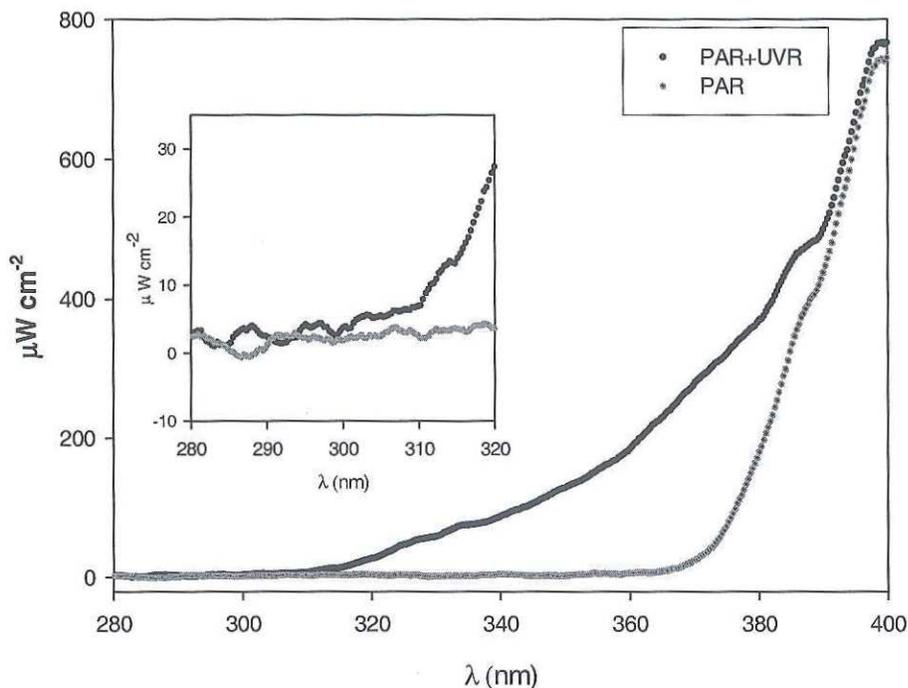


Figura 6. Espectro de radiación de la lámpara de Xenon en la banda de UVR desde 300 a 400 nm medida a través de un acrílico que permite la transmisión del UVR (+UV) y de un acrílico que no permite el paso de gran parte del UVR (-UV). La resolución en la región del UVB se presenta en la figura insertada en el margen izquierdo superior de la figura principal.

Las células fueron expuestas a una irradiancia saturante para ambas aclimataciones, $900 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, la cual representó 3.5 veces el E_k estimado para LL y 2.5 para HL. El tiempo de exposición fue de una hora para los dos tratamientos de luz: **PAR + UVR** (+UVR= $\sim 0.1 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$) y **PAR** (-UVR= $\sim 0.05 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{nm}^{-1}$). Se utilizaron tapas de acrílicos transparente al UVR y opaco al UV-B y parte del UV-A para establecer los tratamientos PAR + UVR y PAR respectivamente. El espectro de UVR recibido en cada uno de los tratamientos se muestra en la Fig 6. Antes de comenzar los tratamientos de exposición, las muestras fueron mantenidas en oscuridad durante 10 minutos y

posteriormente colocadas en tres celdas de acrílico de 30 ml de capacidad. Estas celdas se encontraban conectadas a un sistema cerrado de circulación de agua que permitió mantener una temperatura constante (18°C) por medio de un termocirculador (*Polyscience, IL, USA*). Durante la hora de exposición se tomaron alícuotas de 0.5 ml de cada una de las celdas (triplicado) para determinación de F_v/F_m a los 0, 5, 15, 30 y 60 min. Una vez concluida la exposición, se transportó un volumen de 5 ml de cada réplica al incubador de cultivos donde se mantuvieron en luz tenue (30 μmol cuanta $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Se tomaron 0.5 ml de muestra para la medición de F_v/F_m a los 5, 30, 60, 120 y 180 min de recuperación.

Con el fin de estudiar el efecto del UVR sobre el XC se aplicaron tratamientos con inhibidores. Se utilizó el dithiothreitol (DTT), que bloquea la deepoxidación de los pigmentos XC (Yamamoto y Kamite, 1972) sin inhibir la formación del ΔpH transtilacoidal y cloranfenicol (CAP) que inhibe la síntesis de proteínas codificadas en el cloroplasto (como la proteína D1). Para probar que no existiera un efecto negativo de los inhibidores sobre la actividad fotosintética se realizaron cuatro series de experimentos donde los cultivos se incubaron en luz tenue (30 μmol cuanta $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) durante 15 minutos con: DTT, concentración final 1 mM; CAP, concentración final 100 μM ; DTT+CAP (1mM y 100 μM respectivamente) y sin inhibidor (CONTROL) previamente a la hora de exposición lumínica. La determinación de F_v/F_m antes del período de exposición, demostró que no hubo efectos sobre la eficiencia de separación de cargas en el PSII debidos a la adición de los inhibidores. Asimismo, las concentraciones y tiempos de incubación que se aplicaron demostraron ser efectivos para la inhibición de la enzima Ddx-deepoxidasa en el caso del DTT, deducida a partir de pruebas monitoreando el NPQ durante 15 minutos de exposición. Para el caso del CAP, la concentración usada (100 μM) no presentó un efecto negativo

sobre la actividad fotosintética. Okada, (1991) reportó que una menor o igual a 100 μM , no ocasiona la inhibición directa de la fotosíntesis.

II.2.6. Medición de NPQ.

El monitoreo de la disipación (“quenching”) no fotoquímica (NPQ) se realizó con el fluorómetro de pulsos de amplitud modulada, Diving PAM (*Heinz Walz, Effeltrich, Alemania*). Se probaron diferentes intensidades de luz de medición y duración e intensidad del pulso de saturación, con el fin de asegurar una buena resolución de las mediciones (datos no mostrados). Se colocó la fibra óptica sobre la superficie del cultivo a un ángulo de 60° perpendicular a ésta. Esta geometría óptica se mantuvo durante todas las mediciones por medio de un soporte fijado a las celdas. Se midió la emisión máxima de fluorescencia en condiciones de oscuridad, cuando todos los centros de reacción se encontraban cerrados (F_m) y durante los tratamientos de exposición a luz (F_m'), aplicando un pulso de luz saturante cada 30 segundos. Las mediciones se realizaron por triplicado simultáneamente con la misma fibra óptica que fue movida después de cada pulso saturante a la celda contigua durante la hora de exposición y por una hora en condiciones de recuperación en oscuridad. Para el cálculo del *quenching* no fotoquímico se aplicó la fórmula de Stern-Volmer:

$$\text{NPQ} = (F_m - F_m') / F_m' \quad (5),$$

La tasa de inducción del NPQ (k) fue calculada a partir de una regresión lineal de los primeros 4 valores y el máximo de inducción calculado como el promedio de los valores

máximos. El NPQ se midió en todos los tratamientos descritos en *Experimentos de fotoinhibición*.

II.2.7. Cuantificación de pigmentos.

Las muestras para análisis de pigmentos fueron tomadas antes del tratamiento de exposición y a los 5, 15, 30 y 60 min durante la hora de exposición. Asimismo, se tomaron muestras a los 5, 60 y 180 min posteriores a la exposición (periodo de recuperación). Los muestreos se realizaron simultáneamente a las mediciones de F_v/F_m . El volumen muestreado (0.5 ml) fue filtrado en filtros de fibra de vidrio GF/F de 13 mm de diámetro y éstos congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Los filtros fueron mantenidos a una temperatura de -70°C hasta su análisis. La extracción de los pigmentos fue realizada mediante disrupción mecánica de los filtros utilizando un Mini-Bead Beater (*Biospec Products Inc., OK, USA*) y perlas de zirconia de 0.5 mm de diámetro en 1 ml de acetona al 100% enfriada previamente. El proceso de agitación se realizó a 100 xg en tres períodos de 10 s de duración cada uno intercalados por períodos de 15 min de enfriamiento a -20°C en oscuridad. El homogeneizado fue conservado a -20°C durante 2 hrs en oscuridad. Antes del análisis de las muestras fueron limpiadas por centrifugación a 12000 xg durante 5 min a 4°C y se les añadió tetrabutilo de acetato de amonio (TBAA) a una relación 3 a 1.

La separación y cuantificación de pigmentos fue realizada por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC) de acuerdo a van Heukelem y Thomas (2001), usando metanol:TBAA 28 mM, (70:30, v/v) como solvente A y metanol al 100% como solvente B a un flujo de 1 ml min^{-1} . El perfil de distribución del solvente B fue modificado a (%B, tiempo): 5%, 0 min; 5%, 5 min; 95%, 22 min; 95%, 27 min; 5%, 30 min. Los análisis

fueron realizados a 60°C. El equipo utilizado fue un modelo Shimadzu de la serie AV-10 equipado con una columna de fase reversa Zorbax Eclipse XDBC-8 (150 mm x 4.6 diámetro interno, 3.5 µm de tamaño de partícula). La longitud de onda de detección fue establecida a 436 nm. El control del equipo y el cálculo del área fue llevado a cabo con el software de sistema de datos cromatográficos Shimadzu EZchrom (*Shimadzu Scientific Instruments Inc., MD, USA*).

Para la identificación de los pigmentos, se comparó el tiempo de retención (Tr) de cada pico con el Tr de estándares de pigmentos comerciales. Se usaron los siguientes estándares: chl *a*, fucoxantina, diadinoxantina, diatoxantina, violaxantina, zeaxantina y β-caroteno (*DHI, Water and Environment, Hoersholm, Dinamarca*).

A partir del contenido de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, se calculó el estado de deepoxidación (*DPS*) para cada uno de los dos ciclos que presenta *P. tricornutum*, definido en este trabajo como XC₁ (ciclo de Ddx a Dtx) y XC₂ (ciclo de Vx a Zx). El *DPS* es la proporción del pigmento deepoxidado con respecto al conjunto de pigmentos de cada ciclo:

$$DPS_1 = [Dtx / (Dtx + Ddx)] \quad (6),$$

$$DPS_2 = [(Zx + Ax) / (Zx + Ax + Vx)] \quad (7),$$

La tasa de deepoxidación de la diatoxantina fue calculada a partir de la ecuación (Olaizola et al., 1994):

$$(Dtx_t - Dtx_i) = (Dtx_f - Dtx_i) \cdot \exp^{(k \cdot t)} \quad (8),$$

donde Dtx_i y Dtx_f corresponden a la concentración inicial y final de diadinoxantina respectivamente, t es el tiempo de exposición y k es la tasa de síntesis de diatoxantina.

II.2.8. Análisis de datos.

Las comparaciones estadísticas entre las aclimataciones, los tratamientos de luz y los tratamientos de inhibidores fueron realizadas por medio de una prueba t-Student usando el programa STATISTICA™ y un nivel de significancia de 0.05.

Con el fin de analizar las diferencias entre las cinéticas de inhibición y recuperación de la eficiencia cuántica máxima, se realizó un ajuste exponencial de los datos al modelo matemático de Hanelt (1998), donde se definen dos fases para cada cinética. La cinética de inhibición es descrita por:

$$y_{inh} = P_{rápida} \cdot e^{(-k_{rápida} \cdot t)} + P_{lenta} \cdot e^{(-k_{lenta} \cdot t)} \quad (9),$$

donde,

$$P_{rápida} + P_{lenta} = 1 \text{ a un } t=0.$$

$P_{rápida}$ and P_{lenta} representan las proporciones de la fase rápida y lenta respectivamente y $k_{rápida}$ y k_{lenta} sus respectivas tasas.

La cinética de recuperación es descrita por:

$$y_{rec} = I_{max} - (P_{rápida} \cdot e^{(-k_{rápida} \cdot t)} + P_{lenta} \cdot e^{(-k_{lenta} \cdot t)}) \quad (10),$$

donde y_{rec} es la recuperación de F_v/F_m expresada en porcentaje después de una hora exposición, I_{max} representa el valor de inhibición máximo (en %, después de una hora de exposición a luz saturante).

II.3. Resultados

II.3.1. Estado fisiológico de las microalgas usadas en los experimentos de exposición a UVR.

La relación de la tasa de transporte de electrones vs irradiancia (ETR-E) para cada aclimatación (promedio de tres días consecutivos), fue significativamente diferente entre células aclimatadas a HL y LL (Fig. 7). Esta diferencia se manifestó en los parámetros estimados de la relación ETR-E para cada aclimatación. El ETR_{max} y E_k fueron significativamente más altos (t-Student, $p \leq 0.05$) en todos los días para células aclimatadas a HL. El ETR_{max} alcanzó valores de 48.11 ± 8.62 y de $27.16 \pm 4.04 \mu\text{mol e m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en HL y LL respectivamente, siendo un 44 % mayor en las células aclimatadas a alta luz. Los valores de E_k fueron un 25% más altos en la aclimatación a alta luz, $370 \pm 17.5 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en HL y $276 \pm 14.4 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en LL (ver Anexo, Tabla I).

La diferencia de la fisiología fotosintética entre los dos cultivos indica que las células desarrollaron respuestas aclimatativas diferenciales. Dentro de éstas, los mecanismos de fotoprotección (incremento en pigmentos del XC, mayor capacidad de expresar NPQ, mecanismos de reparación de D1) probablemente están mayormente expresados en las células aclimatadas a HL en comparación con LL. Por lo tanto, se espera

que HL tenga una menor sensibilidad a luz saturante y por lo tanto el UVR tenga efectos diferentes sobre las células aclimatadas a alta luz en comparación a aquellas aclimatadas a baja luz.

A partir de lo anterior, se considera que la experimentación con ambas aclimataciones aportará evidencias del efecto del UVR sobre los mecanismos de fotoprotección debido al desarrollo diferencial de dichos mecanismos en células HL y LL. Asimismo, la variabilidad de los parámetros entre cultivos de una misma aclimatación mostró que no hubo diferencias significativas en el estado fisiológico de los cultivos utilizados en los experimentos en días diferentes (Tabla I, Anexo 1). Por lo tanto, la mayor variabilidad en los resultados de los distintos experimentos posteriores puede atribuirse principalmente a los efectos de los tratamientos de luz e inhibidores y en menor grado a condiciones fisiológicas diferentes de los cultivos utilizados.

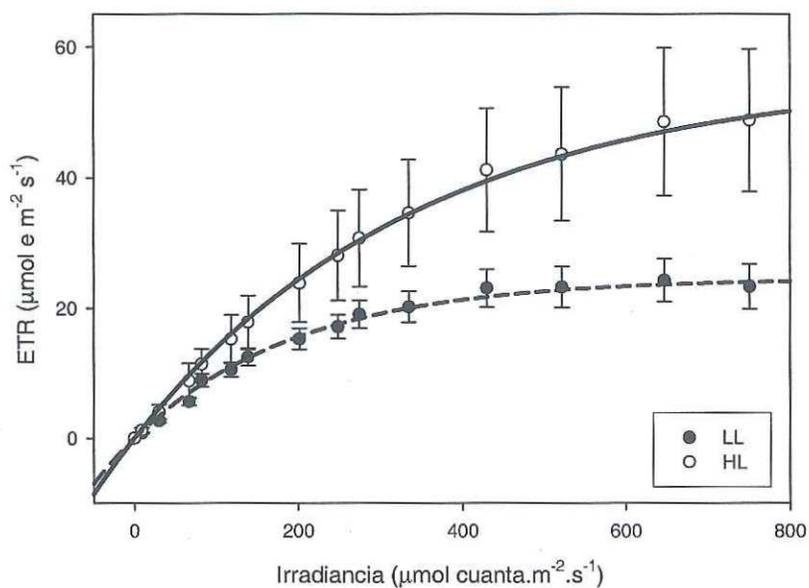


Figura 7. Relación ETR vs irradiancia para cultivos de *Phaeodactylum tricornutum* aclimatados a una irradiancia alta (HL; círculos abiertos) y baja irradiancia (LL; círculos cerrados). Se muestra el promedio y desviación estándar de mediciones hechas para tres cultivos consecutivos para cada irradiancia. Las líneas continuas representan un ajuste de los datos a un modelo exponencial.

II.3.2. Efecto de la exposición a PAR y PAR+UVR en cultivos aclimatados a una irradiancia alta (HL)

II.3.2.1. Efecto sobre F_v/F_m .

Los valores obtenidos de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* pueden considerarse no afectados por variaciones en el contenido de este pigmento, ya que su concentración se mantuvo estable durante todo el tiempo de exposición y de recuperación (datos no mostrados). La eficiencia cuántica máxima del PSII disminuyó en la presencia de luz saturante con un cambio más pronunciado en los primeros minutos de exposición y posteriormente la reducción fue menor sin llegar a un valor constante (Fig. 8a). Este cambio

se puede describir como la suma de dos funciones exponenciales de acuerdo a Hanelt (1998), con una primera fase, rápida y la segunda, lenta. Según Hanelt (1998), la variación en las proporciones de los componentes rápidos y lentos de la reducción de F_v/F_m y las diferencias en sus respectivas tasas indicaría diferentes procesos que podrían estar involucrados en la regulación de la actividad fotosintética. Generalmente, el componente rápido se asocia con mecanismos fotoprotectivos de rápida activación y relajación (segundos a minutos), como los procesos de disipación de calor disparados por el ΔpH , la interconversión de los pigmentos XC y formación de centros de reacción inactivos del PSII. Por otro lado, el componente lento tanto de la inhibición como de la recuperación, está relacionado con procesos más lentos como daño al PSII y reparación del mismo a través de la síntesis *de novo* de la proteínas D1, que se da en minutos a horas (Osmond, 1994).

Las células expuestas a luz saturante presentaron una disminución de F_v/F_m del 42 y del 53% a los 60 min de exposición a PAR y PAR+UVR respectivamente (Fig. 8a). Cuando las células fueron expuestas al espectro total (PAR+UVR), la cinética de cambio de F_v/F_m fue similar al tratamiento PAR. Esto se evidencia por la similitud de los parámetros derivados del ajuste de los datos al modelo de Hanelt (Fig. 8a) que no presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos de luz (t-Student, $p \leq 0.05$) durante la fase rápida exponencial.

Una vez que se omitió el estrés por luz se observó un incremento rápido (recuperación) de F_v/F_m en condiciones de luz tenue (Fig. 8b). La recuperación de esta variable presentó tasas distintas y se puede describir como la suma de dos funciones exponenciales (Hanelt, 1998). La primera describe un proceso rápido de recuperación y se

lleva a cabo principalmente en la primera hora. En el tratamiento PAR se alcanzó un 97% del valor de F_v/F_m medido antes de la exposición a luz estresante (Fig. 8b). En el tratamiento PAR+UVR se observó un porcentaje menor después de una hora en luz tenue (91%), resultado de una tasa menor de recuperación principalmente de el componente rápido de la cinética (Fig. 8b).

En la cinética del cambio de F_v/F_m tanto en condiciones estresantes, como su posterior recuperación en baja luz están integrados procesos asociados en su regulación (*down regulation*) dentro de los cuales, el mecanismo más importante es la disipación de calor. Asimismo, en la cinética del cambio de esta variable se ven reflejados procesos asociados a la inhibición de los PSII's debido al daño fotoquímico. Los resultados muestran un efecto inmediato de la UVR sobre F_v/F_m , reflejado en un porcentaje mayor de disminución de este parámetro durante toda la exposición y en una diferencia en la cinética de recuperación rápida (primera hora en luz tenue). Esto indica que probablemente se está afectando un mecanismo que se induce y disipa en tiempos cortos (disipación de calor).

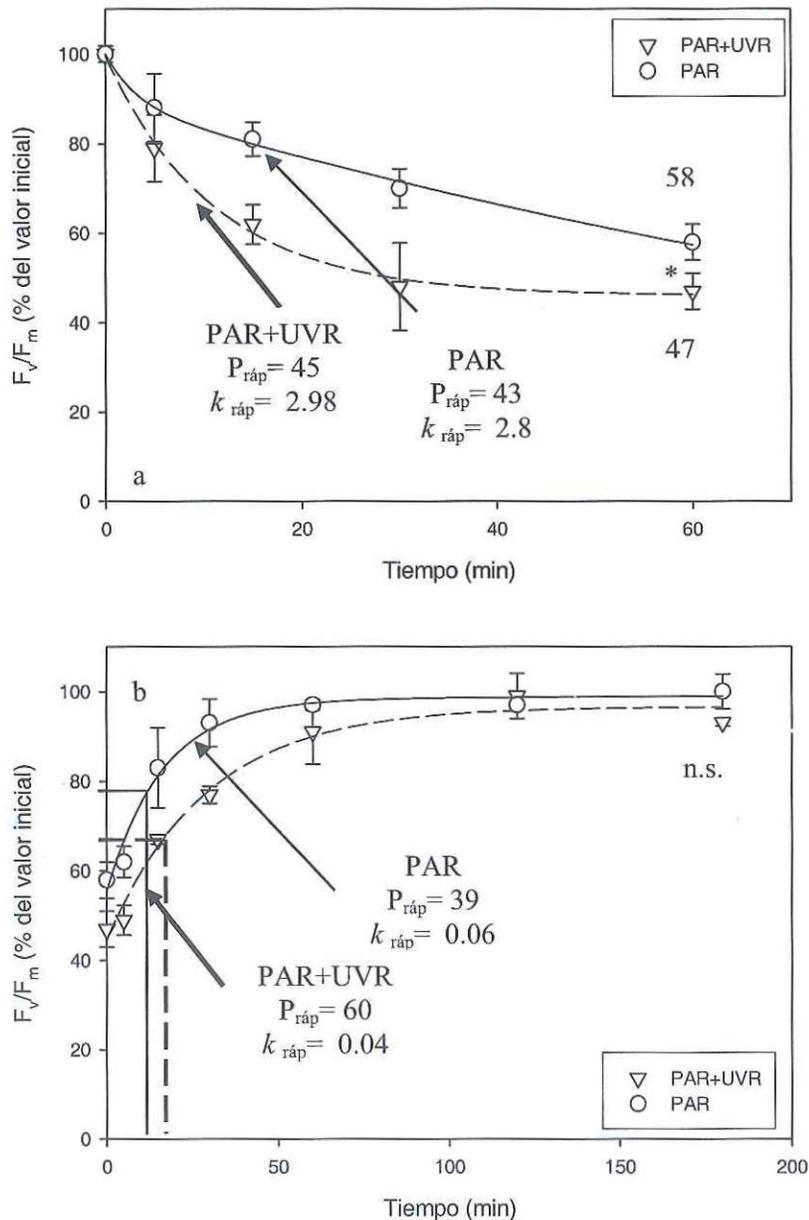


Figura 8 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos y líneas discontinuas) y PAR (círculos y líneas continuas) para células aclimatadas a HL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt. $P_{ráp}$ = % de contribución del componente rápido; $k_{ráp}$ = tasa rápida de inhibición o de recuperación. Los valores presentados a los 60 minutos de exposición representan el porcentaje de F_v/F_m con respecto al valor inicial. Una diferencia en la eficiencia cuántica máxima a los 60 min de exposición entre tratamientos PAR+UVR y PAR a un nivel de significancia de 0.05 se denota por * (prueba t-Student); n.s.: diferencias no significativas.

II.3.2.2. Efecto del UVR sobre los procesos involucrados en la disipación térmica: inducción de NPQ e interconversión de los pigmentos del XC.

El *proxy* para medir la disipación térmica en el aparato fotosintético es el NPQ. La inducción de NPQ fue inmediata en condiciones de luz saturante alcanzando un valor de 2.2 a 2.7 en los primeros tres minutos de exposición. Este valor no se mantuvo constante y se incrementó linealmente con el tiempo de exposición hasta alcanzar un valor máximo entre 3.4 y 3.8 a los 60 minutos (tiempo en que terminó el tratamiento). En obscuridad, después del tratamiento de inducción, casi todo el NPQ formado en el tratamiento de inducción se disipó inmediatamente. Aproximadamente el 9.5% se mantiene y no se disipa completamente en los 60 minutos de recuperación. La cinética de inducción y disipación, así como el valor máximo de NPQ fueron similares en ambos tratamientos de PAR+UVR y PAR (Fig. 9).

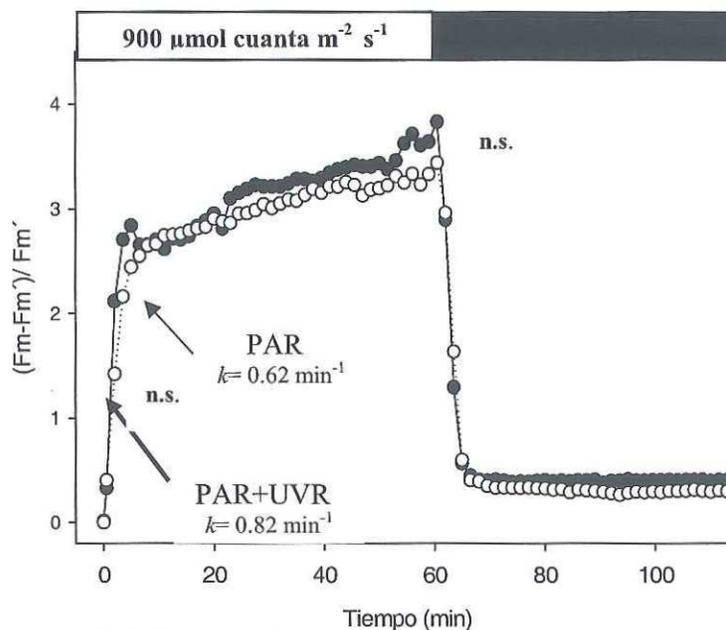


Figura 9. Inducción de la disipación térmica del exceso de energía (*Non photochemical quenching*) en células de *P. tricornutum* expuestas a luz saturante con PAR+UVR (símbolos cerrados) y PAR (símbolos abiertos) y su posterior disipación en oscuridad. Las células fueron aclimatadas a HL. Prueba t-Student entre PAR+UVR y PAR: n.s: diferencias no significativas.

Ya que el XC es un componente importante en la disipación térmica se evaluó el efecto de la UVR sobre la interconversión de los pigmentos involucrados. La tabla II muestra las concentraciones de los pigmentos del XC₁ y XC₂ después de una hora de exposición a luz saturante. La concentración de Ddx después de la hora de exposición no fue diferente a los valores iniciales en los tratamientos PAR+UVR y PAR, pero si fue significativamente diferente entre éstos tratamientos al final de la exposición. Por el contrario, la Dtx aumentó significativamente a los 60 min de exposición pero no se observaron diferencias significativas entre PAR+UVR y PAR en sus concentraciones molares (Tabla II). Sin embargo, cuando se comparó la sumatoria de los pigmentos deepoxidados (Dtx+Zx+0.5*Ax) como el cambio después de una hora de luz saturante con respecto al tiempo cero, se observaron diferencias entre la exposición sin UVR (28.0±0.04

mol*100 mol Chl *a*) y con UVR (20.9±0.01 mol*100 mol Chl *a*). Lo anterior representa un contenido de pigmentos deepoxidados aproximadamente un 25% menor en PAR+UVR (Tabla II).

Tabla II. Cambio en la concentración de de pigmentos del XC1 y XC2 después de una hora de exposición a luz saturante (Δ 60min - 0 min) en células de *P. tricornutum* aclimatadas a HL. Una diferencia significativa entre la concentración del pigmento a los 0 min y 60 min de exposición en luz saturante se denota por asteriscos (*0.05, **0.01 y ***0.001); n.s: diferencias no significativas. En p se muestra la significancia de las diferencias entre los tratamientos PAR+UVR y PAR (t-Student).

| mol*100mol ⁻¹ Chl <i>a</i> | HL Δ 60 min-0 min | | | | | |
|---------------------------------------|--------------------------|----------|-----------|-------|-----------|--------------|
| | Ddx | Dtx | Vx | Ax | Zx | Dtx+Zx+0.5Ax |
| PAR+UVR | -1.2 n.s. | +20.4** | -6.2** | +0.8* | +0.1 n.s. | 20.9** |
| PAR | +4.0 n.s. | +24.3*** | -0.4 n.s. | -0.5* | +2.5* | 28.0** |
| p | * | n.s. | * | ** | * | * |

El estado de deepoxidación (DPS) del XC1 fue de 0.47±0.10 en el tratamiento de PAR y de un 0.39±0.08 en PAR+UVR, sin embargo no existió una diferencia significativa entre los dos tratamientos de luz a los 60 min de exposición (Fig. 10), debido probablemente a la variabilidad dentro de los tratamientos.

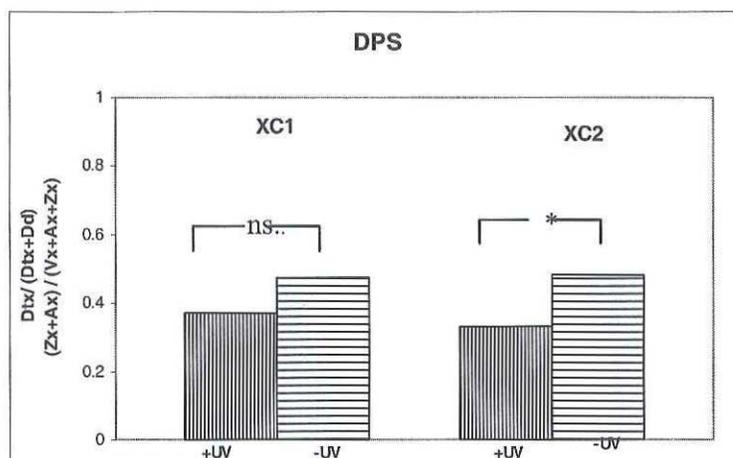


Figura 10. Estado de deepoxidación del ciclo XC₁ y XC₂ a los 60 min de exposición a luz saturante PAR+UVR (+UV) y PAR (-UV) para *P. tricornutum* aclimatada a HL. Las diferencias significativas (t-Student) se denotan con asteriscos; n.s., diferencias no significativas.

Para el ciclo XC₂ (Vx-Ax-Zx), existió una diferencia significativa del DPS a los 60 min de exposición entre tratamientos (t-Student, $p \leq 0.05$). Las células expuestas a PAR+UVR presentaron un DPS de 0.23 y las expuestas a PAR de 0.77 (Fig 6). La diferencia se asoció a una síntesis significativa de Zx en el tratamiento PAR, mientras que en PAR+UVR la síntesis de este pigmento no existió (Tabla IV).

II.3.2.3. Efecto de inhibidores en la expresión de la fotoprotección y fotodaño en exposiciones de luz saturante con y sin UVR.

II.3.2.3.1. Inhibición de la reacción de deepoxidación (inhibidor DTT).

Efecto del DTT sobre F_v/F_m

Al inhibir la síntesis de pigmentos deepoxidados con la adición de DTT se observó que F_v/F_m fue significativamente menor (t-Student, $p \leq 0.05$) que en el control después de

60 min de exposición a luz saturante (Fig. 11a). Esta disminución fue un 20% mayor en los tratamientos con DTT, donde asimismo la tasa de descenso de la máxima eficiencia cuántica durante la fase rápida fue mucho menor (Fig. 11a). Estos resultados indican una inhibición de los mecanismos de fotoprotección por el DTT, causando un mayor descenso de F_v/F_m tanto en presencia como en ausencia de UVR durante la exposición (Fig. 11a). La diferencia en los valores de F_v/F_m entre PAR+UVR y PAR en el tratamiento con DTT es no significativa en la fase rápida de inhibición (Fig. 11a). A los 5 min de exposición la reducción de la eficiencia cuántica máxima es solamente un 2% mayor en PAR+UVR en comparación con PAR en células tratadas con DTT. En comparación, la diferencia entre PAR+UVR y PAR sin inhibidores fue de aproximadamente un 10% (Fig. 11a). Lo anterior se observó de manera más pronunciada a los 15 min, donde F_v/F_m disminuye un 10% más en el tratamiento con UVR en comparación al tratamiento sin UVR. En cambio, en el control sin inhibidores, la diferencia entre los tratamientos PAR+UVR y PAR fue de un 30%. La mayor diferencia de F_v/F_m entre los tratamientos de luz en el tratamiento control (sin inhibidores) a los 5 y 15 min de exposición, indica que la UVR afectó sólo un porcentaje del XC. Lo anterior se ve reflejado en la diferencia con el tratamiento +DTT, donde el XC se inhibe por completo en los primeros 20 minutos. En este último tratamiento, el efecto de la UVR se concentra en la fotoinhibición directa del PSII (balance entre daño y reparación). Sin embargo, en presencia de UVR, no hubo un efecto directo más pronunciado (Fig. 11a).

Cuando las células fueron mantenidas en luz tenue luego del período de luz saturante, la recuperación del F_v/F_m fue significativamente menor en el tratamiento con DTT ($p \leq 0.05$) con respecto al tratamiento sin DTT, tanto en PAR+UVR como en PAR. Lo

anterior se observó en mayor medida en la fase rápida de recuperación (5-15 min). Como ya se mencionó anteriormente, la fase rápida es asociada con los mecanismos regulatorios de fotoprotección. La eficiencia cuántica máxima más baja en dicha fase, y la tasa de recuperación mucho menor (Fig. 11b), indican que al inhibirse por completo la conversión de Dtx a Ddx en los primeros 20 min de exposición, el efecto directo sobre el PSII fue mayor.

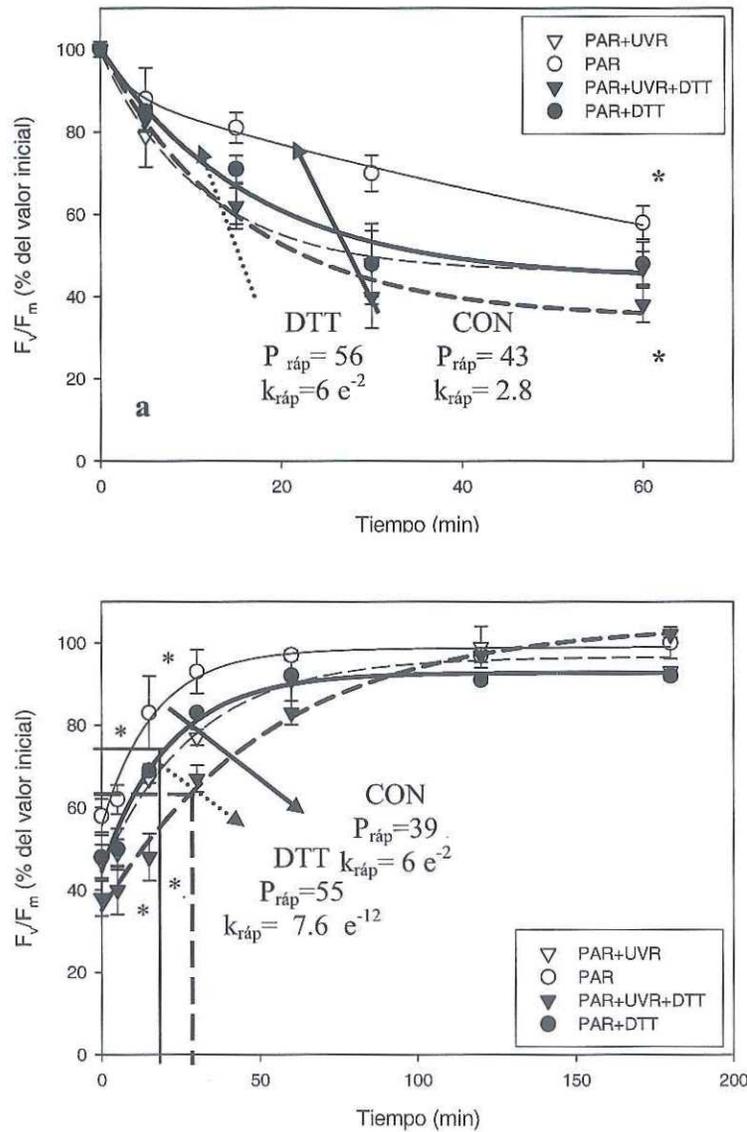


Figura 11 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos y líneas discontinuas) y PAR (círculos y líneas continuas) en el control sin inhibidores (símbolos abiertos) y en el tratamiento +DTT (símbolos cerrados) para células aclimatadas a HL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt (delgadas, control; gruesas, +DTT). $P_{ráp}$ = % de contribución del componente rápido; $k_{ráp}$ = tasa rápida de inhibición o de recuperación. Una diferencia en la eficiencia cuántica máxima a los 60 min de exposición, 5 y 15 minutos de recuperación entre control y tratamiento +DTT a un nivel de significancia de 0.05 se denota por * (prueba t-Student).

Efecto del DTT sobre NPQ

Aunque el DTT no inhibió por completo la inducción de NPQ, si afectó de manera importante la cinética de inducción de esta variable. El DTT inhibió casi por completo la formación de NPQ durante aproximadamente 20 min después de exponer a las células a luz saturante. Posteriormente, existió un incremento de NPQ hasta alcanzar un máximo de 2.9 a los 60 min de exposición en el tratamiento PAR-UVR. Este valor es un 16% menor al medido en células sin DTT (Fig 12). En contraste, en células tratadas con DTT, en presencia de UVR el valor máximo de NPQ fue 1.9, siendo significativamente menor (t-Student, $p \leq 0.05$) comparado con los demás tratamientos (Fig.12).

Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados y a lo reportado para heterokontofitas (Olaizola et al., 1994; Casper-Lindley y Björkman, 1998; García-Mendoza y Colombo-Pallota, 2007), la inhibición de la reacción de deepoxidación bloqueó por completo la formación de NPQ durante los primeros minutos de exposición a luz saturante. Por otro lado, el ascenso del NPQ después de los primeros 20 min, indica que el DTT no inhibió por completo la deepoxidación, lo que se confirma con el aumento del DPS a los 60 min de exposición. Sin embargo, en presencia de UVR, tanto el ascenso del NPQ como el DPS fueron menores (Figs. 12 y 13b).

Durante el período de obscuridad, el NPQ no disipado es debido a la caída de F_m , principalmente por fotoinhibición. Lo anterior concuerda con los valores más altos de NPQ en PAR+UVR durante la hora de recuperación (Fig. 12).

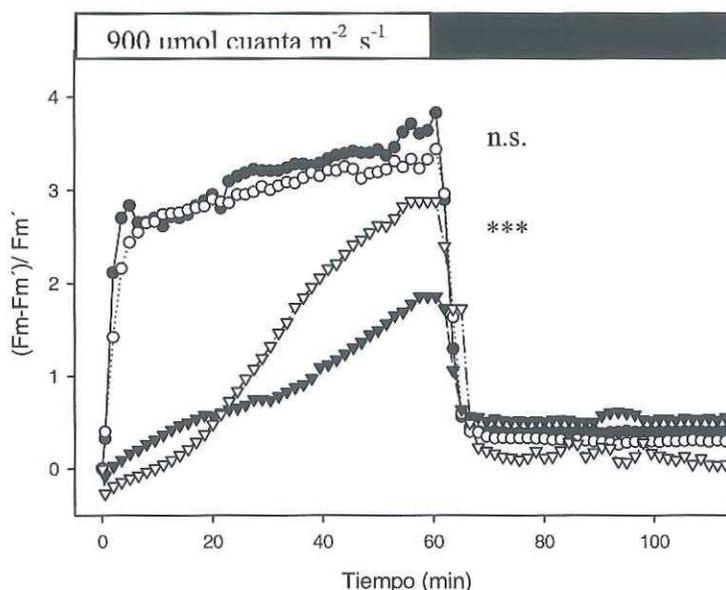


Figura 12. Inducción de la disipación térmica del exceso de energía (*Non photochemical quenching*) en células de *P. tricornutum* expuestas a luz saturante con PAR+UVR (símbolos cerrados) y PAR (símbolos abiertos), en control (círculos) y el tratamiento +DTT (triángulos) y su posterior disipación en oscuridad. Las células fueron aclimatadas a HL. Una diferencia entre el máximo de inducción de los tratamientos PAR+UVR y PAR a un nivel de significancia de 0.05 se denota por * (prueba t-Student); n.s.: diferencias no significativas.

Efecto del DTT sobre la interconversión de los pigmentos del XC

El conjunto de pigmentos XC₁ presentó un aumento de un 19% con UVR y de un 7% sin UVR en el tratamiento +DTT a los 60 min de exposición. Este incremento fue no significativo debido a la variabilidad de las muestras (Fig. 13a). Por otro lado, en células no expuestas a DTT el incremento fue del 70 y 90% en PAR+UVR y PAR respectivamente. Esto indica que la síntesis *de novo* de pigmentos del XC es una respuesta importante para *P. tricornutum* aclimatada a HL y que ésta es inducida en condiciones saturantes de exposición a PAR y PAR+UVR, aunque en esta última condición la síntesis *de novo* es

significativamente (t-Student, $p \leq 0.05$) menor, aproximadamente en un 20%. En ambos tratamientos de luz el DTT inhibió la síntesis *de novo* de pigmentos del XC.

El estado de deepoxidación aumentó desde los primeros minutos de exposición en el control sin inhibidores. En contraste, el DPS no se incrementó en células tratadas con DTT hasta los 60 min de exposición. Los valores de DPS en células con DTT fueron muy bajos después de una hora de exposición (PAR+UVR: 0.05 y PAR: 0.15) y significativamente menores en comparación a los tratamientos control (Fig. 13b). Si se comparan los dos tratamientos de luz en +DTT, aunque no se observaron diferencias en el aumento del DPS en los primeros quince minutos, a los 60 minutos dicho incremento fue un 60% mayor en PAR que en PAR+UVR. Lo anterior podría explicar el mayor aumento de NPQ en dicho tratamiento (Figs. 12 y 13b).

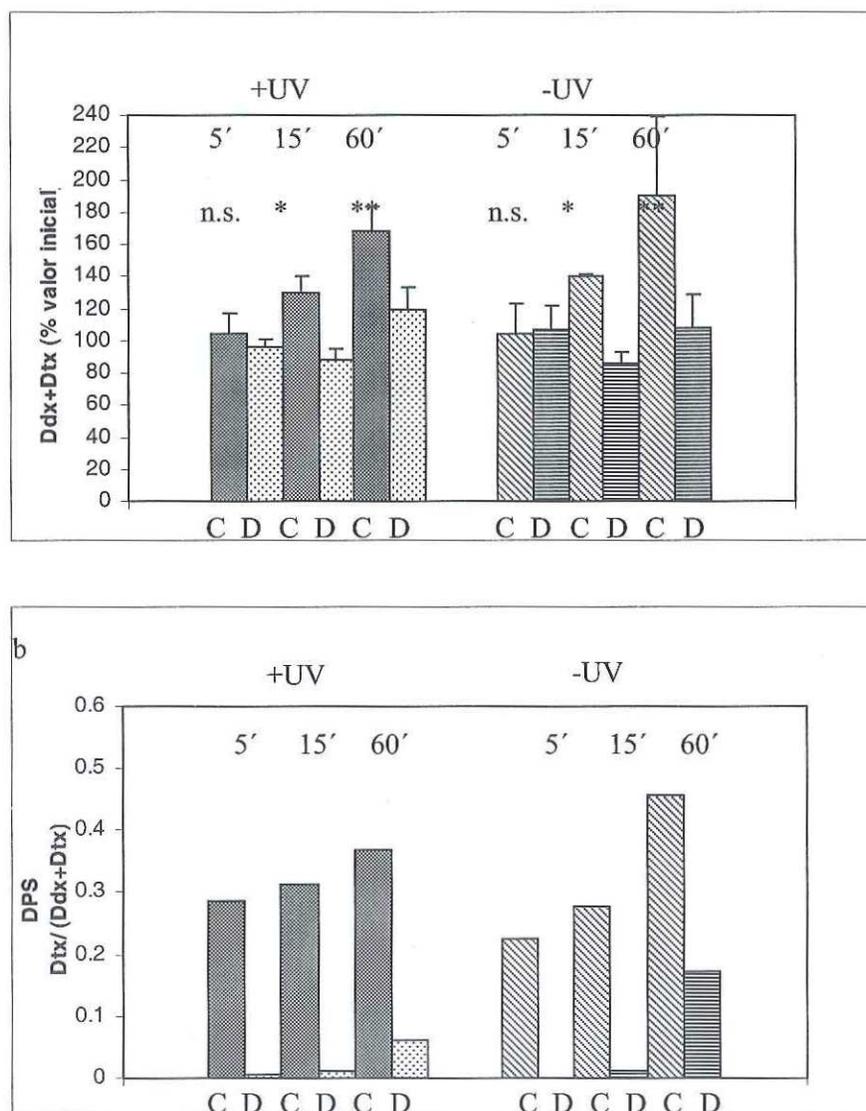


Figura 13 a y b. Comparación del contenido depigmentos del XC_1 (a) y del estado de deepoxidación (DPS) (b), entre el control (C) y el tratamiento +DTT (D) de células de *P. tricorutum* expuestas a a luz saturante con PAR+UVR (+UV) y PAR (-UV) durante 5, 15 y 60 min expresado como % del valor inicial. Las células fueron aclimatadas a HL. Una diferencia significativa en el contenido de pigmentos y/o DPS entre el control y el tratamiento +DTT se denota por asteriscos (*0.05, **0.01 y ***0.001); *n.s.*: diferencias no significativas (prueba t-Student).

II.3.2.3.2. Inhibición de la síntesis de D1 (inhibidor CAP y CAP+DTT).

Efecto sobre F_v/F_m

El tratamiento con CAP resultó en valores de F_v/F_m significativamente menores ($p \leq 0.05$) al control a los 60 minutos de exposición. La eficiencia cuántica máxima disminuyó en un 80% durante la exposición, lo que representa una disminución mayor que en el control de aproximadamente un 40 y 30% para PAR+UVR y PAR respectivamente (Fig. 14a). El CAP asimismo, aumenta la cinética rápida de decaimiento de F_v/F_m , observándose la caída máxima en los primeros minutos de exposición.

Durante el período de recuperación, F_v/F_m alcanzó valores significativamente menores al control después de 60 minutos en luz tenue, siendo aproximadamente un 70 y un 40% menores en los respectivos tratamientos de luz, con y sin UVR (Fig 14-b). Si se compara la recuperación entre los dos tratamientos de luz en presencia de CAP, los valores de máxima eficiencia cuántica fueron un 35% más bajos en el tratamiento PAR+UVR (Fig. 14b). En este último, el CAP inhibió por completo la recuperación rápida de F_v/F_m .

Con el fin de distinguir el efecto debido a la UVR, se calculó la diferencia entre los porcentajes de disminución de F_v/F_m en PAR+UVR y PAR. Se observó que durante la exposición a luz saturante el UVR no produjo un efecto de mayor disminución del F_v/F_m a los 60 minutos de exposición (Tabla III) en células tratadas con CAP, pero sí se observaron diferencias a los 60 min de recuperación.

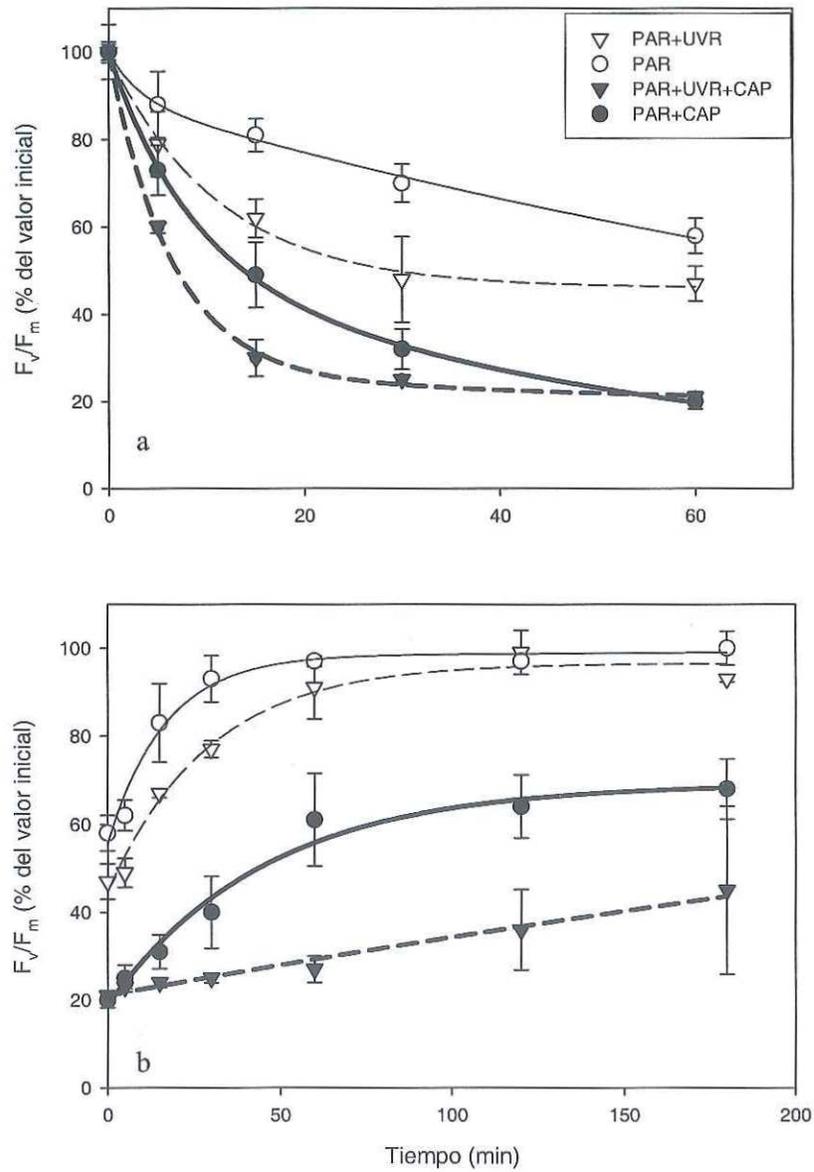


Figura 14 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos, líneas discontinuas) y PAR (círculos, líneas continuas) en el control (símbolos abiertos) y en el tratamiento +CAP (símbolos cerrados) para células aclimatadas a HL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt (delgadas, control y gruesas, +CAP).

Tabla III. Diferencia entre el porcentaje de disminución de la máxima eficiencia cuántica en células de *P. tricornutum* a los 60 min de exposición a alta luz entre el tratamiento PAR+UVR y PAR. Asimismo se presenta la diferencia después de 60 min de recuperación en luz tenue para el control y los tratamientos +DTT, +CAP y +DTT + CAP en HL.

| % de reducción de F_v/F_m debido exclusivamente a la UVR | HL | | | |
|--|---------|-----|-----|---------|
| | CONTROL | DTT | CAP | DTT+CAP |
| 60 min de exposición | -11 | -10 | 1 | -8 |
| 60 min de recuperación | -6 | -9 | -34 | -13 |

La adición de una combinación de ambos inhibidores (CAP+DTT), produjo una disminución del F_v/F_m un 40% mayor que en el control ($p \leq 0.05$) a los 60 min de exposición tanto a PAR+UVR como a PAR (Fig. 15a). Durante el período de luz tenue, la recuperación fue un 75% menor que en el control en ambos tratamientos de luz (Fig. 15b). Este efecto se puede atribuir al daño directo del UVR sobre el PSII en ausencia de fotoprotección (XC) y de reparación (D1).

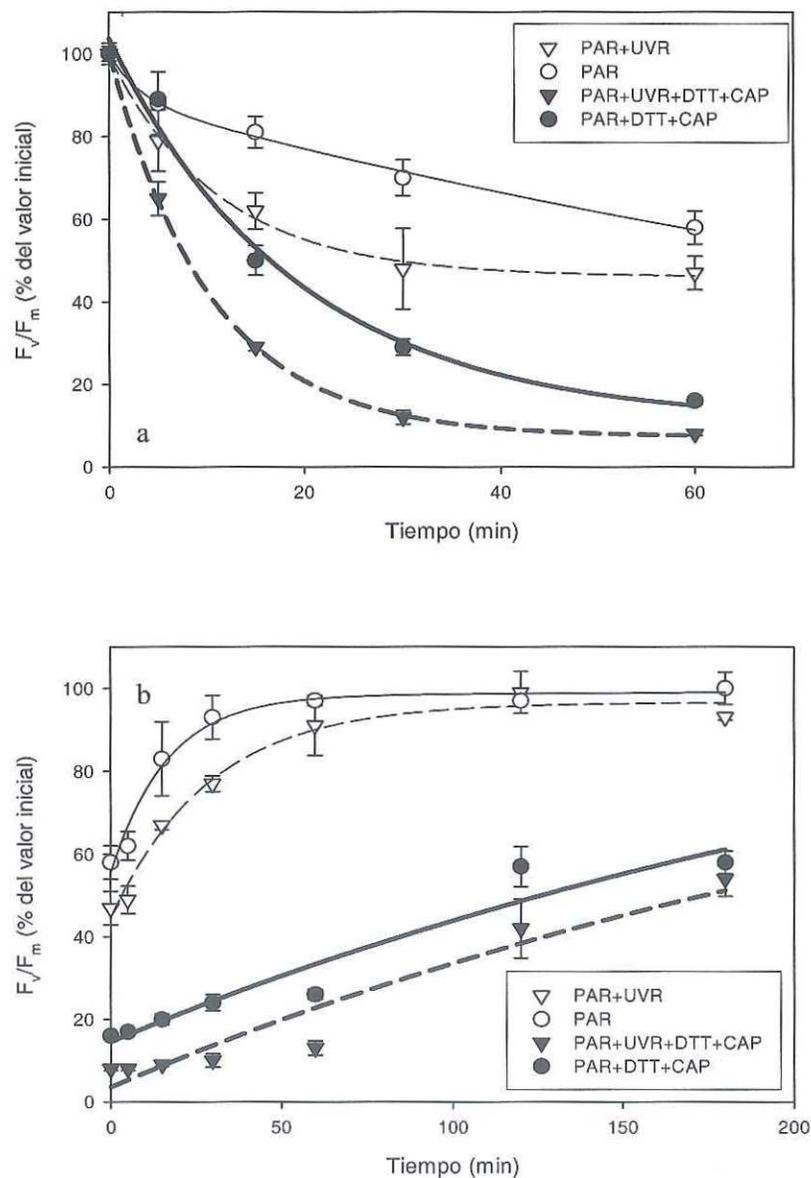


Figura 15 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos, líneas discontinuas) y PAR (círculos, líneas continuas) en el control (símbolos abiertos) y en el tratamiento +DTT+CAP (símbolos cerrados) para células aclimatadas a HL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt (delgadas, control y gruesas, +DTT+CAP). $P_{ráp}$ = % de contribución del componente rápido.

Efecto sobre NPQ

La cinética de inducción de NPQ demuestra que con CAP hay una expresión similar al control en las exposiciones a PAR (Fig. 16a). Esto indicaría que la síntesis de pigmentos fotoprotectores no se vio significativamente afectada por el CAP en dicho tratamiento de luz. Sin embargo, los valores máximos de NPQ con la adición de CAP, son significativamente más altos que el control durante la exposición a PAR+UVR (4.8 y 3.8 respectivamente) y no hay relajación en el período de recuperación (Fig. 16a). Lo anterior se puede asociar a la reducción de F_m debido al daño del PSII y a la inhibición de la recuperación del mismo. Los valores máximos de inducción de NPQ en PAR+UVR fueron aproximadamente un 50% mayores que en PAR. Esta diferencia entre los tratamientos de luz con CAP, puede ser debido al efecto de la UVR sobre la disipación térmica, lo que ocasiona un mayor daño al PSII por disminución de la fotoprotección.

En +DTT+CAP la inducción de NPQ, ocurrió a partir de los 20 min en ambos tratamientos de luz, debido al efecto del DTT. En este tratamiento se observó un patrón similar que en CAP (Fig 16b), en PAR+UVR, valores máximos significativamente mayores que en el control y en PAR similares al control. Asimismo, el NPQ máximo en la exposición con UVR fue aproximadamente un 50% mayor que en el tratamiento sin UVR. Lo anterior confirmaría que el bloqueo del XC disminuye la fotoprotección, por lo que el ascenso del NPQ se debería al efecto negativo del UVR sobre el PSII debido a falta de protección y reparación.

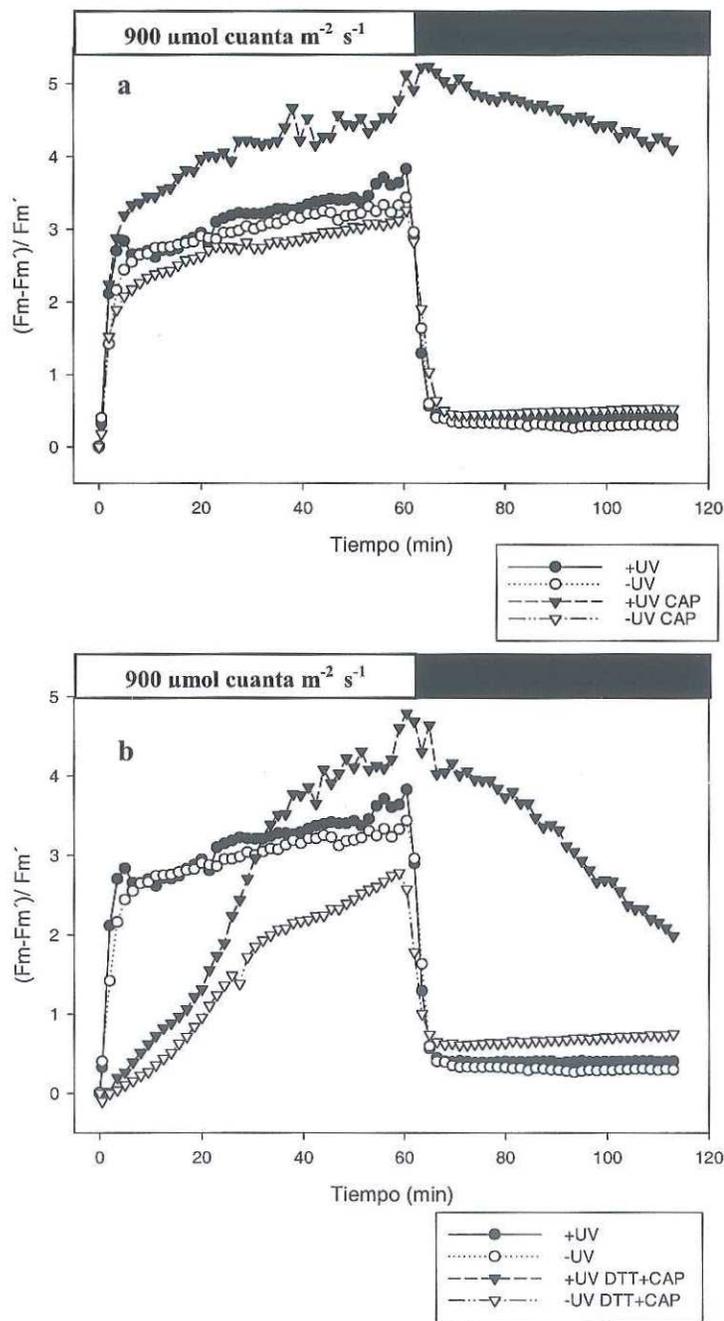


Figura 16 a y b. Inducción de la disipación térmica del exceso de energía (*Non photochemical quenching*) en células de *P. tricoratum* expuestas a luz saturante con PAR+UVR (símbolos cerrados) y PAR (símbolos abiertos), en (a) control (círculos) y tratamiento +CAP (triángulos), (b) control (círculos) y tratamiento +DTT+CAP (triángulos) y su posterior disipación en oscuridad. Las células fueron aclimatadas a HL.

II.3.2.4. Resumen de resultados HL.

- El efecto del UVR sobre F_v/F_m , se reflejó en una mayor disminución de este parámetro durante toda la exposición y en una tasa más baja de recuperación rápida (Fig. 8).
- No se observaron diferencias significativas en los valores máximos de NPQ ni DPS_1 entre PAR+UVR y PAR (Figs. 9 y 10), pero sí en la producción total de pigmentos deepoxidados ($D_{tx}+Z_x+0.5*A_x$) a los 60 min de exposición (Tabla II).
- La variación del contenido de diatoxantina a la hora de exposición no fue diferente entre los tratamientos con y sin UVR, pero sí el cambio de concentración del resto de los pigmentos del XC (Tabla II).
- En +DTT no hubo diferencias significativas en los valores de F_v/F_m entre PAR+UVR y PAR en los primeros 15 minutos de exposición (Fig. 11).
- Después de 20 minutos de exposición a PAR+UVR con adición de DTT, los valores máximos de NPQ y el DPS fueron menores que en PAR, probablemente porque el DTT ya no fue efectivo en el bloqueo de la deepoxidación (Figs. 12 y 13b).
- La recuperación de la máxima eficiencia cuántica en +CAP fue menor al control sin inhibidores. Los valores de recuperación de F_v/F_m fueron un 35% menores en el tratamiento PAR+UVR que en PAR, lo que indica un mayor daño del PSII (Fig. 14b).
- Lo anterior se confirmó en NPQ del tratamiento +CAP, donde el daño al PSII fue evidente en +UVR (Fig 16a).

II.3.3. Efecto de la exposición a PAR y PAR+UVR en cultivos aclimatados a una irradiancia baja (LL)

II.3.3.1. Efecto sobre F_v/F_m .

Los valores obtenidos de la emisión de fluorescencia de la clorofila *a* pueden considerarse no afectados por variaciones en el contenido de este pigmento, ya que su concentración se mantuvo estable durante todo el tiempo de exposición y de recuperación (datos no mostrados). La eficiencia cuántica máxima mostró una disminución durante el período de exposición con un descenso más marcado en los primeros minutos (Fig. 17a). Las células expuestas presentaron una disminución del 64 y del 78% a los 60 min de exposición a PAR y PAR+UVR respectivamente (Fig. 17a). Las diferencias en las máximas eficiencias cuánticas observadas entre las exposiciones con y sin UVR fueron significativas (t-Student, $p \leq 0.05$). Respecto a la cinética de cambio de F_v/F_m , no se observaron diferencias significativas (t-Student, $p \leq 0.05$) entre los tratamientos de luz en los parámetros de la fase rápida derivados del ajuste del modelo de Hanelt (Fig. 17a).

Después de 60 min en luz tenue, las células mostraron una recuperación del 82 y 91% de F_v/F_m con respecto al valor inicial en los tratamientos PAR+UVR y PAR respectivamente, siendo la diferencia entre los tratamientos de luz significativa (t-Student, $p \leq 0.05$). Asimismo, la tasa de recuperación rápida fue significativamente mayor en el tratamiento sin UVR (Fig. 17b). Estos resultados demuestran que el UVR tuvo un efecto negativo sobre la eficiencia máxima del PSII, que se vio reflejado tanto en condiciones estresantes de luz como en la posterior recuperación en luz tenue.

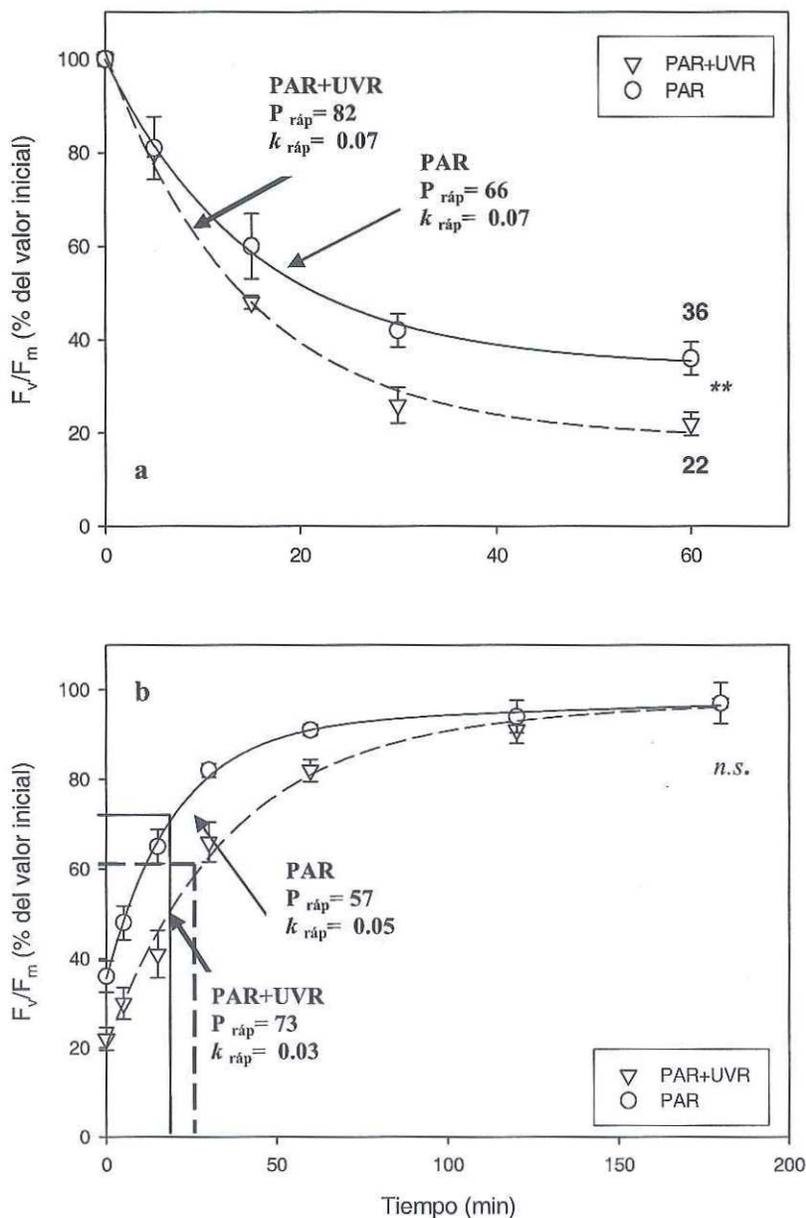


Figura 17 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos y línea discontinua) y PAR (círculos y línea continua) para células aclimatadas a LL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanclt. $P_{\text{ráp}}$ = % de contribución del componente rápido; $k_{\text{ráp}}$ = tasa rápida de inhibición o de recuperación. Los valores presentados a los 60 minutos de exposición representan el porcentaje de F_v/F_m con respecto al valor inicial. Una diferencia en la eficiencia cuántica máxima a los 60 min de exposición entre tratamientos PAR+UVR y PAR a un nivel de significancia de 0.01 se denota por ** (prueba t-Student); n.s.: diferencias no significativas.

II.3.3.2. Efecto del UVR sobre los procesos involucrados en la disipación térmica: inducción de NPQ e interconversión de los pigmentos del XC.

La inducción de NPQ fue inmediata en condiciones de luz saturante alcanzando un valor de 1.9 a 2.2 en los primeros cinco minutos de exposición y aumentando hasta un valor máximo promedio de 3.45. El valor máximo de NPQ a la hora de exposición fue significativamente mayor (t-Student, $p \leq 0.05$) en PAR+UVR (3.85 vs 3.05) en comparación a PAR, aunque las tasas de inducción no presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos de luz (Fig. 18).

Durante el período de recuperación, no todo el NPQ formado en el tratamiento de inducción se disipó. Aproximadamente el 23 y 15% se mantuvo y no se disipó por completo durante los 60 minutos de recuperación en los tratamientos con y sin UVR respectivamente (Fig. 18). La menor disipación del NPQ en presencia de UVR, resulta de los valores de F_m 10% más bajos en PAR+UVR en comparación a PAR. Lo anterior podría ser atribuido a un mayor daño en el PSII en UVR. Sin embargo, los valores de F_0 presentaron un aumento similar en ambos tratamientos de luz durante la hora de recuperación en comparación al tiempo cero (16 a 19% más altos). La cinética de inducción fue similar entre los dos tratamientos de luz, sin embargo el valor máximo de NPQ y la cinética de disipación fueron diferentes (Fig. 18).

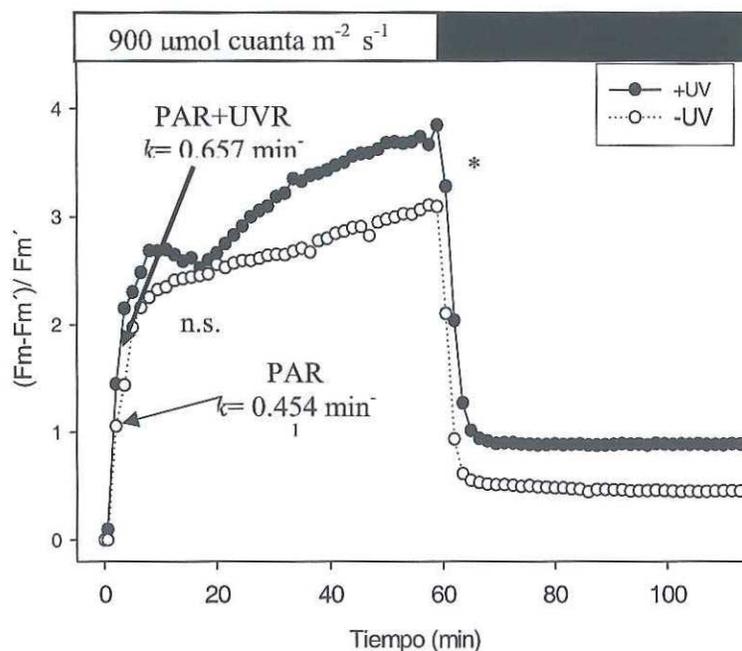


Figura 18. Inducción de la disipación térmica del exceso de energía (*Non photochemical quenching*) en células de *P. tricornutum* expuestas a luz saturante con PAR+UVR (símbolos cerrados) y PAR (símbolos abiertos) y su posterior disipación en oscuridad. Las células fueron aclimatadas a LL. Una diferencia entre el máximo de inducción de los tratamientos PAR+UVR y PAR a un nivel de significancia de 0.05 se denota por * (prueba t-Student); n.s.: diferencias no significativas.

Con el fin de conocer el efecto de la UVR sobre la interconversión de los pigmentos del XC, se analizó el contenido de los pigmentos del XC₁ y XC₂ después de una hora de exposición a luz saturante (Tabla IV). Después de la hora de exposición, no hubo diferencias significativas de la concentración de Ddx con respecto al contenido inicial. Asimismo, no existió una diferencia en el contenido de este pigmento entre los tratamientos de luz. Por otro lado, la concentración de Dtx aumentó significativamente a los 60 min de exposición, aunque no mostró diferencias significativas entre las exposiciones a PAR+UVR y PAR (Tabla IV). Sin embargo, el contenido de pigmentos deepoxidados total

($D_{tx}+Z_x+0.5*A_x$) mostró diferencias significativas entre PAR+UVR (17.2 ± 1.2 mol*100 mol Chl *a*) y PAR (19.6 ± 0.4 mol*100 mol Chl *a*). Por otro lado, en el ciclo de XC₂, la Z_x aumenta en ambos tratamientos, llegando a valores significativamente mayores a los 60 min de exposición en el tratamiento PAR (Tabla IV).

Tabla IV. Cambio en la concentración de pigmentos del XC₁ y XC₂ después de una hora de exposición a luz saturante ($\Delta 60\text{min} - 0\text{min}$) en células de *P. tricornutum* aclimatadas a LL. Una diferencia significativa entre la concentración del pigmento a los 0 min y 60 min de exposición en luz saturante se denota por asteriscos; *n.s.*: diferencias no significativas. En *p* se muestra la significancia de las diferencias entre los tratamientos PAR+UVR y PAR (t-Student).

| mol*100 mol ⁻¹ Chl <i>a</i> | LL $\Delta 60\text{ min} - 0\text{ min}$ | | | | | |
|---|--|----------|---------|------------------|--------|----------------|
| | Ddx | Dtx | Vx | Ax | Zx | [Dtx+Zx+0.5Ax] |
| PAR+UVR | 1.8 n.s. | +15.6** | -3.2*** | -1.3 n.s. | +0.5* | +17.2** |
| PAR | -6.0 n.s. | +16.7*** | +0.3* | -0.8 <i>n.s.</i> | +1.4** | +19.6** |
| <i>p</i> | n.s. | n.s. | * | n.s | ** | * |

El estado de deepoxidación (DPS) del XC₁ a los 60 min de exposición fue significativamente diferente (t-Student, $p\leq 0.05$) entre PAR+UVR y PAR (0.41 ± 0.01 y 0.50 ± 0.06 respectivamente). En el ciclo XC₂ ($V_x-A_x-Z_x$), no se observaron diferencias significativas en el DPS entre los tratamientos de luz a los 60 min de exposición. Las células expuestas a PAR+UVR presentaron un DPS de 0.27 ± 0.02 y las expuestas a PAR de 0.28 ± 0.05 (Fig 19). Sin embargo, el contenido de Z_x aumenta en ambos tratamientos de luz, llegando a concentraciones significativamente más altas en PAR (Tabla IV).

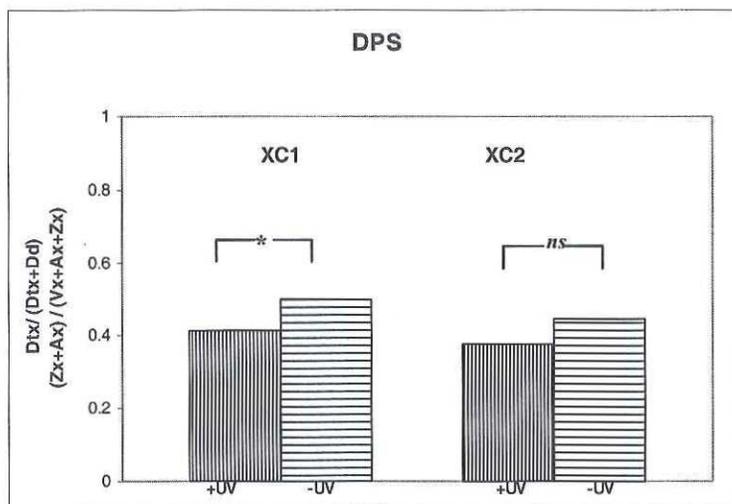


Figura 19. Estado de deepoxidación del ciclo XC₁ y XC₂ a los 60 min de exposición a luz saturante PAR+UVR (+UV) y PAR (-UV) para *P. tricorutum* aclimatada a LL. Las diferencias significativas (t-Student) se denotan con asteriscos; n.s., diferencias no significativas.

II.3.3.3. Efecto de inhibidores en la expresión de la fotoprotección y fotodaño en exposiciones de luz saturante con y sin UVR.

II.3.3.3.1. Inhibición de la reacción de deepoxidación (inhibidor DTT).

Efecto del DTT sobre F_v/F_m

La adición de DTT, no produjo efectos significativos en relación al control sin inhibidores a los 60 min de exposición (Fig. 20a). Esto se ve reflejado en la similitud de la proporción y tasa del componente rápido entre el control y el tratamiento +DTT durante la inhibición (Fig. 20a). Estos resultados indicarían que inhibición de los mecanismos de fotoprotección por el DTT no tiene un impacto tan importante en esta aclimatación.

La diferencia en los valores de F_v/F_m entre PAR+UVR y PAR en el tratamiento con DTT es significativa durante todo el período de exposición a partir de los 15 min (Fig 11a), con valores aproximadamente un 25% menores en el tratamiento con UVR. Por otro lado, en el control la diferencia entre los tratamientos de luz fue aproximadamente de un 15%.

Después de una hora en luz tenue, la recuperación de F_v/F_m no presentó diferencias significativas (t-Student, $p \leq 0.05$) entre el control y el tratamiento +DTT en ninguno de las dos exposiciones, ni en PAR ni en PAR+UVR (Fig. 20b). Durante la fase rápida de recuperación (5-15 min), no se observaron diferencias entre control sin inhibidores y +DTT en la tasa de recuperación. La similitud de la eficiencia cuántica máxima y la tasa de recuperación entre el control y +DTT durante la recuperación, indican que bloquear la conversión de Dtx a Ddx no fue un factor importante en la exposición de las células tanto a PAR como a PAR+UVR.

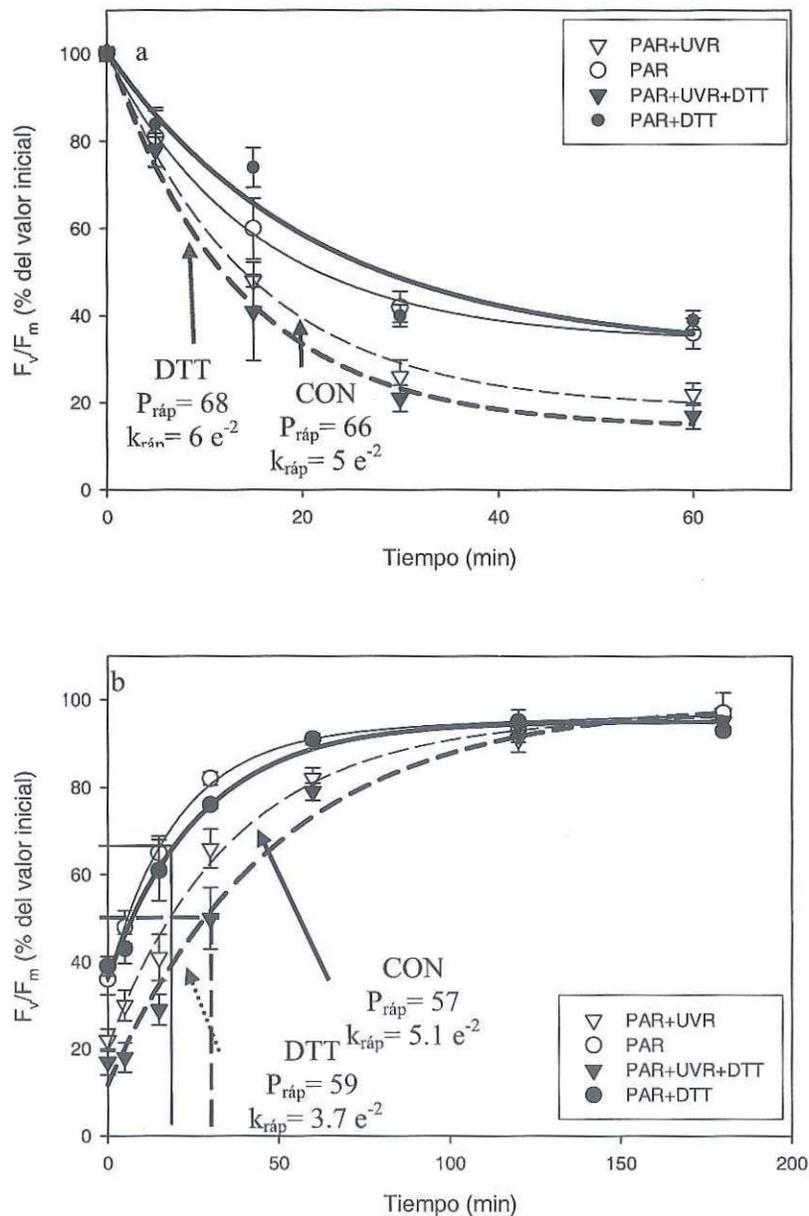


Figura 20 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos y línea discontinua) y PAR (círculos y línea continua) en el control (símbolos abiertos) y en el tratamiento +DTT (símbolos cerrados) para células aclimatadas a LL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt (delgadas, control y gruesas, +DTT). $P_{ráp}$ = % de contribución del componente rápido; $k_{ráp}$ = tasa rápida de inhibición o de recuperación; k_{lenta} = tasa lenta de inhibición.

Efecto del DTT sobre NPQ

El DTT no inhibió por completo la inducción de NPQ. En el tratamiento PAR se detectó un NPQ de 3.0 a los 60 min de exposición. Este valor es comparable al medido en células sin DTT (3.05). Sin embargo, existió una clara diferencia en la cinética de inducción ya que con DTT la formación de NPQ es significativa solo después de 20 min del comienzo del tratamiento de exposición (Fig. 21). A diferencia del tratamiento sin UVR, cuando las células fueron expuestas a PAR+UVR, el valor máximo de NPQ fue significativamente más bajo (t-Student, $p \leq 0.05$) comparado con los demás tratamientos (Fig.21).

Por lo tanto, la inhibición de la reacción de deepoxidación afectó parcialmente la inducción de NPQ (antes de los 20 min de exposición) y el efecto negativo fue mayor en presencia de UVR.

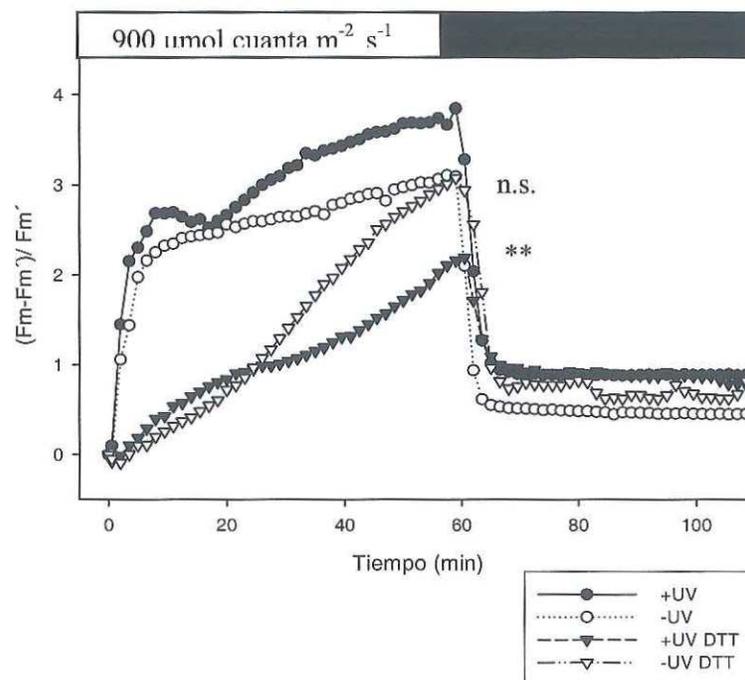


Figura 21. Inducción de la disipación térmica del exceso de energía (*Non photochemical quenching*) en células de *P. tricornutum* expuestas a luz saturante con PAR+UVR (símbolos cerrados) y PAR (símbolos abiertos), en control (círculos) y el tratamiento +DTT (triángulos) y su posterior disipación en oscuridad. Las células fueron aclimatadas a LL. Una diferencia entre el máximo de inducción de los tratamientos PAR+UVR y PAR a un nivel de significancia de 0.01 se denota por ** (prueba t-Student); n.s: diferencias no significativas.

Efecto del DTT sobre la interconversión de los pigmentos del XC

El conjunto de pigmentos XC₁ no presentó un aumento significativo en ninguno de los dos tratamientos de luz con la adición de DTT a los 60 min de exposición. Por otro lado, en el control se observó un incremento significativo del 37 y 48% en PAR+UVR y PAR respectivamente (Fig. 22a). El aumento del conjunto de pigmentos de XC se debió a la síntesis *de novo* de estos pigmentos, lo cual se da en ambos tratamientos de luz, mientras que en células tratadas con el DTT no ocurrió esta síntesis.

El estado de deepoxidación aumentó desde los primeros minutos de exposición en el tratamiento sin inhibidores, mientras que con DTT no se detectó un cambio significativo. Los valores de DPS medidos con +DTT fueron muy bajos (0.03 y 0.11) y significativamente menores que los del control en un 90 y 60% para los tratamientos PAR+UVR y PAR respectivamente (Fig. 22b). Si se comparan los dos tratamientos de luz, aunque no se observaron diferencias en el aumento del DPS en los primeros quince minutos en las células tratadas con DTT, a los 60 minutos dicho incremento fue un 75% mayor en PAR comparado con PAR+UVR. Lo anterior podría explicar el mayor aumento de NPQ en dicho tratamiento (Figs. 21 y 22b).

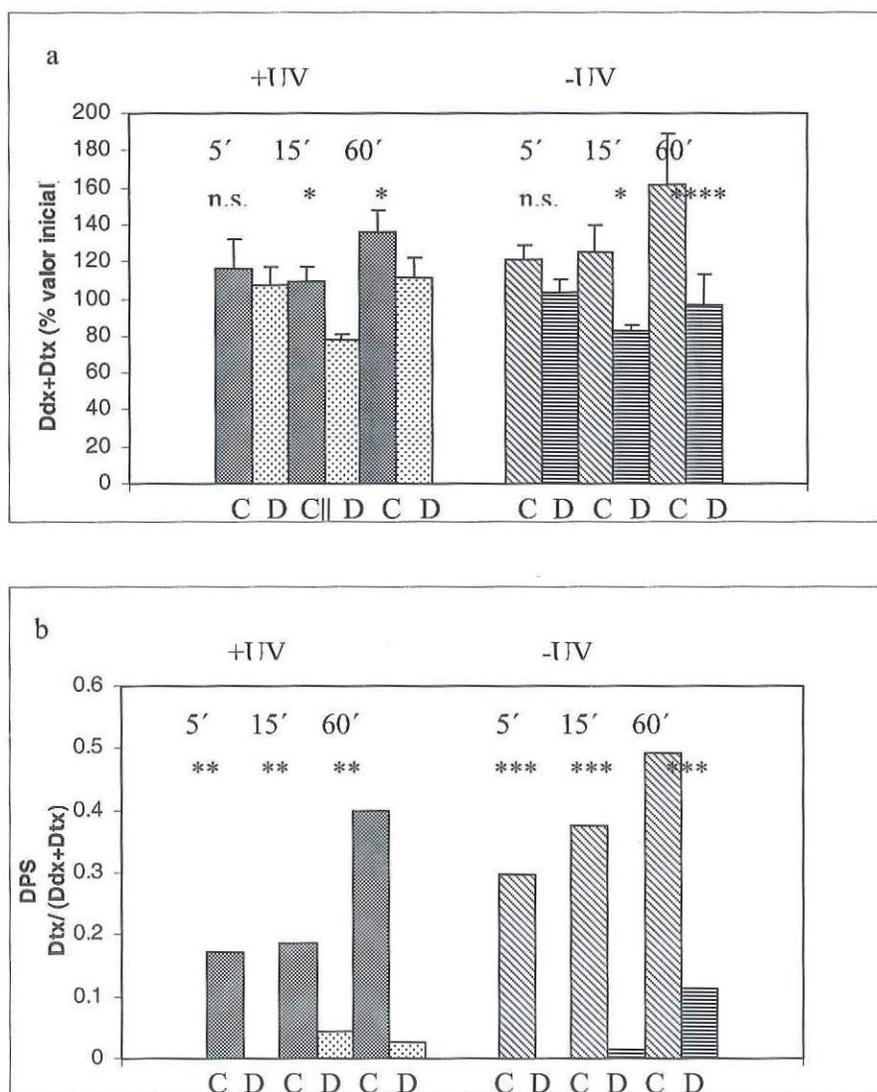


Figura 22 a y b. Comparación del contenido de pigmentos del XC₁ (a) y del estado de deepoxidación (DPS), (b) entre el control (C) y el tratamiento +DTT (D) de células de *P. tricorutum* expuestas a luz saturante con PAR+UVR (+UV) y PAR (-UV) durante 60 min expresado como % del valor inicial. Las células fueron aclimatadas a LL. Una diferencia en el contenido de pigmentos y/o DPS entre el control y el tratamiento +DTT a un nivel de significancia de 0.05 se denota por *; a 0.01 por **, a 0.001 por ***; n.s.: diferencias no significativas (prueba t-Student).

II.3.3.3.2. Inhibición de la síntesis de D1 (inhibidor CAP y CAP+DTT).

Efecto sobre F_v/F_m

La inhibición de la reparación de la proteína D1 resultó en valores de F_v/F_m significativamente menores (t-Student, $p \leq 0.05$) al control en el tratamiento PAR+UVR, presentando una caída de un 10% mayor que el control después de una hora de exposición (Fig. 23a). El decaimiento de la eficiencia cuántica del PSII fue máxima en los primeros minutos de exposición. Por otro lado, en la exposición a PAR, la respuesta no fue la esperada, ya que los valores de F_v/F_m fueron significativamente mayores en +CAP que en el control a partir de la media hora de exposición (Fig. 23a).

Durante el período de recuperación, F_v/F_m en células tratadas con CAP, alcanzó valores significativamente menores al control en el tratamiento con UVR después de 60 minutos en luz tenue, siendo su recuperación un 40% más baja que en el control (Fig. 23a). Si se compara la recuperación entre los dos tratamientos de luz en presencia de CAP, los valores de máxima eficiencia cuántica fueron un 50% más bajos en el tratamiento PAR+UVR (Fig. 14b). Esta diferencia tan grande probablemente se deba a que en el tratamiento PAR, el CAP no inhibió la recuperación de F_v/F_m . Aún cuando la recuperación fue significativamente más lenta y menor al control, se observó un aumento importante con el tiempo de F_v/F_m . Lo anterior probablemente se debió a que el inhibidor no funcionó al 100%. Por lo tanto, sólo fue posible comparar la exposición PAR+UVR del tratamiento +CAP con el control. A partir de dicha comparación, se observó que cuando la síntesis de D1 es inhibida, la UVR tiene un efecto significativo en el descenso de F_v/F_m durante la exposición, así como en la menor recuperación.

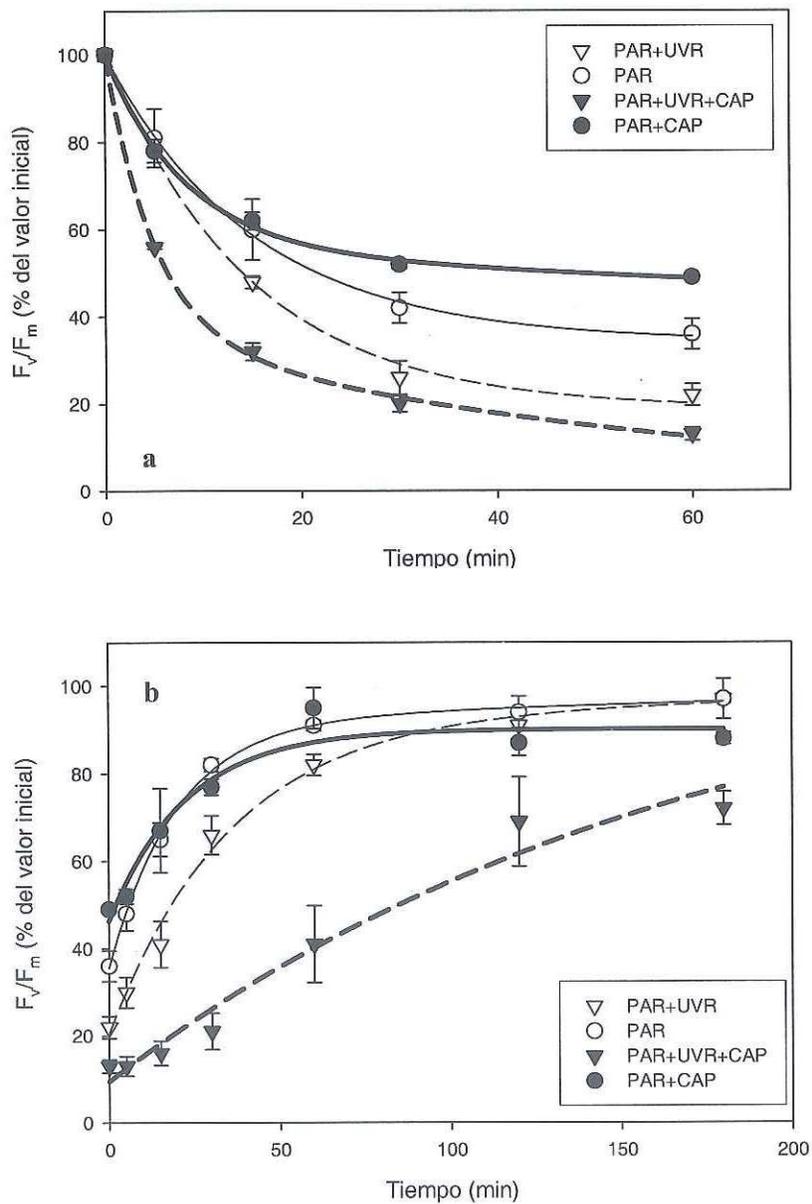


Figura 23 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos y línea discontinua) y PAR (círculos y línea continua) en el control (símbolos abiertos) y en el tratamiento +CAP (símbolos cerrados) para células aclimatadas a LL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt (delgadas, control y gruesas, +CAP).

Tabla V. Diferencia entre el porcentaje de disminución de la máxima eficiencia cuántica a los 60 min de exposición entre el tratamiento PAR+UVR y PAR. Asimismo se presenta la diferencia después de 60 min de recuperación en luz tenue para el control y los tratamientos +DTT, +CAP y +DTT + CAP en células LL.

| % de cambio de F_v/F_m debido exclusivamente a la UVR | LL | | | |
|---|---------|-----|-----|--------------|
| | CONTROL | DTT | CAP | DTT + CAP |
| 60 min de exposición | -14 | -22 | -36 | -10 |
| 60 min de recuperación | -9 | -12 | -54 | -24 |

En el tratamiento DTT+CAP, la reducción de la eficiencia cuántica del PSII fue aproximadamente un 15% mayor a los 60 min de exposición y la recuperación después de una hora fue un 55% menor en comparación al control (Fig. 24a,b).

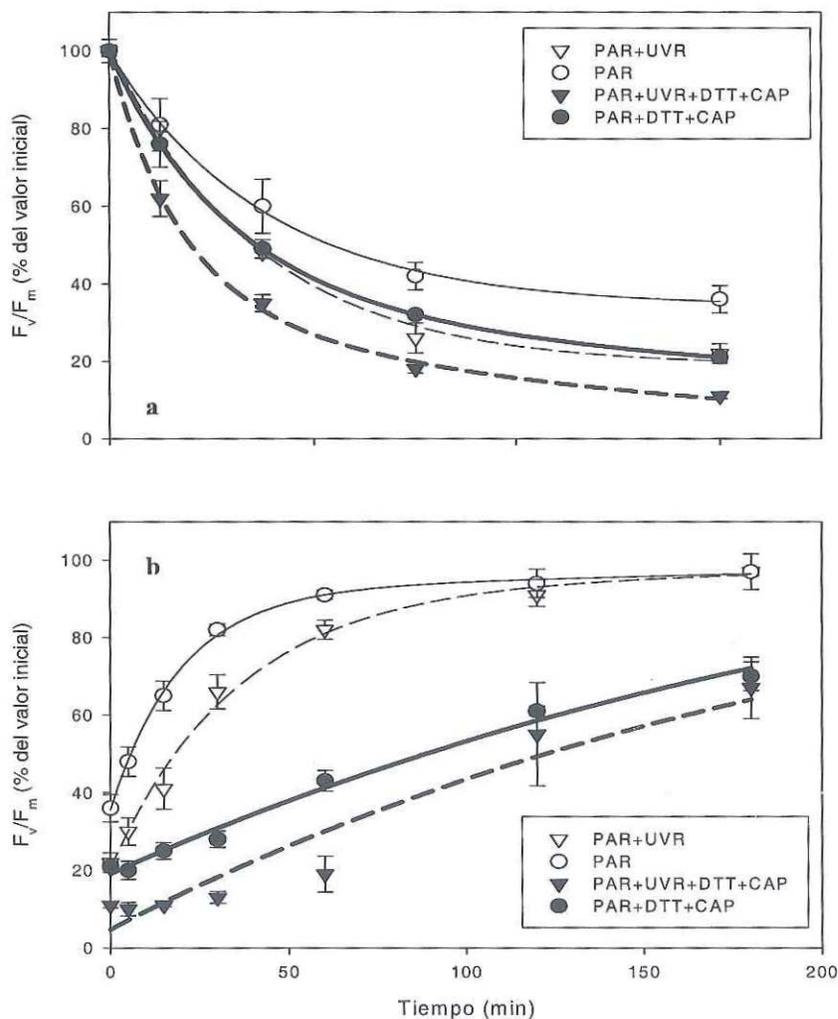


Figura 24 a y b. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos y línea discontinua) y PAR (círculos y línea continua) en el control (símbolos abiertos) y en el tratamiento +DTT+CAP (símbolos cerrados) para células aclimatadas a LL. Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a) y su recuperación posterior en luz tenue (b). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt (delgadas, control y gruesas, +CAP).

Efecto sobre NPQ

La cinética de inducción de NPQ demuestra que con CAP hay una expresión similar al control en PAR (Fig. 25a), con valores máximos promedio de 3.08. Esto demuestra que

el CAP no afectó la síntesis de pigmentos fotoprotectores ni la expresión de NPQ. En el tratamiento con UVR, en cambio, el NPQ máximo en CAP fue significativamente menor al control (t-Student, $p \leq 0.05$). No se observaron diferencias en los valores máximos de inducción de NPQ entre los tratamientos de luz con CAP, pero sí en el período de recuperación. Las células expuestas a PAR+UVR presentaron una disipación del NPQ de solamente el 60% con respecto al máximo valor después de una hora en oscuridad (Fig. 25a).

Con la adición de +DTT+CAP el ascenso de la disipación térmica ocurrió a partir de los 20 min en el tratamiento de PAR+UVR. En el tratamiento de PAR se observó un incremento importante desde los primeros minutos de exposición aunque significativamente menor al control. El cambio de la cinética de inducción es debido al efecto del DTT. Sin embargo, a diferencia del tratamiento con este inhibidor solamente, el NPQ presentó valores máximos similares al control en PAR+UVR. Asimismo, el NPQ máximo en la exposición con UVR no presentó diferencias significativas con el tratamiento sin UVR.

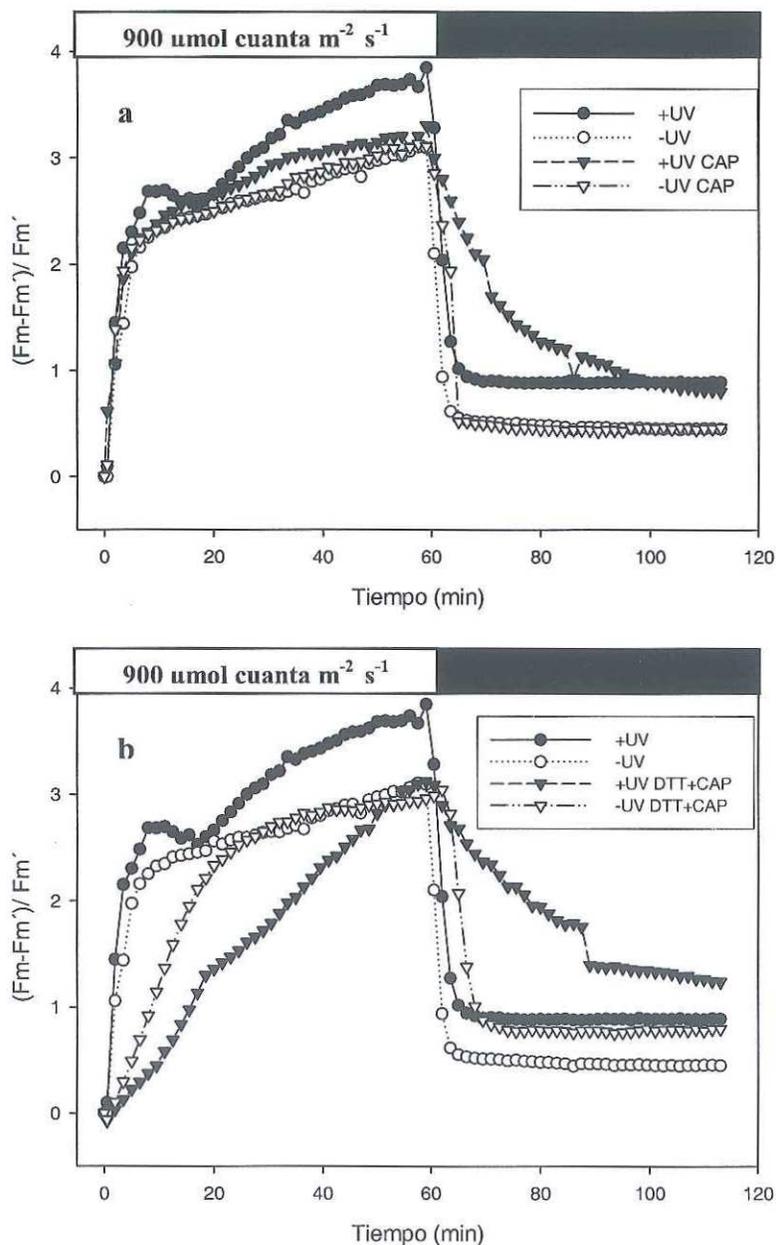


Figura 25 a y b. Inducción de la disipación térmica del exceso de energía (*Non photochemical quenching*) en células de *P. tricornutum* expuestas a luz saturante con PAR+UVR (símbolos cerrados) y PAR (símbolos abiertos), en (a) control (círculos) y tratamiento +CAP (triángulos), (b) control (círculos) y tratamiento +DTT+CAP (triángulos) y su posterior disipación en oscuridad. Las células fueron aclimatadas a LL.

II.3.3.4. Resumen de resultados LL.

- En presencia de UVR, el F_v/F_m presentó valores más bajos durante la exposición y recuperación, así como una tasa de recuperación rápida menor (Fig. 17).
- No se observaron diferencias significativas en el cambio de la concentración de pigmentos del XC_1 entre los tratamientos con y sin UVR después de una hora de exposición a luz saturante, pero sí sobre la interconversión de los pigmentos V_x y Z_x del XC_2 (Tabla IV).
- El contenido total de pigmentos deepoxidados ($Dtx+Zx+0.5*Ax$) y el DPS_1 fueron significativamente más bajos en PAR+UVR (Fig. 19).
- La diferencia en los valores de F_v/F_m entre PAR+UVR y PAR en el tratamiento con DTT es un 25% menor en el tratamiento con UVR durante todo el período de exposición (Fig 11a).
- En presencia de UVR, el efecto sobre los mecanismos de fotoprotección a la hora de exposición (DTT ya no tuvo efecto) fue mayor, lo que se vio reflejado en valores más bajos de NPQ y DPS (Figs. 21 y 22b).
- El tratamiento +CAP presentó valores de F_v/F_m significativamente menores al control tanto en la exposición a PAR+UVR como en la recuperación (Fig. 23), lo que indican un mayor daño del PSII.
- El mayor daño al PSII en +CAP, podría deberse a la reducción de los pigmentos deepoxidados en presencia de UVR, lo que se ve reflejado en los valores de NPQ más bajos (Fig. 25a).

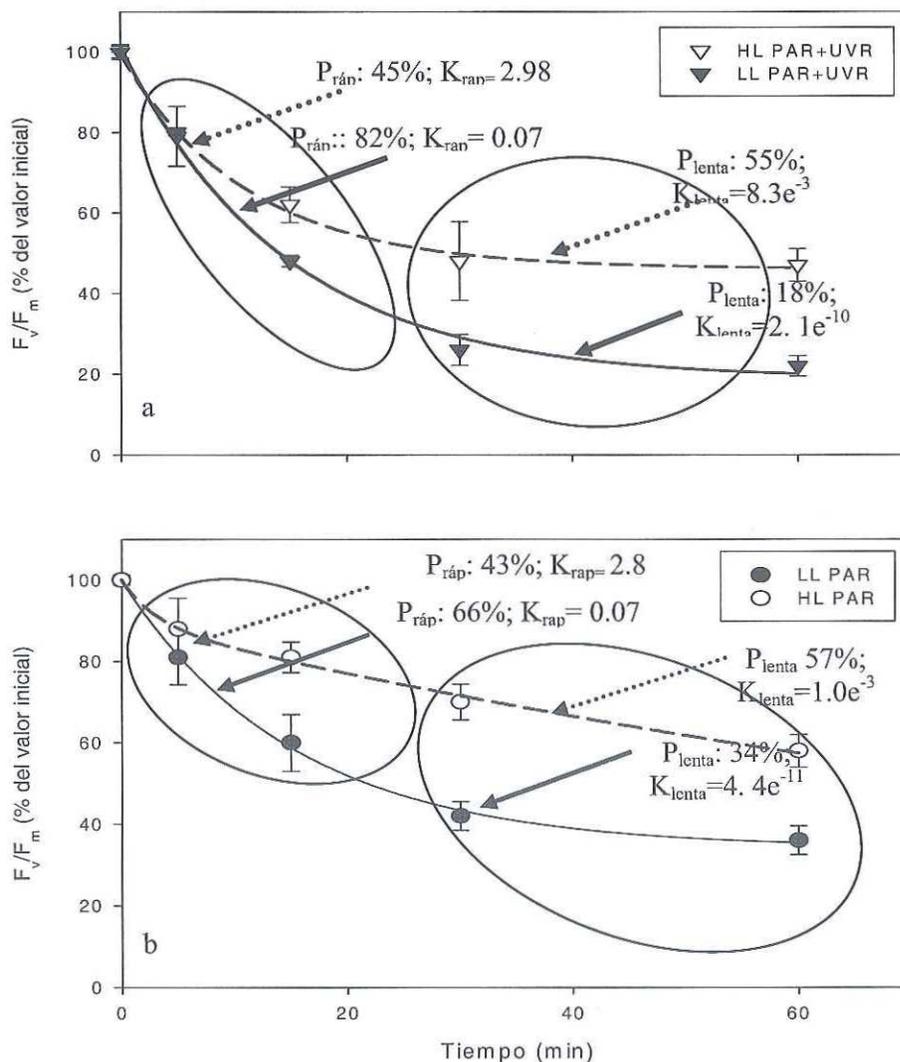
II.3.4. Comparación del efecto de UVR sobre las respuestas fotoprotectivas en células aclimatadas a baja y alta intensidad de PAR.

II.3.4.1. Efecto de la UVR sobre la eficiencia cuántica máxima del PSII.

Las células aclimatadas a baja luz presentaron valores de F_v/F_m un 25 y 22% menores que las células aclimatadas a HL a los 60 minutos de exposición a PAR+UVR y PAR respectivamente (Fig. 26a,b; Tabla VI). La diferencia entre la reducción de F_v/F_m debido al UVR fue un 3% mayor en LL que en HL (Tabla VII). El ajuste exponencial doble realizado mostró que la reducción de F_v/F_m en LL es explicada con una sola exponencial, ya que el componente rápido representó la mayor proporción de la inhibición (82%) y la tasa de inhibición lenta fue cero (Tabla VI). Por lo tanto, la reducción de F_v/F_m está asociada a un sólo componente con una constante relativamente lenta ($k=0.07 \text{ min}^{-1}$). Por otro lado en HL, ambos componentes, el rápido y lento contribuyeron en proporciones similares a la reducción de F_v/F_m (rápido: 45%; lento: 55%). Sin embargo, la tasa de inhibición del componente rápido fue de dos órdenes de magnitud mayor en HL con respecto a LL (Figs. 26a,b; Tabla VI). Lo anterior indica que las células aclimatadas a HL presentan mecanismos fotoprotectivos de activación más rápidos que aquellas que crecieron en LL.

En la recuperación, el incremento de la eficiencia cuántica máxima después de una hora de luz tenue, fue sólo un 10% menor en LL (Fig. 26c,d; Tabla VI). Durante este período, las diferencias entre las aclimataciones fueron menores, el componente rápido contribuyó en un 73% y en un 60% en LL y HL respectivamente. Asimismo, las tasas de recuperación rápida fueron similares entre las aclimataciones a baja y alta luz (Fig. 26c,d, Tabla VI). Un parámetro fundamental para describir la cinética de recuperación es el $t_{1/2}$,

que es el tiempo en el que se alcanza la mitad de la recuperación máxima. Los valores de $t_{1/2}$ fueron 1.5 más lentos en células LL expuestas a PAR+UVR en comparación a células aclimatadas a HL (Tabla VI). Esto refleja un mayor daño al PSII en las células aclimatadas a baja luz, que necesitan casi el doble de tiempo para lograr la recuperación media en presencia de UVR. (Tabla VII).



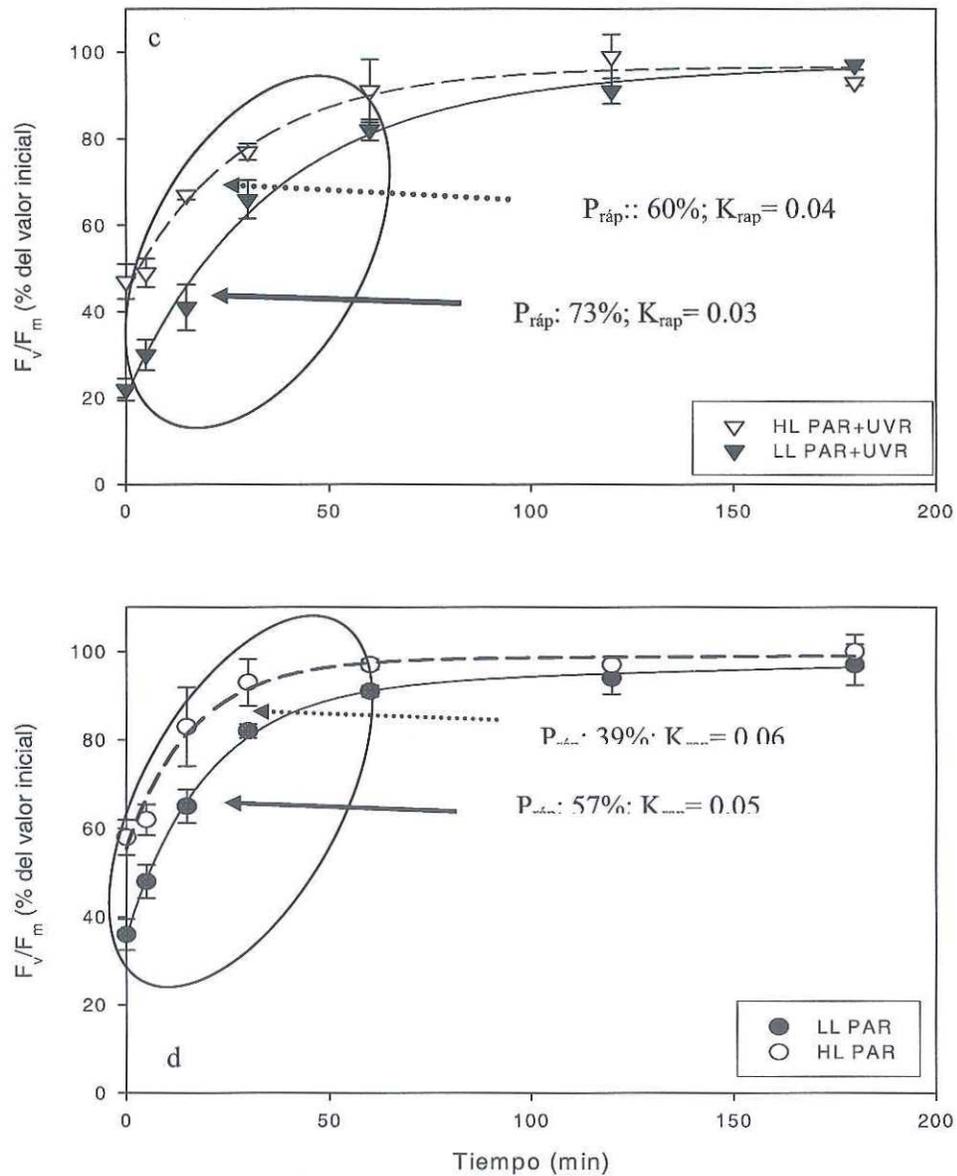


Figura 26 a, b, c y d. Cambio de la eficiencia cuántica máxima en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR (triángulos) y PAR (círculos) aclimatadas a LL (símbolos cerrados) y HL (símbolos abiertos). Se caracterizó el cambio durante el tiempo de exposición a luz saturante (a,b) y su recuperación posterior en luz tenue (c,d). Las líneas representan el ajuste de los datos al modelo de Hanelt. P_{ráp} = % de contribución del componente rápido; k_{ráp} = tasa rápida de inhibición o de recuperación; P_{lento} = % de contribución del componente lento.

Con la adición de +DTT, las células aclimatadas a baja luz presentaron valores de F_v/F_m un 21 y 9% menores que las células aclimatadas a HL a los 60 minutos de exposición a PAR+UVR y PAR respectivamente (Tabla VI). El efecto debido exclusivamente al UVR fue un 12% mayor en LL que en HL (Tabla VII). La cinética de inhibición es explicada por una sola función exponencial, ya que la tasa del componente lento es cero en ambas aclimataciones (Tabla VI).

Durante la recuperación, no se observaron diferencias en los porcentajes de F_v/F_m alcanzados después de una hora de luz tenue (Tabla VI) entre las células aclimatadas a HL y a LL. Cuando se utilizó el parámetro de $t_{1/2}$ para analizar las diferencias entre aclimataciones, no se observaron diferencias en el tiempo requerido para la recuperación media entre las células HL y LL expuestas a PAR, pero sí en aquellas con exposición PAR+UVR (recuperación 15% más lenta en LL) (Tabla VI).

En el tratamiento +CAP, las células aclimatadas a baja luz, presentaron una mayor reducción de F_v/F_m en un 10% en comparación a células aclimatadas a alta luz en las exposiciones a PAR+UVR (Tabla VI). En el período de recuperación, los valores de F_v/F_m fueron mayores en LL en un 14% para el tratamiento con UVR que en HL (Tabla VI). Los tiempos medios de recuperación fueron mucho mayores (probablemente no se llega nunca a la recuperación total) en las células que crecieron en HL (Tabla VI).

La combinación de DTT y CAP, resultó en porcentajes de reducción de la eficiencia cuántica máxima muy similares en ambas aclimataciones. La tasa de inducción rápida fue casi igual en las células aclimatadas a alta y baja luz, con valores de un orden de magnitud mayor en el tratamiento PAR+ UVR en comparación a PAR (Tabla VI).

Después de una hora de luz tenue, las células aclimatadas a LL presentaron una recuperación similar en PAR+UVR y una recuperación aproximadamente un 15% mayor en PAR en comparación a las células aclimatadas a HL (Tabla VI). Asimismo, el tiempo medio de recuperación fue mucho mayor (probablemente no se llega nunca a la recuperación total) en HL en presencia de UVR (Tabla VI).

Tabla VI. Comparación de la máxima eficiencia cuántica, proporciones y tasas de inhibición rápida (Práp y kráp) y lenta (Plenta y kienta) en células de *P. tricornutum* expuestas a PAR+UVR y PAR aclimatadas a alta luz (HL) y baja luz (LL) durante la exposición a luz saturante y su recuperación posterior en luz tenue en Control, +DTT, +CAP y +CAP+DTT. Para el período de recuperación se calculó el tiempo medio de recuperación (t 1/2). aAusencia de recuperación aparente.

| Fv/Fm con respecto al control en oscuridad | Inducción | | | | | | Recuperación | | | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|---------------------|
| | PAR+UVR | | | PAR | | | PAR+UVR | | | PAR | | |
| | HL | LL | LL | HL | LL | LL | HL | LL | LL | HL | LL | LL |
| CONTROL % a los 60 min P _{ráp} k _{ráp} (min ⁻¹) P _{lenta} k _{lenta} (min ⁻¹) t _{1/2} (min) | 49 ± 2.9 | 22 ± 2.5** | 36 ± 3.5*** | 58 ± 2.7 | 66 | 91 ± 6.6 | 82 ± 2.5 | 97 ± 1.2 | 91 ± 1.2 | 91 ± 1.2 | 91 ± 1.2 | 91 ± 1.2 |
| | 45 | 82 | 66 | 43 | 66 | 60.3 | 72.7 | 39.2 | 56.7 | 60.3 | 72.7 | 39.2 |
| | 2.9 | 0.07 | 0.06 | 2.8 | 0.06 | 0.04 | 0.03 | 0.06 | 0.05 | 0.04 | 0.03 | 0.06 |
| | 55 | 18 | 34 | 57 | 34 | 42.5 | 28.9 | 62.9 | 43.7 | 42.5 | 28.9 | 62.9 |
| 8.30E-03 | 0 | 0 | 1.00E-03 | 0 | 0 | 0 | 7.00E-04 | 1.00E-04 | 6.00E-04 | 0 | 7.00E-04 | 1.00E-04 |
| 20 | 30 | 15 | 20 | 15 | 20 | 30 | 15 | 15 | 20 | 30 | 15 | |
| DTT % a los 60 min P _{ráp} k _{ráp} (min ⁻¹) P _{lenta} k _{lenta} (min ⁻¹) t _{1/2} (min) | 38 ± 4.2 | 17 ± 3.0** | 39 ± 2.2* | 48 ± 5.4 | 68 | 83 ± 2.9 | 79 ± 2.0 | 92 ± 0.8 | 91 ± 1.2 | 83 ± 2.9 | 79 ± 2.0 | 92 ± 0.8 |
| | 66 | 86 | 68 | 56 | 68 | 69 | 17 | 55 | 58 | 69 | 17 | 55 |
| | 6.0 e ⁻² | 7.0 e ⁻² | 5.0 e ⁻² | 6.0 e ⁻² | 5.0 e ⁻² | 2.0 e ⁻² | 0 | 0 | 4.0 e ⁻² | 2.0 e ⁻² | 0 | 0 |
| | 34 | 14 | 32 | 44 | 32 | 33 | 87 | 48 | 43 | 33 | 87 | 48 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.0 e ⁻² | 5.0 e ⁻² | 0 | 0 | 2.0 e ⁻² | 5.0 e ⁻² |
| 25 | 30 | 20 | 25 | 20 | 25 | 30 | 20 | 20 | 25 | 30 | 20 | |
| CAP % a los 60 min P _{ráp} k _{ráp} (min ⁻¹) P _{lenta} k _{lenta} (min ⁻¹) t _{1/2} (min) | 21 ± 1.2 | 13 ± 1.5** | 49 ± 0.6*** | 20 ± 1.7 | 45 | 27 ± 3.0 | 41 ± 8.8 | 61 ± 10.5 | 95 ± 4.7 | 27 ± 3.0 | 41 ± 8.8 | 61 ± 10.5 |
| | 75 | 63 | 45 | 50 | 45 | 100 | 0 | 50 | 16 | 100 | 0 | 50 |
| | 0.15 | 0.2 | 0.12 | 0.12 | 0.12 | 1.0 e ⁻³ | 0 | 2.0 e ⁻² | 9.6 | 1.0 e ⁻³ | 0 | 2.0 e ⁻² |
| | 25 | 37 | 55 | 50 | 55 | 0 | 100 | 50 | 84 | 0 | 100 | 50 |
| 3.0 e ⁻³ | 2.0 e ⁻² | 2.0 e ⁻³ | 2.0 e ⁻² | 2.0 e ⁻³ | 0 | 5.0 e ⁻³ | 0 | 2.0 e ⁻³ | 2.0 e ⁻³ | 0 | 5.0 e ⁻³ | 0 |
| Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | 110 | 70 | 40 | Indeterminado ^a | 110 | 70 |
| DTT+CAP % a los 60 min P _{ráp} k _{ráp} (min ⁻¹) P _{lenta} k _{lenta} (min ⁻¹) t _{1/2} (min) | 8 ± 0.6 | 11 ± 0.7** | 21 ± 1.1** | 16 ± 0.8 | 65 | 13 ± 1.7 | 19 ± 4.6 | 26 ± 1.2 | 43 ± 2.7 | 13 ± 1.7 | 19 ± 4.6 | 26 ± 1.2 |
| | 93 | 65 | 65 | 92 | 65 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 |
| | 0.1 | 0.14 | 8.0 e ⁻² | 5.0 e ⁻² | 8.0 e ⁻² | 3.0 e ⁻³ | 4.0 e ⁻³ | 0 | 0 | 3.0 e ⁻³ | 4.0 e ⁻³ | 0 |
| | 7 | 35 | 35 | 10 | 35 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 |
| 0 | 2.0 e ⁻² | 9.0 e ⁻³ | 0 | 0 | 9.0 e ⁻³ | 0 | 0 | 3.0 e ⁻³ | 4.0 e ⁻³ | 0 | 0 | |
| Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | Indeterminado ^a | 180 | 140 | 140 | Indeterminado ^a | 180 | 140 |

Tabla VII. Diferencia entre el porcentaje de disminución de la máxima eficiencia cuántica a los 60 min de exposición a alta luz entre el tratamiento PAR+UVR y PAR. Asimismo se presenta la diferencia después de 60 min de recuperación en luz tenue para el control y los tratamientos +DTT, +CAP y +DTT + CAP en células aclimatadas a alta luz (HL) y baja luz (LL). La línea de puntos indica que el cálculo no se hizo debido a que el CAP no funcionó en PAR.

| % de reducción de Fv/Fm debido exclusivamente a la UVR | Inducción (60 min) | | Recuperación (60 min) | |
|--|---------------------|-------|-----------------------|-------|
| | [(PAR+UVR) - (PAR)] | | [(PAR+UVR) - (PAR)] | |
| | HL | LL | HL | LL |
| CONTROL | -11 | -14 | -6 | -9 |
| DTT | -10 | -22 | -9 | -12 |
| CAP | +1 | ----- | -34 | ----- |
| DTT+CAP | -8 | -10 | -13 | -24 |

II.3.4.2. Efecto del UVR sobre los procesos involucrados en la disipación térmica: inducción de NPQ e interconversión de los pigmentos del XC.

Los valores máximos de NPQ fueron muy similares entre las aclimataciones en cada uno de los dos tratamientos de luz. Sin embargo, la tasa de inducción del NPQ fue significativamente más baja (t-Student, $p \leq 0.05$) en LL, en aproximadamente un 25% (Tabla VIII). Lo anterior, confirma que la activación de los mecanismos fotoprotectores fue más rápida en los organismos aclimatados a alta irradiancia.

Por otro lado, la si se comparan los valores máximos de NPQ entre PAR+UVR y PAR, en el tratamiento con UVR el NPQ alcanzó valores un 5 y un 20% más altos en HL y LL respectivamente (Tabla VIII).

Tabla VIII. Comparación de los valores máximos y de tasas de inducción de NPQ entre las células de *P. tricornutum* aclimatadas a HL y LL para los tratamientos PAR+UVR y PAR. Una diferencia en el NPQ máximo o en la tasa de inducción de NPQ (k) entre HL y LL a un nivel de significancia de 0.01 se denota por **; n.s: diferencias no significativas (prueba t-Student).

| NPQ | PAR + UVR | | PAR | |
|---|-----------|----------------------|-------|-----------------------|
| | HL | LL | HL | LL |
| Máximo de inducción | 3.20 | 3.35 ^{n.s.} | 3.07 | 2.75 ^{n.s.} |
| k (tasa de inducción, min ⁻¹) | 0.818 | 0.657 ^{**} | 0.617 | 0.454 ^{n.s.} |

El contenido total de pigmentos del XC_1 (Ddx+Dtx) antes de la exposición fue significativamente menor en LL (Tabla IX). Después de una hora de exposición, HL presentó un aumento del *pool* de pigmentos del XC_1 del 40 y 50% en los tratamientos con y sin UVR respectivamente, mientras que LL, incrementó el contenido de Ddx+Dtx en un 25% en PAR+UVR y en un 35% en PAR (Tabla IX). Por lo tanto, HL mostró una mayor capacidad de síntesis *de novo* de pigmentos XC_1 que LL. Asimismo, en ambas aclimataciones, el incremento en el contenido de Ddx+Dtx fue mayor en el tratamiento de exclusión de la UVR. Lo anterior, indica que la UVR afectó negativamente a la síntesis *de novo* de pigmentos del XC_1 . Asimismo, el contenido total de pigmentos XC (XC_1+XC_2) es mayor en las células HL con respecto a células LL sólo en el tratamiento sin UVR (Tabla IX).

Por otro lado, la interconversión de Dtx, se vio más favorecida en la aclimatación HL, solo en ausencia de UVR, donde tanto la concentración de Dtx como la tasa de deepoxidación presentaron un aumento significativamente más alto en las células aclimatadas a HL en comparación a aquellas aclimatadas a LL (Tabla IX). Asimismo, en las microalgas aclimatadas a alta luz, tanto la tasa de deepoxidación como el contenido de

Dtx a los 60 min de exposición fueron significativamente menores (40% más bajos respectivamente) en PAR+UVR en comparación a PAR. Esta diferencia no se observó en los organismos aclimatados a baja luz (Tabla IX). Asimismo, el efecto debido exclusivamente a la UVR, se observó de forma más pronunciada en las células aclimatadas a alta luz, en las que tanto el aumento del contenido total de pigmentos del XC, de pigmentos del XC₁ y de Dtx, el DPS₁ y la tasa de deepoxidación disminuyeron en mayor porcentaje en comparación a las células aclimatadas a LL durante la hora de exposición (Tabla IX).

Tabla IX. Comparación del contenido de pigmentos del XC₁ inicial y del cambio en el contenido de XC y de Dtx, del estado de deepoxidación (DPS) y de la tasa de deepoxidación a los 60 min de exposición entre células de *P. tricornutum* aclimatadas a HL y LL en los tratamientos PAR+UVR y PAR. Se calculó el efecto exclusivo del UVR (+UVR) como la diferencia entre PAR+UVR y PAR para todas las variables. Una diferencia en el contenido de los pigmentos, DPS y/o tasa de deepoxidación entre HL y LL a un nivel de significancia de 0.05 se denota por *, a 0.01 por **, a 0.001 por ***; *n.s.*: diferencias no significativas (prueba t-Student).

| | PAR+UVR | | PAR | | +UVR | |
|---|---------|-----------------------|-------|----------------------|-----------------|------------------|
| | HL | LL | HL | LL | HL | LL |
| Ddx+Dtx inicial (mol.100mol ⁻¹ Chla) | 34.06 | 25.32* | 27.23 | 22.40* | | |
| DPS inicial [(Dtx/(Ddx+Dtx)) Δ 60-0min Ddx+Dtx (mol.100mol ⁻¹ Chla) | 0.03 | 0.01 | 0.02 | 0.009 | | |
| Δ 60-0min Dtx (mol.100mol ⁻¹ Chla) | 23.7 | 10.0* | 33.0 | 10.8* | -10 (-28%) | 0 |
| Δ 60-0min DPS [(Dtx/(Ddx+Dtx)) Tasa de deepoxidación (min ⁻¹) | 0.34 | 0.46 ^{n.s.} | 0.40 | 0.49 ^{n.s.} | -0.06 (-15%) | -0.03 (-6%) |
| Δ 60-0min XC ₁ + XC ₂ (mol.100mol ⁻¹ Chla) | 0.016 | 0.020 ^{n.s.} | 0.027 | 0.018** | -0.01 (-40%) | +0.002 (+10%) |
| | 13.9 | 13.4 | 29.9 | 11.6 | -16 (-64%) | 1.8 (14%) |
| | 1.75 | 1.30 | 1.90 | 1.48 | | |

II.4. Discusión

II.4.1. Características fotoprotectivas de células aclimatadas a baja y alta luz y su relación con la respuesta al UVR.

Así como lo reportan varios autores para especies de microalgas marinas (Demers et al., 1991; Casper-Lindley y Björkman, 1998; Lavaud et al., 2002; Dimier et al., 2007), las células aclimatadas a alta luz (HL) poseen una capacidad de fotoprotección mayor, reflejada en valores de NPQ, conjunto de pigmentos XC y una acumulación de Dtx significativamente mayores que en células aclimatadas a bajas intensidades de luz (LL). La mayor capacidad de fotoprotección en organismos adaptados a alta intensidad de luz, es probablemente la principal causa de la mayor y relativamente rápida recuperación de la eficiencia cuántica máxima después de estar expuestas a un estrés por lumínico (van de Poll et al., 2006; García-Mendoza y Colombo-Pallota, 2007).

En el presente estudio, una característica importante que define condiciones fisiológicas diferentes entre aclimataciones, es que la cinética de reducción de F_v/F_m en células aclimatadas a LL es muy diferente a la de células aclimatadas a HL. El descenso de F_v/F_m en las células aclimatadas a LL, no puede ser explicado por dos funciones exponenciales de acuerdo al modelo de Hanelt (1998). En LL la tasa del componente lento de inhibición es tan lenta (no diferente de cero) que anula este componente. Por lo tanto, un sólo proceso es el dominante en la reducción de la eficiencia cuántica máxima del PSII. Este proceso probablemente está asociado al daño del PSII, ya que presenta una tasa lenta comparada con procesos relacionados a la fotoprotección, los cuales ocasionan una caída rápida de F_v/F_m en los primeros minutos de exposición. Estos últimos tienen un papel

importante en la cinética de reducción de F_v/F_m en células aclimatadas a HL. Por lo tanto, los procesos dominantes en la reducción de la eficiencia cuántica máxima en las células aclimatadas a luz alta, son los mecanismos de fotoprotección. Los cultivos aclimatados a alta intensidad de PAR, presentaron tasas de deepoxidación de los pigmentos del XC e inducción de NPQ mucho más rápidos que las células aclimatadas a baja luz (Tablas VIII y IX). Asimismo, estas células acumularon una mayor cantidad de pigmentos deepoxidados en condiciones de luz estresante. Lo anterior, se vio reflejado en la reducción de F_v/F_m en la aclimatación a HL, donde se diferencian los componentes rápido y lento, y donde el primero, el componente relacionado a la regulación (caída rápida de F_v/F_m) y asociado a los mecanismos de fotoprotección, es el más importante. Además de influir en la cinética, la expresión de la fotoprotección en HL ocasionó que la reducción de F_v/F_m fuera mucho menor que LL durante el período de exposición (Figs. 26a,b).

Por lo tanto, sí existió una clara diferencia entre las dos aclimataciones respecto a su sensibilidad a luz saturante. Esta diferencia es clara tanto en la reducción de F_v/F_m en luz como su posterior recuperación asociado a una mayor expresión de los mecanismos de fotoprotección en células aclimatadas a HL. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los valores máximos de NPQ entre las dos aclimataciones. La similitud entre los valores de NPQ se puede explicar por una reducción substancial de F_m asociada al fotodaño en LL, lo cual se reflejó en la menor eficiencia cuántica medida para células de esta aclimatación y en el NPQ remanente en obscuridad después de luz saturante.

Lo anterior coincide con lo reportado por van de Poll et al. (2006), que observan que bajo condiciones de exposición saturante, la reducción de F_v/F_m es más pronunciada en células de *Thalassiosira weissflogii* y *Thalassiosira antarctica* aclimatadas a baja luz (10

$\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) en comparación con aquellas aclimatadas a alta luz ($300 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Neale et al. (1998) demuestran que células de *Gymnodinium sanguineum* aclimatadas a una intensidad de luz cinco veces mayor presentan menor disminución de F_v/F_m que aquellas aclimatadas a baja luz. Asimismo, Hanelt (1998) reporta que organismos aclimatados a altas intensidades de luz (macrófitas de la zona intermareal), presentaron una disminución más rápida de la eficiencia fotosintética cuando fueron expuestas a alta luz y una recuperación más rápida en el período de luz tenue que algas aclimatadas a una menor intensidad de luz (provenientes de aguas más profundas).

Con respecto a la síntesis de pigmentos fotoprotectores se observó que el contenido de pigmentos del XC_1 (Ddx+Dtx) antes de la exposición y su aumento después de la hora de luz saturante fue significativamente mayor en las células aclimatadas a HL (Tabla IX). Asimismo, el aumento en el contenido de Dtx (ΔDtx) a la hora de exposición y la tasa de deepoxidación en el tratamiento PAR, fueron significativamente más altos en las algas crecidas a irradiancias altas (Tabla IX). Otra respuesta fotoprotectiva que se detectó entre aclimataciones fue que la síntesis *de novo* de pigmentos del XC es una estrategia importante, ya que células aclimatadas a HL sintetizaron aproximadamente un 15% más pigmentos del XC_1 que células aclimatadas en LL (la importancia de la síntesis *de novo* se discute en una sección posterior). Lo anterior demuestra que *P. tricornutum* aclimatada a alta intensidad de luz puede desarrollar una capacidad mayor de fotoprotección mediante la síntesis de pigmentos asociados al XC. En concordancia, Demers et al. (1991) demostraron que células de *Alexandrium excavatum* aclimatadas a altas irradiancias, incrementan el contenido de pigmentos del XC durante exposiciones a luz saturante como mecanismo de fotoprotección.

II.4.2. Efecto de la UVR sobre la eficiencia cuántica máxima y la disipación térmica. Su relación con el ciclo XC.

II.4.2.1. Efecto de la UVR sin inhibidores.

Estudios comparativos realizados con microalgas, han demostrado que el efecto conjunto del PAR y UVR sobre la eficiencia cuántica máxima resulta en un mayor descenso de la misma y una menor recuperación en comparación con exposiciones exclusivas a PAR o a UVR (Montero et al., 2002; Shelly et al., 2003; García-Mendoza et al., 2005). Por lo tanto, si el XC es uno de los blancos principales del UVR, se esperaría que la disminución en la capacidad fotoprotectora aumentara la sensibilidad al PAR, y por lo tanto se observara una diferencia en la eficiencia cuántica máxima entre PAR+UVR y PAR. En este estudio, los efectos de la UVR sobre la eficiencia cuántica máxima se reflejaron en una mayor reducción de la misma durante la exposición (12.5% mayor) y en una menor recuperación en luz tenue (7% menor) en comparación a PAR (Tabla VII). Aunque no se observaron diferencias en las cinéticas de inducción ni de recuperación, sí se presentaron diferentes $t_{1/2}$ de recuperación de un 50% mayor para LL y para HL en el tratamiento PAR+UVR (Tabla VI). Por lo tanto, en ambas aclimataciones la UVR tuvo un efecto fotoinhibitorio sobre el PSII.

Un objetivo principal este estudio es discernir los procesos implicados en la reducción de F_v/F_m debido al UVR. Por lo tanto, las diferencias observadas en el cambio del contenido de los pigmentos del XC debido a la UVR (Tabla IX) en células aclimatadas a HL y LL, revelan que esta respuesta se ve afectada por esta radiación y puede estar implicada en la reducción de la eficiencia cuántica máxima. El cambio en el contenido de

Dtx, el DPS y la tasa de deepoxidación fueron afectados por el UVR de manera más pronunciada en las células aclimatadas a HL en comparación a aquellas aclimatadas a LL. El contenido de Dtx disminuyó aproximadamente un 10%, el DPS un 50% y la tasa de deepoxidación un 80% más debido al UVR en HL que en LL (Tabla IX). Asimismo, el cambio de los pigmentos deepoxidados con respecto a su concentración en el tiempo cero, es aproximadamente un 25 y 12% menor en presencia de UVR para HL y LL respectivamente (Tablas II y IV). De acuerdo a las diferencias observadas entre los tratamientos de luz para los pigmentos del XC₂ (Vx, Ax, Zx), la UVR afectó negativamente la interconversión a Zx en un 95 y 65% en las aclimataciones a alta y baja luz respectivamente (Tabla II y IV). Lo anterior indica que la UVR afecta en mayor medida la deepoxidación de los pigmentos del XC en las células que poseen mecanismos de fotoprotección más desarrollados. Los mecanismos de regulación rápida serían entonces el principal factor que produce la reducción de la máxima eficiencia cuántica en dicha aclimatación y su posterior recuperación.

Se ha reportado que el NPQ es mayor en exposiciones conjuntas de PAR y UVR en *P. tricornutum*, así como una estimulación de la deepoxidación de Ddx en presencia de UVR (Sobrino et al., 2005; Goss et al., 1999). Sin embargo, otros autores han demostrado que la inclusión de UVR durante exposiciones a PAR, produce el efecto inverso sobre el XC en diatomeas (Mewes y Ritcher, 2002; García- Mendoza et al., 2005). En este estudio, aunque no se detectaron diferencias en la inducción de NPQ con la inclusión del UVR, si se observó una menor producción de pigmentos deepoxidados en el tratamiento PAR+UVR. La formación de NPQ no está exclusivamente ligada al componente qE, ya que la reducción de F_m puede deberse a otros factores, principalmente al daño en el PSII. Esto

último puede observarse en el remanente de NPQ en oscuridad después del estrés por luz. Por lo tanto, la similitud en NPQ entre los diferentes tratamientos de luz y aclimataciones no indican necesariamente la misma protección. Lo anterior se reflejó en la comparación entre LL vs HL, donde el NPQ máximo es similar, pero el primero es más sensible a alta luz: mayor caída de F_v/F_m . Esto último está relacionado con un menor contenido de pigmentos del XC y una menor capacidad de producir pigmentos deepoxidados en alta luz.

II.4.2.2. Uso de inhibidores fisiológicos para dilucidar el efecto del UVR sobre los mecanismos de fotoprotección.

II.4.2.2.1. Efecto del DTT.

El inhibidor de la deepoxidación de los pigmentos del XC fue 100% efectivo en los primeros 20 minutos de exposición. La reducción de F_v/F_m entre PAR+UVR y PAR a los 5 y 15 minutos de exposición (Fig. 11a) fue muy similar en las células aclimatadas a HL. Lo anterior indica que al bloquear la fotoprotección, la reducción de F_v/F_m se debió principalmente al balance entre fotodaño y reparación del PSII, y que éste no fue significativamente diferente entre el tratamiento de PAR y PAR+ UVR. En contraste, el efecto del UVR con DTT fue diferente en las células aclimatadas a LL. La diferencia en la reducción de la eficiencia cuántica máxima entre los tratamientos PAR+UVR y PAR a los 15 minutos de exposición fue significativa (Fig. 20a) por lo que el bloqueo de la deepoxidación de pigmentos del XC no afectó de manera importante el efecto del UVR sobre el PSII. Asimismo, el aumento del $t_{1/2}$ de recuperación en presencia de UVR no fue

tan marcado en algas que crecieron en HL (20% más alto en PAR+UVR que en PAR) como en algas que crecieron en LL (40% más alto en PAR+UVR que en PAR) (Tabla VI).

Por otro lado, aunque el DPS fue 5 veces menor que en el tratamiento sin DTT, se observó un aumento significativo a los 60 min con respecto al inicio de la exposición (Fig 13b y 22b). Lo anterior ocurrió por la restauración de la deepoxidación en los últimos 30 min de exposición, debido a que el efecto del DTT no fue efectivo durante toda la hora de exposición. Diversos autores han observado este efecto incompleto del DTT a concentraciones bajas de este inhibidor, las cuales se aplican para evitar cualquier efecto secundario del mismo (Neubauer C., 1993; Garcia-Mendoza et al., 2002). En ausencia del UVR, el DPS fue 3 veces más alto que en PAR+UVR. Por lo tanto, la última media hora puede considerarse un control, donde el patrón de mayor disminución del DPS en presencia de UVR se repite. Lo anterior podría explicar el mayor ascenso del NPQ en PAR (Figs. 12 y 21) y podría mostrar algún efecto conjunto del DTT y el UVR.

Al respecto, Olaizola et. al (1994) y Olaizola y Yamamoto (1994), reportan un aumento de la concentración del pool XC_1 después de 30 min de exposición a luz saturante en *P. tricorutum* y *Chaetoceros muelleri*. Dichos autores proponen una cinética bifásica para el NPQ, con una primera fase rápida debida principalmente a la deepoxidación de Ddx y una segunda fase de incremento después de 20 a 30 min de exposición, independiente de la actividad del ciclo XC_1 (por lo tanto, insensible a la adición de DTT). Este patrón es observado claramente en este estudio, cuando la primera fase del NPQ es casi anulada con la adición de ditioneitol (Figs. 12 y 21). Sin embargo, en presencia del inhibidor, no se observa un incremento del pool XC_1 a los 60 min de exposición (Figs. 13a

y 22a), por lo que este inhibidor también está afectando la síntesis *de novo* de pigmentos XC.

II.4.2.2.2. Efecto del CAP.

Si se comparan los valores de F_v/F_m en el tratamiento +CAP en las células aclimatadas a alta intensidad de luz, no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de luz durante la exposición. Al respecto, Bouchard et al. (2005), no observan diferencias entre los valores de F_v/F_m de exposiciones naturales a PAR+UVR y PAR en muestras de fitoplancton incubadas con lincomicina (bloqueador de síntesis de proteínas codificadas en cloroplasto). Aunque no hubo una recuperación total de la máxima eficiencia cuántica en ninguno de los dos tratamientos de luz, en PAR+UVR la recuperación a la hora fue significativamente menor que en PAR (Tabla X). Lo anterior se observa de manera más pronunciada cuando se comparan los $t_{1/2}$ (Tabla VI), que en presencia de UVR son mucho más altos (tiempo indeterminado) que sin UVR (70 min). Si se compara el efecto exclusivo de la UVR en el tratamiento de inhibición de síntesis protéica con el control sin inhibidores, se observa que la recuperación es un 34% más baja con CAP debido a dicha radiación (Tabla VII). Todo lo anterior podría indicar que cuando se bloquea la síntesis *de novo* de D1 en células aclimatadas a alta irradiancia, la fotoinhibición por daño directo sobre el PSII y por reducción de la capacidad de fotoprotección producida por la UVR, se manifiesta como una recuperación más baja (Fig. 14b). En concordancia, los valores de inducción de NPQ cuando se añadió CAP, fueron mucho más altos en el tratamiento PAR+UVR comparado con PAR en algas que crecieron en condiciones HL (Fig.16a). Este patrón observado en las curvas de inducción y relajación de NPQ, indicaría que el daño sobre el

PSII fue más pronunciado en presencia de UVR. Además, en el período de obscuridad no se produjo relajación en las células expuestas a UVR (Fig.16a). Al respecto, Olaizola et al. (1994) calcularon las fracciones del NPQ dependientes e independientes de Dtx y observaron que en cultivos incubados con CAP la fracción independiente de Dtx se incrementa más en comparación al control y tratamiento con DTT. Esta fracción independiente del XC, se originaría a partir de los centros de reacción dañados del PSII (fracción del NPQ correspondiente a qI).

La mayor recuperación de F_v/F_m (14% más alta) y los $t_{1/2}$ de recuperación menores en las células aclimatadas a baja intensidad de luz en comparación a las células aclimatadas a HL (Tabla VI), indicaría un mayor daño debido al UVR en las últimas. Lo anterior concuerda con la ausencia de diferencias en los valores máximos de NPQ entre PAR+UVR y PAR en las algas que crecieron en condiciones LL (Fig. 25a).

II.4.2.2.3. Efecto del DTT+CAP.

Con la adición de ambos inhibidores, se pudo observar el daño directo al PSII, descontando tanto el efecto de la UVR sobre los mecanismos de fotoprotección como sobre la reparación del PSII. Entonces, en la recuperación, la diferencia constante entre PAR+UVR y PAR, muestra la proporción de daño directo por UVR al PSII tanto en las células aclimatadas a HL y a LL (Figs. 15b y 24b). Lo anterior indicaría que el daño directo de la UVR sobre el PSII no es tan importante cuando se omiten los mecanismos de fotoprotección y de reparación.

II.4.3. Síntesis “de novo” de pigmentos XC y su posible relación con UVR.

Los efectos diferenciales observados sobre el ciclo XC durante exposiciones con y sin UVR, no sólo fueron sobre el XC₁ (conversión de Ddx a Dtx), sino que también se detectaron diferencias en el ciclo XC₂ (conversión de Vx a Zx). Como lo reportaron Lohr y Wilhelm (1999; 2001), *P. tricornutum* además de poseer el ciclo XC característico del grupo de las cromófitas de Ddx a Dtx (XC₁), posee además el ciclo XC de Vx-Ax-Zx (XC₂), típico de los grupos de algas verdes y plantas superiores. La acumulación de los pigmentos XC₂ depende de la síntesis *de novo* de carotenoides y de la actividad deepoxidasa que se lleva a cabo preferentemente en condiciones de estrés por luz (Lohr y Wilhelm 1999). La ruta biosintética propuesta por Lohr y Wilhelm (2001) en la cual están involucrados los dos ciclos se presenta en la Figura 27.

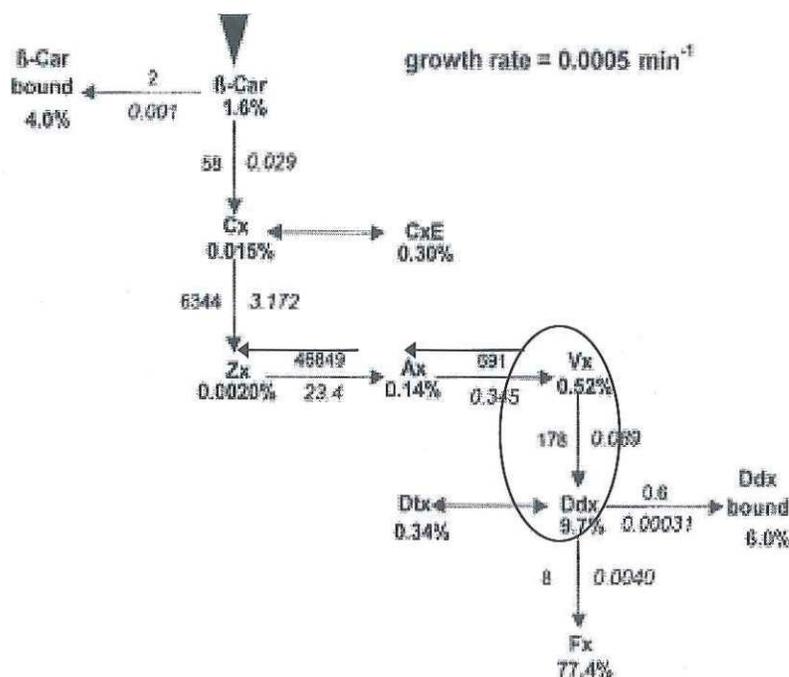


Figura 27. Modelo hipotético de la ruta de síntesis de los pigmentos del ciclo XC en diatomeas. Debajo de cada pigmento está indicado el porcentaje de contribución al total de carotenoides en *P. tricorrrnutum* en estado estacionario de crecimiento en condiciones de baja luz ($40 \mu\text{mol cuanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Para cada paso de conversión, se indican el factor de recambio y la tasa de conversión (min^{-1}), calculada para una tasa de crecimiento de 0.0005 min^{-1} . $\beta\text{-Car}$ = $\beta\text{-Caroteno}$; Fx = fucoxantina. Adaptado de Lohr y Wilhelm (2001).

El incremento del contenido total de pigmentos del XC (Tabla IX) y los cambios particulares en los pigmentos del XC₂ (Tablas II y IV) observados en este estudio durante exposición a alta luz, indican que hubo una síntesis *de novo* de pigmentos XC. Este proceso fue más pronunciado en la aclimatación HL, donde el incremento del contenido total del XC ($\text{Ddx}+\text{Dtx}+\text{Vx}+\text{Ax}+\text{Zx}$) fue 1.90 y 1.75 veces más que el valor inicial a los 60 min de exposición en PAR y PAR+UVR respectivamente, mientras que en LL fue 1.45 y 1.30 veces mayor que en el tiempo cero (Tabla IX). Al respecto, Lohr y Wilhelm (1999)

reportan un aumento del *pool* total de los pigmentos del XC de 2.5 veces con respecto al contenido inicial en células aclimatadas a LL y expuestas a irradiancia saturante durante 6 hs. Asimismo, en este estudio la aclimatación HL presentó una síntesis de pigmentos XC₁ un 10% mayor a los 15 min de exposición y un 15% más alta a los 30 y 60 min de exposición en comparación a la aclimatación LL (datos no mostrados). Sin embargo, lo anterior no se vió reflejado en los máximos valores de NPQ ya que no presentaron diferencias significativas entre las aclimataciones (Tabla VIII). La mayor tasa de inducción de NPQ en las algas que crecieron bajo HL, podría ser consecuencia del mayor contenido inicial de pigmentos del XC₁ (Tabla IX) ya que no se observaron diferencias en la síntesis de pigmentos del XC₁ a los primeros 5 min de exposición entre las células aclimatadas a HL y a LL (datos no mostrados).

Según el modelo de biosíntesis de carotenoides (Lohr y Wilhelm, 2001), la reducción menor de Ddx en alta luz en relación al aumento de Dtx observada en este estudio (Tablas II y IV), se debe a que probablemente la Ddx se está reponiendo a través de la conversión de Vx a Ddx. La acumulación de Zx en condiciones normales, puede deberse a la síntesis *de novo* de Zx a través de su precursor criptoxantina (Cx). Bajo condiciones de luz saturante, este pigmento mantendría sus niveles constantes porque la deepoxidación está activa y no se puede epoxidar a Vx (Lohr, 1999) o si lo hace, se convierte rápidamente de nuevo a Zx o a Ddx, por lo que probablemente no se ve una reducción de este último pigmento en alta luz.

Los resultados demuestran que el UVR afectó el cambio del contenido total de pigmentos del XC y su interconversión. La diferencia en la concentración de pigmentos del XC entre los tratamientos de exposición con UVR y sin UVR indica que existió un efecto

sobre las reacciones involucradas en la interconversión de los mismos (a nivel sustrato o a nivel enzima). Se ha documentado que la formación de pigmentos deepoxidados resulta del balance entre la reacción de deepoxidación (inducida por luz) y la reacción de epoxidación (Pfündel, 1994). La acumulación menor de Zx, Vio y Ddx en el tratamiento PAR+UVR indica que la reacción de epoxidación no se vio afectada por UVR. Por el contrario, Mewes y Ritcher (2002) reportan que la UVR disminuye el estado de deepoxidación en células de *P. tricornutum* por el incremento de la actividad de la Dtx epoxidasa. Este efecto se debería al desacoplamiento de esta enzima de la membrana tilacoide provocado por la UVR. En este estudio, si la UVR favoreciera la epoxidación, se esperaría que hubiera más Vx y más Ddx en comparación a PAR. Lo anterior no fue observado, por lo tanto, para explicar el efecto de la UVR sobre los pigmentos del XC se plantea que el pigmento Dtx es degradado por la UVR. Se propone esto, ya que las concentraciones de los tres pigmentos precursores ($Zx \rightarrow Vx \rightarrow Ddx \rightarrow Dtx$) de la Dtx en las células aclimatadas a alta luz fueron mucho menores en PAR+UVR en comparación a PAR, pero la concentración de Dtx fue similar entre tratamientos (Tabla II). Calculando el balance del cambio de pigmentos del XC después de 60 min en PAR hubo un aumento de $29.9 \text{ mol} \cdot 100 \text{ mol}^{-1}$ Chl *a* del contenido total (Tabla II). Lo anterior confirma que hubo una síntesis *de novo* de estos pigmentos. Por otro lado, en PAR+UVR el cambio del contenido de pigmentos del XC después de la hora de exposición, fue de $13.9 \text{ mol} \cdot 100 \text{ mol}^{-1}$ Chl *a* (Tabla IX). Una de las posibles explicaciones a este menor incremento, es que la UVR afecta el proceso de síntesis *de novo* de pigmentos. Lo anterior no ha sido reportado en ningún otro estudio, por lo que debería ser confirmado con pruebas complementarias. Otra alternativa, es que en presencia de UVR ocurra una degradación y/o isomerización de algún pigmento del XC.

Dimier et al. (2007) proponen que la cantidad de pigmentos carotenoides precursores (β -caroteno+Vx+Ax+Zx) está ligada a la cantidad de Ddx, y viceversa. Cuánto menor sea la razón $[(\beta\text{-caroteno}+V_x+Ax+Z_x) / Ddx]$, ocurrirá una mayor acumulación de Ddx y una activación del ciclo de las xantofilas más rápido. En este trabajo, dicha proporción no mostró diferencias significativas entre las exposiciones PAR+UVR y PAR, pero sí entre las aclimataciones (datos no mostrados), siendo esta razón menor en células aclimatadas a HL en comparación con células LL. Esto coincide con la mayor capacidad de fotoprotección mostrada por la aclimatación a alta luz. La falta de diferencias en contenido total de pigmentos del XC entre exposiciones con y sin UVR en las células que crecieron en LL (Tabla IV) y la menor síntesis *de novo* (comparando ΣXC normalizada por el contenido de pigmentos al tiempo cero) en comparación a las células que crecieron en luz alta (Tabla IX), demostrarían que el UVR afecta los pigmentos del XC en mayor grado en las células HL que poseen mecanismos de fotoprotección más desarrollados.

II.4.4. Conclusiones

- Las exposiciones cortas a PAR+UVR tienen un efecto fotoinhibitorio sobre el PSII de *Phaeodactylum tricornutum*.
- La mayor reducción de la eficiencia cuántica máxima en presencia de UVR se debió principalmente a la afectación de los mecanismos de regulación rápida (XC) en células HL y a daño directo en el PSII en células LL.
- No se presentó un efecto negativo sobre la inducción de NPQ pero sí sobre la deepoxidación de pigmentos XC, de manera más pronunciada en las células aclimatadas a HL.

- El bloqueo de la deepoxidación de los pigmentos del XC con DTT demostró que la afectación del balance reparación-daño del PSII debido a la UVR no fue importante en la aclimatación HL, pero sí en la LL.
- El bloqueo de la reparación de la proteína D1 por CAP demostró que la afectación de los mecanismos fotoprotectivos y el daño directo al PSII debido a la UVR fue importante en HL. Lo anterior se reflejó en los valores de inducción y relajación de NPQ muy altos, que demostraron daño al PSII.
- El bloqueo simultáneo de la deepoxidación de los pigmentos del XC y de la reparación de la proteína D1 (DTT+CAP) demostró que el daño directo al PSII por UVR no fue importante.
- La síntesis *de novo* de pigmentos del XC se vió afectada negativamente por la UVR.

Por lo tanto, en células que presentaron mayor capacidad fotoprotectora, la fotoinhibición causada por la UVR en tiempos cortos de exposición, fue debida mayormente a la disminución de la capacidad fotoprotectora al PAR en comparación al efecto directo de esta radiación sobre el PSII. Por lo tanto, en tiempos cortos de exposición, el efecto de la UVR aumentó la susceptibilidad de daño debido al PAR.

La conclusión general de este estudio es que la UVR aumenta la susceptibilidad al daño por PAR en organismos que poseen una expresión elevada de los mecanismos de fotoprotección. El estudio de este efecto podría ser continuado en organismos que tengan expresado al máximo los procesos de disipación térmica, ya sea por aclimatación a mayores intensidades de luz o por aclimatación a luz intermitente.

II.5. Bibliografía

Andersson B. y Barber J. (1996) Mechanisms of photodamage and protein degradation during photoinhibition of photosystem II. *En* Baker N. (ed). Photosynthesis and the environment. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp. 101-121.

Arsalane W., Rousseau B. y Duval J. (1994) Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem Photobiol* 60: 237-243

Balaguer L., Pugnaire F., Martínez E., Armas C., Valladares F. y Manrique E. (2002) Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity in *Stipa tenacissima* L. *Plant and Soil* 240: 343-352

Bouchard J., Roy S., Ferreyra G., Campbell D. y Curtosi A. (2005) Ultraviolet-B effects on photosystem II efficiency of natural phytoplankton communities from Antarctica. *Polar Biol* 28: 607-618

Brand L., Guillard R. y Murphy L. (1981) A method for the rapid and precise determination of acclimated phytoplankton reproduction rates. *J. Plankton Res.* 3: 193-201

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

Demers S., Roy S., Gagnon R. y Viguanit 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 Progr Ser* 76: 185-193

Demmig B., Winter K., Kruger A. y Czygan F. (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

Dimier C., Corato F. Tramontano F. y Brunet C. (2007) Photoprotection and xanthophyll-cycle activity in three marine diatoms. *J Phycol* 43: 1-11

Falkowski P. (1983). Light-shade adaptation and vertical mixing of marine phytoplankton: A comparative study. *J Mar Res* 41:215

Falkowski P., Dubinsky Z. y Wyman K. (1985). Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr.* 30:311-21

Falkowski P. y La Roche J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *J Phycol.* 27:8-14

- Falkowski P., Katz M., Knoll A., Quigg A., Raven J., Schofield O. y Taylor F. (2003)** The evolution of modern phytoplankton. *Science* 305: 354–360
- Franklin L. y Forster R. (1997)** The changing irradiance environment: consequences for marine macrophyte physiology, productivity and ecology. *Eur J Phycol* 32: 207-232
- García-Mendoza E., Matthijs H., Schubert H. y Mur L. (2002)** Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions. *Photosynth Res* 74: 303–315
- García-Mendoza E., Dijkman N. y Röttgers R. (2005)** Ultraviolet radiation affects xanthophyll cycle activity in the diatom *Thalassiosira weissflogii*. En van der Est y Bruce (eds). Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives Proceedings of the 13th International Congress of Photosynthesis. International Society of Photosynthesis, pp. 515-517.
- García-Mendoza E. y Colombo-Pallota F. (2007)** The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different nonphotochemical quenching control than higher plants. *New Phytologist* 173: 526–536
- Gilmore A. (1997)** Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant* 99: 197–209
- Gilmore A. y 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
- Geider R., Osborne B. y Raven J. (1985)** Light dependence of growth and photosynthesis in *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 21:601-9
- Geider R., MacIntyre H. y Kana T. (1996)** A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 41:1–15
- Goss R., Mewes H. y Wilhelm C. (1999)** Stimulation of the diadinoxanthin cycle by UV-B radiation in the diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *Photosynth Res* 59: 73-80
- Govindjee (2002)** A role for a light-harvesting antenna complex of photosystem II in photoprotection. *Plant Cell* 14: 1663- 1668.
- Grouneva I., Jakob T., Wilhelm C. y Goss R. (2005)** Influence of ascorbate and pH on the activity of the xanthophylls cycle-enzyme diadinoxanthin de-epoxidase. *Physiol Plant* 126: 205–211
- Guillard R. y Ryther J. (1962)** Studies of marine planktonic diatoms: *I.C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Gran Can J Microbiol* 8: 229-238
- Hanelt D. (1996)** Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Scientia Mar* 60: 243-248

- Hanelt D.** (1998) Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar Biol* 131: 361-369
- Harris G., Scanlan D. y Geider R.** (2005). Acclimation of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) to photon flux density. *J Phycol* 41: 851-862
- Heraud P. y Beardall J.** (2000) Changes in chlorophyll fluorescence during exposure of *Dunaliella tertiolecta* to UV radiation indicate a dynamic interaction between damage and repair processes. *Photosynth Res* 63: 123-134
- Hofstraat J., Peeters J., Snel J. y Geel C.** (1994) Simple determination of photosynthetic efficiency and photoinhibition of *Dunaliella tertiolecta* by saturating pulse fluorescence measurements. *Mar Ecol Prog Ser* 103: 187-196
- Holt N., Fleming G. y Niyogi K.** (2004) Toward an understanding of the mechanism of the nonphotochemical quenching in green plants. *Biochemistry* 43: 8281-8289
- Horton P., Wentworth M. y Ruban A.** (2005) Control of the light-harvesting function of chloroplast membranes: the LHCII-aggregation model for non-photochemical quenching. *FEBS Lett* 579: 4201-4206
- Huisman J., Sharples J., Stroom J., Visser P., Kardinaal W., Verspagen J. y Sommeijer B.** (2004) Changes in turbulent mixing shift competition for light between phytoplankton species. *Ecology* 85: 2960-2970
- Jeffrey S. y Humphrey G.** (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen* 167: 191-194
- Jin E., Yokthongwattana K., Polle J. y Mellis A.** (2003) Role of the reversible xanthophyll cycle in the photosystem II, damage and repair cycle in *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 132: 352-364
- Kashino Y., Kudoh S., Hayashi Y., Suzuki Y., Odate T., Hirawake T., Satoh K. y Fukuchi M.** (2002) Strategies of phytoplankton to perform effective photosynthesis in the North Water. *Deep-Sea Res Pt II* 49: 5049-5061
- Kiefer, D.** (1973) Fluorescence properties of natural phytoplankton populations. *Mar Biol* 22: 263-269
- Kirk, J.** (1994). Optics of UV-B radiation in natural waters. *Arch Hydrobiol Beih Ergebn Limnol* 43: 1-16
- Kolber Z., Zehr J. y Falkowski P.** (1988) Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in Photosystem II. *Plant Physiol* 88: 923-929

Külheim C., Agren J. y Jansson S. (2002) Rapid regulation of light harvesting and plant fitness in the field. *Science* 297: 91–93

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

Lavaud J., Rousseau B. y Etienne A. (2003) Enrichment of the light-harvesting complex in diadinoxanthin and implications for the nonphotochemical fluorescence quenching in diatoms. *Biochemistry* 42: 5802-5808

Lavaud J., Rousseau B. y Etienne A. (2004) General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *J Phycol* 40: 130–137

Lavaud J. y Kroth P. (2006) In diatoms, the transthylakoid proton gradient regulates the photoprotective non-photochemical fluorescence quenching beyond its control on the xanthophyll cycle. *Plant Cell Physiol* 47: 1010–1016

Lavaud J., Strzeppek R. y Kroth P. (2007) Photoprotection capacity differs among diatoms: Possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnol Oceanog* 52(3): 1188–1194

Lohr M. y Wilhelm C. (1999) Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96: 8784–8789

Lohr M. y Wilhelm C. (2001) Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 212: 382–91

MacIntyre H., Kana T., Anning T. y Geider R. (2002) Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol* 38: 17–38

MacIntyre H. y Cullen J. (2005) Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. *En Andersen R.* (ed). *Algal Culture Techniques*. Phycological Society of America, pp. 287-326.

Marshall J. y Newman S. (2002) Differences in photoprotective pigment production between Japanese and Australian strains of *Chattonella marina* (Raphidophyceae). *J Exp Mar Biol Ecol* 272: 13–27

Mewes H. y Ritcher M. (2002) Supplementary ultraviolet-B radiation induces a rapid reversal of the diadinoxanthin cycle in the strong light-exposed diatom *Phaeodactylum tricornerutum*. *Plant Physiol* 130: 1527-1535

- Mitrovic S., Howden C., Bowling L. y Buckney R.** (2003) Unusual allometry between in situ growth of freshwater phytoplankton under static and fluctuating light environments: Possible implications for dominance. *J Plankton Res* 25: 517–526
- Montero O., Sobrino C., Parés G. y Lubián L.** (2002) Fotoinhibición y recuperación de cinco microalgas con clorofila *c* tras breves exposiciones selectivas a la radiación solar. *Ciencias Marinas* 28: 223-236
- Morosinotto T., Caffarri S., Dall'Osto L. y Bassi R.** (2003) Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Physiol Plant* 119: 347–354
- Müller P., Li X. y Niyogi K.** (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558–1566
- Müller-Moule P., Conklin P. y Niyogi K.** (2002) Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity in vivo. *Plant Physiol* 128: 970–977
- Neubauer C.** (1993) Multiple effects of dithiothreitol on nonphotochemical fluorescence quenching in intact chloroplasts. *Plant Physiol* 103: 575-583
- Neale P., Banaszak A. y Jarriel C.** (1998). Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): Myscoporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J Phycol* 34: 928-938
- Niyogi K.** (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333–359
- Okada K., Satoh K. y Katoh S.** (1991) Chloramphenicol is an inhibitor of photosynthesis. *FEBS* 295: 155-158
- Olaizola M. y Yamamoto H.** 1994. Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 30: 606.
- Olaizola M., La Roche J., Kolber Z. y Falkowski P.** (1994) Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom *Photos Res* 41: 357-370
- Olson R., Vaultot D. y Chrisholm S.** (1985) Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res I* 50: 301-315
- Osmond C.** (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. *En: Baker NR, Bowyer JR (eds). Photoinhibition of photosynthesis, from the molecular mechanisms to the Field. BIOS Scientific Publ, Oxford, pp. 1-24*
- Parkhill, J., Maillet G. y Cullen J.** (2001) Fluorescence-based maximal quantum yield for PS II as a diagnostic of nutrient stress. *J Phycol* 37: 517-529

- Pfündel E., Pan R. y Dilley R.** (1992) Inhibition of violaxanthin de-epoxidation by ultraviolet-B radiation in isolated chloroplasts and intact leaves. *Plant Physiol* 98: 1372–1380
- Pfündel E. y Bilger W.** (1994) Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photos Res* 42: 89-109
- Renger G., Volker M., Eckert J., Fromme R., Hohm-Veit S. y Graber P.** (1989) On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B radiation. *Photochem Photobiol* 49: 97-105
- Rodríguez F., Chauton M., Johnsen G., Andresen K., Olsen L. y Zapata M.** (2006) Photoacclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Mar Biol* 148: 963–971
- Ruban A., Lavaud J., Rousseau B., Guglielmi G., Horton P. y Etienne A.** (2004). The super-excess energy dissipation in diatom algae: comparative analysis with higher plants. *Photos Res* 82: 165-175
- Sakshaug E., Demers S. y Yentsch C.** (1987). *Thalassiosira oceanica* and *T. pseudonana* : Two different photoadaptational responses. *Mar Ecol Prog Ser* 41: 275-282
- Shelly K., Heraud P. y Beardall J.** (2003) Interactive effects of PAR and UV-B radiation on PSII electron transport in the marine alga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J Phycol* 39: 509-512
- Schreiber U., Bilger W. y Neubauer C.** (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *En: Schulze, E., M. Caldwell* (eds). *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin, p.49.
- Sobrino C., Neale P., Montero O. y Lubián L.** (2005) Biological weighting function for xanthophylls de-epoxidation induced by ultraviolet radiation. *Physiol Plant* 125: 41–51
- Soto K., Collantes G., Zahr M. y Kuznar J.** (2005). Enumeración simultánea del crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* (MLB292) y bacterias en comunidades mixtas. *Investig mar* 33: 143-149
- Stroch M., Spunda V. y Kurasová I.** (2004) Non-radiative dissipation of absorbed excitation energy within photosynthetic apparatus of higher plants. *Photosynthetica* 42 (3): 323-337
- Suggett D., MacIntyre H. y Geider R.** (2004) Evaluation of biophysical and optical determinations of light absorption by photosystem II in phytoplankton. *Limnol Oceanogr Methods* 2:316–32

Ting C. y Owens T. (1993) Photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 101: 1323-1330

Ting C. y Owens T. (1994) The effects of excess irradiance on photosynthesis in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 106: 763-770

Tozzi S., Schofield O., y Falkowski P. (2004). Historical climate change and ocean turbulence as selective agents for two key phytoplankton functional groups. *Mar Ecol Prog Ser* 274: 123-132

Turcsanyi E.y Vass I. (2000) Inhibition of photosynthetic electron transport by UV-A radiation targets the photosystem II complex. *Photochem Photobiol* 72: 513-520

van Heukelem, L. y Thomas C. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *J Chromatogr* 910: 31-49.

van de Poll W., Alderkamp A., Janknegt P., Roggeveld J. y Buma A. (2006) Photoacclimation modulates excessive photosynthetically active and ultraviolet radiation effects in a temperate and a Antarctic marine diatom. *Limnol Oceanog* 51: 1239-1248

Wagner H., Jakob T., y Wilhelm C. (2006). Balancing the energy flow from captured light to biomass under fluctuating light conditions. *New Phytol.* 169: 95-108

Wood A., Everroad R. y Wingard L. (2005) Measuring growth rates in microalgal cultures. *En Andersen R.* (ed). *Algal Culture Techniques*. Phycological Society of America, pp. 269-285.

Yamamoto H. y Kamite L. (1972) The effects of dithiothreitol on violaxanthin de-epoxidation and absorbance changes in the 500-nm region. *Biochim Biophys Acta* 267: 538-543