

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



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

**MECANISMOS DE DISIPACION NO FOTOQUIMICA EN DIONFLAGELADOS
SIMBIONTES DE LA ANEMONA *Anthopleura elegantissima***

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

Presenta:

Luis Lombardo Cifuentes

RESUMEN de la tesis de Luis Lombardo Cifuentes, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, Julio de 2011

MECANISMOS DE DISIPACION NO FOTOQUIMICA EN DINOFLAGELADOS SIMBIONTES DE LA ANEMONA *Anthopleura elegantissima*

Resumen aprobado por:

Dr. Ernesto García Mendoza
Director de Tesis

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* conviven en una relación simbiótica con varios phyla de invertebrados, encontrándose ampliamente distribuido entre los cnidarios. A pesar de que la simbiosis ofrece una ventaja metabólica de ambos miembros de la asociación, el comportamiento bentónico del hospedero puede representar un obstáculo en el desempeño fotosintético de sus simbioses. La condición simbiótica de los dinoflagelados puede dar lugar a la exposición a irradiancias saturantes que conducen a la sobre excitación de la maquinaria fotosintética y la formación radicales libres de oxígeno (RLS). Con el fin de disminuir la formación de RLS, los dinoflagelados, al igual que todos los autótrofos oxigénicos, han desarrollado mecanismos capaces de disipar el exceso de energía independiente de la fotoquímica conocido como decaimiento no fotoquímico (NPQ). En plantas vasculares, donde se ha generado la mayor investigación de NPQ, tres componentes diferentes han sido descritos como mecanismos de fotoprotección, siendo el ciclo de las xantofilas (CX) un elemento clave en la disipación del exceso de energía. Al recibir la energía proveniente de las clorofilas en los complejos colectores de luz, este mecanismo es capaz de disipar el 85% de la energía capturada en forma de calor y su reversibilidad permite una respuesta rápida y flexible a los cambios ambientales.

En diatomeas y dinoflagelados existe un ciclo de xantofilas homólogo al que presentan plantas superiores. En diatomeas, la disipación de energía depende directamente de la actividad de este ciclo. Sin embargo existen diferencias fisiológicas entre dinoflagelados y diatomeas por lo cual, el funcionamiento de este ciclo presenta variaciones entre ambos grupos.

Los dinoflagelados tienen un tipo único de antena compuesta principalmente por peridinina, un carotenoide que no se encuentran en cualquier grupo algal cuya importancia fotobiológica aún no ha sido dilucidada. Los componentes y la regulación de los mecanismos NPQ para este grupo son totalmente desconocidos hasta la fecha. El objetivo de esta tesis fue caracterizar los componentes del NPQ en dinoflagelados y evaluar el aporte del CX en este proceso. Los resultados del análisis de la inducción del NPQ y la interconversión de pigmentos del CX muestran una relación directa entre la actividad de este ciclo y la disipación de energía ($r=0.94$). Los resultados muestran una cinética de activación lenta, lo que sugiere que la protonación de los complejos de recolección de luz necesaria para lograr la disipación de energía en otros grupos no es necesaria. De igual manera, el análisis de la inducción de los mecanismos de NPQ sugiere que incluso cuando existe una relación directa entre el estado de-epoxidación de los pigmentos del CX y la inducción del NPQ, un segundo mecanismo, presumiblemente la separación parcial del antena del FSII actúa en forma sinérgica con el CX para disipar el exceso de energía. A través de protocolos de excitación del FSI y el uso de inhibidores se hicieron evidentes mecanismos capaces de reducir y oxidar al conjunto de plastoquinonas asociados a la actividad del FSI. Estos resultados demuestran las diferencias de los mecanismos de regulación de los mecanismos de NPQ entre dinoflagelados y organismos con el mismo tipo de CX, principalmente diatomeas.

Palabras clave: Fotoprotección, Ciclo de las Xantofilas, Disipación de energía

ABSTRACT of the thesis presented by Luis Lombardo Cifuentes as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, México, June 2011

NON PHOTOCHEMICAL QUENCHING MECHANISMS IN SYMBIOTIC DINOFLAGELLATES FROM THE ANEMONE *Anthopleura elegantissima*.

Dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* coexist in a symbiotic relation with various phyla of invertebrates, being widely distributed among cnidarians. Spite the fact that the symbiosis offers a metabolic advantage to both members of the association, the benthic behavior of the host can represent a constraint in the photosynthetic performance of their symbionts. The symbiotic condition of the dinoflagellates may result in the exposure to saturating irradiances that lead to the over excitation of the photosynthetic machinery and the formation of radical oxygen species (ROS). In order to diminish the formation of ROS, dinoflagellates, such as all oxygenic autotrophs have evolved mechanisms able to dissipate the excess energy independently of the photochemical quenching known as non photochemical quenching (NPQ). In vascular plants, where most NPQ research has been done, three different components have been described as photoprotective mechanisms, being the xanthophyll cycle (XC) a key element in the excess energy dissipation. By quenching the chlorophylls in the light harvesting antennas, this mechanism is able to dissipate 85% of the captured energy as heat and its reversibility enables a fast and resilient response to environmental changes. Dinoflagellates have a unique kind of antenna composed primarily by peridinin, a carotenoid not found in other algal groups and whose photobiologic significance has not yet been elucidated. The components and regulation of the NPQ mechanisms for this group are totally unknown to date. The purpose of this thesis was first to characterize the activation and deactivation of photoprotective mechanisms associated to the NPQ of chlorophyll fluorescence and to evaluate the input the XC in this process. The results of fluorescence quenching and pigment analysis show similar values but a different behavior than that shown by other organisms with the same kind of XC. The results show slow activation kinetics, suggesting that the protonation of the light harvesting complexes necessary to achieve efficient energy dissipation in other groups is not necessary, even though conformational changes not associated with this process were detected. The fluorescence analysis suggests that even when a direct relation exists between the de-epoxidation state of the xanthophyll pool and NPQ values, a second mechanism, presumably q_T , is acting in a synergetic way with the XC to dissipate excess energy. Through *Far Red* excitation protocols and inhibitors the input of an alternate energetic pathway limited by the linear energy flux was evident, indicating a mechanism able to reduce the plastoquinone pool in darkness associated with PSI. These results demonstrate the unlikeness of the regulation mechanisms in dinoflagellates with organisms with the same kind of XC, mainly diatoms.

Keywords: Photoprotection, Xanthophyll cycle, Energy dissipation

Agradecimientos:

Gracias a CONACYT y CICESE por la beca y la oportunidad.

Contenido	Página
I. Introducción.....	1
I.2. Antecedentes.....	3
I.2.1. Fotodaño.....	5
I.2.2 Regulación Fotosintética.....	6
I.3. Justificación.....	10
II. Hipótesis.....	12
III. Objetivos.....	12
III.1. Objetivo general.....	12
III.2. Objetivo particular.....	12
IV. Materiales y Métodos.....	13
IV.1. Colecta de muestras.....	13
IV.2. Extracción de Simbiontes.....	13
IV.3. Mediciones de Fluorescencia.....	13
IV.4. Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC).....	16
IV.5 Aproximaciones experimentales.....	17
V. Resultados.....	17
V.1. Activación y Desactivación de NPQ.....	18
V.1.1. Inducción de NPQ bajo distintas irradiancias.....	20
V.1.2. Disipación de NPQ en oscuridad.....	23

Contenido (continuación)	Página
V.2. Interconversión de pigmentos de ciclo de las xantofilas.....	23
V.2.1. De-epoxidación de pigmentos del CX en luz.....	25
V.2.2 Epoxidación de pigmentos del CX en oscuridad.....	25
V.3. Relación NPQ y Ciclo de las Xantofilas.....	28
V.4 Inducción de NPQ en presencia de inhibidores del CX y de la formación del Δ pH.....	29
V.5.Efecto del estado redox de la cadena de transporte de electrones sobre la reducción de la fluorescencia independiente al CX y Δ pH.....	32
V.5.1. Efecto de la iluminación tipo Rojo Lejano.....	32
V.5.2.Efecto de la inhibición del FSII sobre la inducción del NPQ.....	40
VI. Discusión.....	45
VI.1. Inducción y disipación del NPQ.....	46
VI.2.De-epoxidación y epoxidación de pigmentos del CX.....	48
VI.3.Relación NPQ y CX.....	44
VI.4 Inducción de NPQ en presencia de inhibidores del CX, formación del Δ pH y FSII e iluminación RL.....	49
VII. Conclusión.....	60
VIII. Bibliografía.....	61

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Vías de des-excitación de energía capturada por la clorofila <i>a</i>	14
2	Análisis de quenching. Ejemplo de la variación de la fluorescencia de <i>Chl a</i> en una hoja de <i>Arabidopsis</i> expuesta a luz y oscuridad.....	15
3	Tasa de transporte de electrones relativa del FSII en simbiontes expuestos a diferentes irradiancias.....	18
4	Inducción de la disipación de la fluorescencia por procesos no fotoquímicos (NPQ; F_m-F_m'/F_m') en dinoflagelados simbiontes recién aislados de la anémona <i>Anthopleura elegantissima</i> expuestos a distintas irradiancias por 20 min.....	19
5	Inducción de la disipación de la fluorescencia por procesos no fotoquímicos (NPQ; F_m-F_m'/F_m') en dinoflagelados simbiontes recién aislados iluminados con $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$	20
6	Disipación de NPQ en dinoflagelados simbiontes recién aislados en condiciones de oscuridad después de ser expuestos a distintas irradiancias por 20 min.....	21
7	NPQ detectado en simbiontes recién aislados mantenido en oscuridad por 15 min una vez expuestos a diferentes irradiancias por 20 min. Se presenta el NPQ normalizado por el valor máximo detectado después de 20 min de exponer a los organismos a distintas irradiancias.....	22
8	Concentración de diadinoxantina y diatoxantina normalizados por la concentración de clorofila <i>a</i> en moles en dinoflagelados simbiontes recién aislados expuestos a 20 y 60 min	24
9	Variación del estado de de-epoxidación de pigmentos del CX en dinoflagelados simbiontes recién aislados expuestos por 20 y 60 min de iluminación saturante.....	25
10	Concentración de diadinoxantina (círculos rojos) y diatoxantina (círculos verdes) normalizados por la concentración de clorofila <i>a</i> en moles de dinoflagelados simbiontes recién aislados expuestos a 30 min de luz y	26

Figura

Lista de Figuras (Continuación)

Página

11	Estado de de-epoxidación en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 min y dejados en condiciones de oscuridad por 15 min.....	28
12	Relación entre NPQ y la concentración de diatoxantina en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una iluminación de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y expuestos a $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 min y dejados en oscuridad por 15 min.....	29
13	Inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos expuestos por 20 minutos en luz ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 10 minutos en oscuridad en presencia de NH_4Cl , DTT y DTT+ NH_4Cl	31
14	Efecto de la ruptura del gradiente de protones en la inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos después de 20 minutos bajo iluminación de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	32
15	Inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos por 20 minutos en luz ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 10 minutos en oscuridad con y sin iluminación Rojo Lejano.....	34
16	Inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos por 20 minutos en luz ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 10 minutos en oscuridad con y sin iluminación Rojo Lejano en presencia de NH_4Cl	35
17	Cinética de decaimiento de fluorescencia de clorofila a en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 minutos y 10 minutos en oscuridad en presencia de NH_4Cl +DTT sin iluminación <i>Rojo Lejano</i>	37
18	Cinética de decaimiento de fluorescencia de clorofila a en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 minutos y 10 minutos en oscuridad en presencia de NH_4Cl con y sin iluminación <i>Rojo Lejano</i>	38

Figura	Lista de Figuras (Continuación)	Página
19	Cinética de decaimiento de fluorescencia de clorofila <i>a</i> en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una irradiancia de 1000 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ por 20 minutos y 10 minutos en oscuridad en presencia de DTT con y sin iluminación <i>Rojo Lejano</i>	39
20	Variación de la fluorescencia de <i>Chl a</i> del FSII de simbiotes recién aislados expuestos a 1000 $\mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ por 20 min en presencia de distintos inhibidores.....	41
21	Decaimiento de la fluorescencia de <i>Chl a</i> en simbiotes incubados con DCMU y expuestos a distintas irradiancias.....	44
22	Modelo de las vías de reducción de los acarreadores de electrones.....	53
23	NPQ calculado a partir de la cinética de decaimiento de la fluorescencia de <i>Chl a</i> en simbiotes recién aislados expuestos a 1000 $\mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ por 20 min en presencia de distintos inhibidores.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Chl a = Clorofila "a"

DCMU = (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea)

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

Ddx = diadinoxantina.

Dtx = diatoxantina.

DTT = ditioneitol.

ETR = tasa del transporte lineal de electrones.

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

F'_m = fluorescencia máxima en células expuestas a luz.

ΔpH = Gradiente de protones formado a través de la membrana tilacoide.

NPQ = "quenching" (disipación) no fotoquímico.

FSI = fotosistema I.

FSII = fotosistema II.

RL = iluminación tipo rojo lejano.

RLO = radicales libres de oxígeno.

qE = componente de alta energía de NPQ dependiente de la energía.

qI = componente de disipación lenta de debido a la fotoinhibición.

qT = componente de relajación lenta del NPQ debido a la separación de parte de la antena.

Vx = violaxantina.

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

CX = ciclo de las xantofilas.

ΣXC = Sumatoria de pigmentos del ciclo de las xantofilas: [Ddx]+[Dtx]

Zx= zeaxantina,

I.1. Introducción

Las anémonas del género *Anthopleura* son los cnidarios bénticos más abundantes en la costa occidental de América del Norte, representando un componente dominante en el intermareal rocoso (Mueller-Parker *et al.* 2007). Las anémonas del género *Anthopleura*, al igual que miembros de por lo menos 5 phyla de invertebrados presentan una relación simbiótica con dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium* (Banaszak y Trench 1995). Los dinoflagelados coexisten con los cnidarios en una relación endosimbiótica alojados en las células gastrodérmicas del hospedero, principalmente en los tentáculos (Trench 1997).

El carbono fijado vía fotosíntesis por los dinoflagelados es trasladado por difusión al hospedero en forma de distintas moléculas, principalmente glicerol, que puede significar distintos porcentajes del metabolismo basal del hospedero en función del carbono obtenido por cacería activa (Muscatine 1990). Al igual que el carbono, los radicales libres de oxígeno (RLO) generados por la sobreexcitación de la maquinaria fotosintética de los simbioses también pueden difundirse hacia las células del hospedero (Lesser 1997). En caso de luz excesiva, la generación de RLO aumenta y es importante para los dinoflagelados evitar la formación de estas moléculas, ya que su acumulación puede ocasionar la inactivación parcial o total de la maquinaria fotosintética y se ha propuesto que su difusión al hospedero puede afectar la estabilidad de la simbiosis (Aro *et al.* 1993; Warner *et al.* 1999).

Los organismos autótrofos presentan varios mecanismos de fotoprotección que actúan desde distintos niveles del proceso de transferencia de energía a través de la maquinaria fotosintética, minimizando la producción de RLO. Uno de los principales mecanismos de fotoprotección es la disipación térmica del exceso de energía en aparato fotosintético (Demmig-Adams *et al.* 1992). Este proceso se monitorea mediante la señal de fluorescencia emitida por la clorofila *a* del centro de reacción del fotosistema II (FSII). La reducción o "queching" independiente de la fotoquímica (NPQ; por sus siglas en inglés) de la señal de fluorescencia del FSII

se utiliza como proxy para medir la disipación térmica en este sistema. Se han identificado tres componentes que afectan la señal de la fluorescencia del FSII y como consecuencia el NPQ en plantas superiores (Muller *et al.* 2001). El principal mecanismo denominado qE (dependiente de la energía o “energy dependent quenching”), está asociado a la inducción de mecanismos involucrados en la disipación térmica en el FSII. Uno de los procesos más importantes en la disipación de energía en forma de calor se lleva a cabo por la interacción de los pigmentos de-epoxidados del ciclo de las xantofilas (CX) con las clorofilas de las antenas captadoras de energía (Demmig-Adams *et al.* 1992; Niyogi 1999). El CX es la síntesis del carotenoide zeaxantina (Zx) mediante la de-epoxidación del di-epóxido violaxantina vía el mono-epóxido anteraxantina en condiciones de alta luz y la conversión de este pigmento a violaxantina (Vx) se lleva a cabo en condiciones de baja luz u oscuridad (Yamamoto *et al.* 1962). Aún cuando el CX no es el único mecanismo que interviene en la expresión total del NPQ, la síntesis de zeaxantina es fundamental para inducir la disipación térmica, disminuyendo un 40% del NPQ en plantas superiores y algas verdes en caso de verse inhibida su síntesis o hasta el 100% en algas pardas y diatomeas (Olaizola *et al.* 1994; Niyogi *et al.* 2005; García-Mendoza *et al.* 2007).

El CX es un elemento importante en la fotoaclimatación y fotoprotección de los organismos y es una característica altamente conservada al encontrarse en 7 de las 11 divisiones de organismos fototróficos eucariontes. La conversión de Violaxantina a Zeaxantina se presenta en la mayoría de estas divisiones pero existe un ciclo homólogo que requiere de una sola de-epoxidación para formar el pigmento fotoprotector. Este ciclo se encuentra en diatomeas, dinoflagelados y otros grupos algales (Goss *et al.* 2010) e involucra la formación del carotenoide diatoxantina (Dtx) mediante la de-epoxidación de la diadinoxantina (Ddx) en condiciones de alta luz. Al igual que el ciclo Vio- Zea, la conversión de Dtx a Ddx se lleva a cabo mediante la epoxidación de los carotenoides en condiciones de baja luz. El funcionamiento del CX y su relación con la inducción de NPQ ha sido

ampliamente descrito para diatomeas. Se ha reportado que la disipación del exceso de energía está asociada a la actividad de este ciclo para este grupo (Goss *et al.* 2010). En contraste, esta relación no ha sido estudiada en dinoflagelados. Se ha reportado que la actividad de este ciclo se correlaciona con el decaimiento a lo largo del día en la fotosíntesis máxima potencial así como con un incremento en los valores de NPQ en dinoflagelados simbiotes (Warner *et al.* 1999) por lo cual, al igual que en otros grupos algales, se le considera un mecanismo de fotoprotección (Brown *et al.* 1999). Sin embargo, en dinoflagelados no se ha estudiado la cinética de inducción del NPQ y la interconversión de los pigmentos involucrados en el CX y si estos dos procesos están relacionados entre sí.

Las diferencias tanto en la estructura como en la composición pigmentaria de los complejos colectores de luz entre grupos algales, así como las diferencias ecológicas suponen diferencias en los mecanismos de regulación. Con este trabajo se pretende caracterizar la actividad del ciclo de las xantofilas como mecanismo de fotoprotección al igual que evaluar su participación en el NPQ en dinoflagelados simbiotes de anémonas del género *Anthopleura*.

1.2 Antecedentes

Las anémonas del género *Anthopleura* son un componente importante de la zona intermareal desde las costas de Alaska en Estados Unidos, hasta la parte central de Baja California, México (Verde y Mckloskey 1996). Estos organismos mantienen relaciones simbióticas con diferentes especies de microalgas a lo largo de su distribución. En específico, su relación simbiótica con dinoflagelados representa una ventaja tanto ecológica como fisiológica para la asociación (Muscatine 1990; Verde y Mckloskey 1996, 2001; Layeunesse *et al.* 2004). Hasta un 50% del carbono fijado vía fotosíntesis por parte de los dinoflagelados simbiotes es traslocado en forma de distintos compuestos orgánicos por difusión al hospedero llegando a representar hasta 100% de los requerimientos basales de la asociación (Engebretson *et al.* 1999; Muscatine 1990).

El grado de dependencia de la anémona hacia el carbono traslocado por los simbioses depende de la cantidad de carbono que es capaz de obtener el cnidario por cacería activa (Muscatine 1990). En los ecosistemas arrecifales, con aguas pobres en nutrientes, la simbiosis depende totalmente del carbono traslocado por los dinoflagelados por lo cual la ruptura de esta relación puede significar la muerte de la colonia coralina (Hoegh-Guldberg 1999.) En estos ecosistemas el incremento en la temperatura superficial del mar combinado con una alta irradiancia significan condiciones no óptimas para la estabilidad de la simbiosis y puede ocasionar la disrupción de la misma. Bajo condiciones de estrés, la producción de radicales libres de oxígeno en el simbiote aumenta ocasionando la desestabilización de la simbiosis y generando un proceso denominado blanqueamiento (Hoegh-Guldberg 1999; Downs *et al.* 2002), el cual se caracteriza por la pérdida del simbiote y/o los pigmentos de estos dejando el tejido transparente del pólipos (Jackson y Johnson 2001).

Debido a las variaciones en el nivel del mar, las anémonas que habitan en el supramareal están expuestas continuamente a irradiancias y temperaturas estresantes por distintos periodos de tiempo dependiendo de la época del año (Verde y Mckloskey 1996; Mueller-Parker *et al.* 2001; Mueller-Parker *et al.* 2007). El efecto sinérgico del estrés por luz y temperatura ha sido reportado como el factor principal que causa la disrupción de la simbiosis entre cnidarios y dinoflagelados (Gates *et al.* 1992; Lesser 1997). El fotodaño en los dinoflagelados además de reducir su capacidad de proveer al pólipos los productos necesarios para la estabilidad de la simbiosis, afecta la maquinaria fotosintética incrementando la formación de radicales libres de oxígeno (Hoegh-Guldberg 1999). Los RLO a su vez causan disrupciones en la maquinaria fotosintética, que conllevan al incremento en el fotodaño, por lo que si este no es reparado o si no existe un mecanismo de fotoprotección adecuado, puede existir una inactivación parcial o total de la actividad fotosintética (Anderson *et al.* 1996). En caso de que las condiciones no óptimas sean prolongadas, los radicales libres producidos en la maquinaria fotosintética de los simbioses pueden difundirse al hospedero,

causando así la ruptura de la simbiosis (Lesser 1997).

1.2.1. Fotodaño

El fotosistema II (FSII) es el componente más susceptible del aparato fotosintético a la acción de los radicales libres, incrementándose su vulnerabilidad cuando existe estrés térmico y lumínico (Anderson *et al.* 1996; Warner *et al.* 1999). El daño y la formación de radicales libres en el FSII se presenta dentro del centro de reacción, sitio en donde se procesa la energía capturada por la clorofila *a* (Chl *a*) para la fotólisis del agua. El daño ocurre principalmente en la proteína D1, la cual en conjunto con la proteína D2 forma el centro de reacción del FSII y es el sitio de unión de uno de los principales acarreadores de electrones, la plastoquinona (Warner *et al.* 1999). El daño en la proteína D1 evita que la energía capturada por las clorofilas y otros pigmentos del FSII fluya hacia el fotosistema I (FSI) ocasionando la acumulación de energía dentro del centro de reacción del FSII. La acumulación de energía dentro los centros de reacción del FSII aumenta la probabilidad de formación del estado triplete de la clorofila *a* ($^3Chl^*$) capaz de reaccionar con cualquier molécula cercana a esta. Específicamente el estado triplete, con un tiempo de vida relativamente largo en comparación con el estado excitado singulete de esta molécula, reacciona con O_2 para formar 1O_2 (oxígeno singulete) que es un radical libre altamente tóxico y permeable en membranas biológicas (Aro *et al.* 1993).

Cuando la concentración de radicales libres se incrementa, la tasa de daño de D1 es menor que tasa de reparación, lo que ocasiona una reducción en la actividad fotosintética, ya que existe una reducción en la cantidad de centros de reacción disponibles para realizar fotosíntesis. Este fenómeno se le conoce como fotoinhibición. El cierre de centros de reacción durante el día es un patrón que se observa en la mayoría de organismos fotosintéticos asociado a la formación de RLO en condiciones de luz. El daño en los centros de reacción es reparado al final del fotoperiodo en condiciones de baja intensidad lumínica (Aro *et al.* 1993;

Anderson *et al.* 1996). Ya que la capacidad fotosintética está asociada a la cantidad de centros de reacción funcionales, la relación entre la tasa de daño y la tasa de reparación de los centros de reacción y los procesos que están involucrados en estas son fundamentales en la regulación de la fotosíntesis (Aro *et al.* 1993; Anderson *et al.* 1996).

1.2.2. Regulación Fotosintética

El exceso de energía en el FSII puede ser disipado en forma de calor (qE), lo cual se refleja en una disminución de la emisión de la clorofila *a* del FSII independiente a la fotosíntesis (NPQ) (Muller *et al.* 2001). En la mayoría de los organismos fotosintéticos eucariontes, la disipación de energía en forma de calor está asociada a la síntesis de pigmentos del ciclo de las xantofilas (Niyogi 1999). Este mecanismo puede llegar a disipar hasta el 75% de los fotones absorbidos y debido a su reversibilidad ofrece una respuesta rápida a las condiciones cambiantes del medio (Niyogi 1999).

En plantas superiores, que es en donde se ha desarrollado la mayor investigación al respecto, la activación del qE está asociada a un descenso del pH en la parte del lumen de la membrana tilacoidal debido a la liberación de protones provenientes de la fotólisis del agua y del bombeo de los mismos desde el estroma de la membrana. Esto ocasiona la formación de un gradiente de protones (ΔpH) que induce la protonación de proteínas de la antena del FSII, principalmente la proteína PsbS. La protonación de esta proteína, provoca la disociación parcial de la antena periférica del FSII (Horton *et al.* 2008). La reorganización de los complejos colectores de luz logra formar un estado capaz de disipar el exceso de energía en segundos. De igual manera, la reducción del pH del lumen provoca la liberación de la violaxantina de su punto de unión con los complejos colectores de luz y la activación de la enzima violaxantina de-epoxidasa (VDE) responsable de la conversión del carotenoide violaxantina a zeaxantina (Younge 1997; Muller *et al.* 2001). La Zx vuelve a unirse al sitio correspondiente de la Vx en los complejos colectores de luz (Peers *et al.* 2009). La unión de la Zx induce la formación del

par molecular Chl-Zx, capaz de disipar la energía recibida en forma de calor. Por otro lado, se ha propuesto que la zeaxantina puede generar cambios alostéricos en el complejo colector de luz que induce la disipación de energía ya que la cercanía de las moléculas de *Chl a* y luteína promueve la transferencia de la energía entre estas y la disipación de calor se da a través de este carotenoide (Morosinoto *et al.* 2003). Los cambios conformacionales en combinación con el ciclo de las xantofilas hacen posible la formación de un estado “disipador” de la antena con altos niveles de disipación térmica y poco eficientes en la transferencia de energía hacia el centro de reacción del FSII (Muller *et al.* 2001; Horton *et al.* 2005). La formación del ΔpH funciona como mecanismo de regulación del qE. Una vez establecido este proceso en luz, la desactivación de qE en plantas superiores está asociada a la desaparición del ΔpH , y esto se observa en los primeros minutos en oscuridad como una disminución de la mayor parte del NPQ (Morosinotto *et al.* 2003). Posteriormente, existe una reducción lenta del NPQ asociada a la epoxidación de pigmentos del ciclo de las xantofilas.

Además del qE existen otros mecanismos que pueden afectar la emisión de fluorescencia del FSII por lo que se ven reflejados en la cinética de inducción del NPQ. En plantas superiores y algunos grupos algales se ha descrito la separación reversible del complejo de la antena principal (LHCII), lo que se denomina estados de transición y su efecto en el NPQ se conoce como qT. La función de los estados de transición es permitir a los organismos responder a cambios en las condiciones de luz a través de la redistribución de la energía de excitación entre el FSII y el FSI. Mediante la asociación/disociación del complejo de la antena principal (LHCII) se logra balancear la capacidad de absorción de luz de los dos fotosistemas (Baroli *et al.* 2003)

En plantas superiores los estados de transición consisten de 3 pasos que conllevan al balance de energía entre el FSII y FSI. La excitación preferencial del FSII lleva a un cambio en el estado redox del pool de plastoquinonas, que funciona como activador de quinasas destinadas a fosforilar los complejos

colectores de energía unidos al FSII. El complejo fosforilado sufre cambios conformacionales que llevan a la difusión de este a través de la membrana tilacodidal. La unión del complejo fosforilado con el FSI completa el mecanismo de qT (transición de estado 2 a estado 1). Este es un proceso reversible, en condiciones de baja luz o mediante excitación preferencial del FSI que conlleva a la reducción del pool de plastoquinol y a la liberación del complejo de antena asociado con el FSI (estado 1 a estado 2) (Bellafiore *et al.* 2005).

Los estados de transición también están bien caracterizados en algas verdes y al igual que en plantas superiores involucran la migración de complejos de antena del FSII al FSI. En algas verdes se ha reportado que el estado redox del pool de PQ regulado por el flujo lineal de electrones actúa para modular estos estados de transición. A su vez, se ha reportado que en condiciones de alta luz algunos de los mecanismos de regulación son suprimidos acelerando la reducción del pool de plastoquinonas, la cual regula la activación de los estados de transición.

En organismos que presentan el ciclo de DdX a Dtx existen diferencias en el control de qE en comparación con plantas superiores. En diatomeas, por ejemplo, no existen proteínas homólogas a la PsbS, la cual es fundamental para la inducción de NPQ en plantas superiores (Niyogi *et al.* 2005). Asimismo, no se ha comprobado si existe protonación de algún complejo colector de luz que influya en la inducción de qE (Goss *et al.* 2006; Goss *et al.* 2010). De igual manera, existen diferencias en el nivel de de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas, siendo mayor en plantas superiores. En contraste, el NPQ alcanzado por diatomeas pueden alcanzar valores de 10 unidades mientras que en plantas superiores se registran valores de 4 (Demmig-Adams y Adams 1996; Goss *et al.* 2010). Se ha reportado una mayor sensibilidad de las diatomeas al dithiothreitol (DTT), el inhibidor de la de-epoxidación del CX, lo cual indica una alta dependencia de este ciclo en la inducción del NPQ en este grupo comparado con en plantas superiores (Olaizola *et al.* 1994). Otra diferencia importante en el

control de qE de las diatomeas en comparación a las plantas superiores, es que una vez que se ha alcanzado un NPQ alto, el ΔpH no es necesario para mantener la disipación de energía (Goss *et al.* 2006). Por último, el pH de activación de las enzimas responsables de la de-epoxidación de pigmentos es diferente entre ambos grupos. Esto indica que existen diferencias de los mecanismos de control de la disipación térmica entre diferentes grupos de fototróficos. EL análisis comparativo del NPQ en diferentes organismos resulta indispensable para el conocimiento a nivel molecular del proceso de disipación térmica en el aparato fotosintético (Horton *et al.* 2005). Particularmente las diferencias en el control de una de las respuestas más importantes de fotoprotección pueden tener un origen evolutivo (García-Mendoza *et al.* 2011). Existe una amplia diversidad en la composición y arreglo de los complejos captadores de luz de los diferentes grupos de organismos fototróficos, por lo que se ha propuesto que el CX y su rol fotoprotector se encuentra estrechamente relacionado con la evolución de las antenas fotosintéticas de los diferentes autótrofos eucariontes (García-Mendoza *et al.* 2011). En plantas superiores y algas verdes, grupos pertenecientes al linaje de las algas verdes, se han descrito ampliamente los procesos moleculares que intervienen en la disipación térmica. De los diferentes grupos que pertenecen al linaje de las algas rojas, las diatomeas son los organismos que más se han estudiado. Existe mucho menos información, a pesar de su relevancia ecológica, sobre los mecanismos de fotoprotección y su control en el grupo de los dinoflagelados. Este grupo presenta un arreglo protéico pigmentario diferente al de otros grupos algales. La absorción de luz en dinoflagelados está mediada por dos clases de proteínas, PCP ("Peridinin chlorophyll protein complexes") y LHC`s ("Light harvesting complex"). La PCP es una proteína soluble en agua que contiene al carotenoide denominado peridinina. Esta proteína se encuentra solo en dinoflagelados y parece no estar relacionada con cualquier otra proteína asociada a la captación de luz, mientras que las LHCs están relacionados con las proteínas de plantas superiores y algas verdes (ten Lohuis *et al.* 1998). Ambos complejos PCP y LHC`s están presentes en múltiples formas en

dinoflagelados (Hiller *et al.*1995). Estas proteínas son fundamentales en la colecta de luz en dinoflagelados (Iglesias-Prieto *et al.* 1997) sin embargo, no se conoce si intervienen en la fotoprotección en estos organismos

Existe poca información sobre la disipación térmica del exceso de energía en dinoflagelados. Se ha reportado que existe actividad del CX en estos organismos, donde la acumulación del pigmento Dtx esta correlacionada con la intensidad lumínica (Brown *et al.* 1999; Warner *et al.* 2006). La presencia de este pigmento se ha asociado a una disminución en la actividad fotosintética en dinoflagelados simbiotes de coral durante el día (Warner *et al.* 2006). Sin embargo, no se ha descrito la importancia de este ciclo en la disipación térmica del exceso de energía en el aparato fotosintético así como tampoco se ha caracterizado la cinética de interconversión de pigmentos de este ciclo y si esta tiene una relación con la inducción del NPQ.

1.3. Justificación

Se ha descrito que los dinoflagelados simbiotes utilizan las mismas estrategias de fotoprotección que se observan en otros organismos fotosintéticos (Larkum *et al.* 2003), sin embargo, no se conocen las vías de regulación que controlan uno de los mecanismos más importantes de este proceso. Es importante entender cómo responden estos organismos al estrés lumínico. Su composición pigmentaria así como la condición simbiótica de algunos de ellos les brindan características particulares y diferentes en comparación con otros grupos algales (Larkum *et al.* 2003). Las antenas pigmentarias juegan un rol fundamental en el proceso de la disipación térmica del exceso de energía en el aparato fotosintético. Ya que existe una amplia diversidad en el arreglo y composición de los complejos colectores de luz, es probable que los mecanismos y/o su contribución en la disipación térmica varíe entre diferentes grupos algales (Demmig-Adams1990). Las características de la antena de los dinoflagelados probablemente influye de manera particular sobre los mecanismos que intervienen en el proceso de

disipación de energía en el aparato fotosintético. La mayoría de los estudios sobre el control de NPQ en organismos que poseen el ciclo diadinoxantina-diatoxantina se han realizado en diatomeas. (Goss *et al.* 2010). Se conoce poco sobre el proceso de disipación térmica y mecanismos asociados en dinoflagelados. Es por esto que el presente trabajo tiene como objetivo principal el de caracterizar los mecanismos que intervienen en la inducción de NPQ en dinoflagelados simbios de la anémona *Anthopleura elegantissima*.

II. Hipótesis

Las características de disipación de energía térmica del aparato fotosintético (NPQ) y mecanismos asociados en dinoflagelados simbiotes de la anémona *Anthopleura elegantissima* presentan diferencias en comparación con otros grupos algales.

III. Objetivos

III.1. Objetivo General

Caracterizar los mecanismos de la disipación de energía no fotoquímica del fotosistema II (NPQ) como respuesta al exceso de luz en dinoflagelados simbiotes (*Symbiodinium californicum*) de la anémona *Anthopleura elegantissima* (Brendt).

III.2. Objetivos Particulares

Para dinoflagelados simbiotes (*Symbiodinium californicum*) de la anémona *Anthopleura elegantissima* recién aislados:

- Evaluar el nivel máximo de disipación de energía por vías no fotoquímicas (NPQ).
- Caracterizar la cinética de inducción y disipación del NPQ y de la interconversión de pigmentos del ciclo de las xantofilas.
- Evaluar la relación entre el ciclo de las xantofilas y disipación de energía independiente de la fotoquímica (NPQ).
- Analizar si existen mecanismos alternos al CX que afecten la disipación de energía independiente de la fotoquímica (NPQ).

IV. Materiales y Métodos

IV.1. Colecta de muestras

Se colectaron anémonas adultas solitarias del supramareal rocoso de la zona Playitas, en Ensenada, B.C. Los organismos fueron colectados durante las mareas más bajas del día. Para la colecta, el sustrato en donde se encontraban los organismos fue cincelado y posteriormente los restos de sustrato fueron retirados del disco de fijación. Las anémonas fueron llevadas al laboratorio de Biología Algal del CICESE y se mantuvieron en agua de mar filtrada en acuarios de 30 x 15cm con aireación constante. Los acuarios se mantuvieron dentro de un incubador a $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y con luz ($125\text{ }\mu\text{mol quanta m}^2\text{ s}^{-1}$) con un fotoperiodo de 12 hrs luz y 12 hrs de oscuridad. Las muestras fueron mantenidas en estas condiciones por lo menos 24 hrs previo al análisis y no más de 48 hrs.

IV.2. Extracción de Simbiontes

Se disectó el disco oral de las anémonas y se separaron los tentáculos, los cuales fueron lavados con agua de mar para disminuir la cantidad de moco secretado por el organismo. Una vez que se logró disminuir considerablemente la cantidad de moco, los tentáculos fueron cortados y homogenizados mediante un disruptor de tejido tipo Toessenbrock. El homogenizado se filtró con un cedazo de $100\text{ }\mu\text{m}$ de luz de malla y fue lavado 3 veces con agua de mar mediante centrifugación a 2000 rpm por 5 min. El paquete celular de simbiontes se concentró o diluyó para obtener una concentración aproximada de $20,000\text{ cel mL}^{-1}$. Esta concentración de simbiontes fue utilizada para los diferentes experimentos realizados. Los conteos celulares se realizaron en cámaras de Neubauer con un volumen de 1 mL de cultivo. Los simbiontes recién extraídos se dejaron reposar en agua de mar filtrada por 60 min en el incubador antes de realizar cualquier medición.

IV.3. Mediciones de Fluorescencia

Mediante el monitoreo de la fluorescencia del FSII es posible realizar mediciones fisiológicas de una manera no invasiva para estimar la disipación térmica y

eficiencia cuántica de la actividad fotoquímica de este sistema (Krause, 1991). La disipación térmica (medida como la disipación (“quenching”) no fotoquímica de la fluorescencia del FSII, NPQ), la fotoquímica y la fluorescencia son procesos que compiten por la energía capturada por la clorofila *a* del centro de reacción del FSII (Figura 1). La reducción en la actividad de una de estas vías significa el incremento en las otras dos. Cuando la vía fotoquímica es saturada al ser expuesta a condiciones de alta luz, la fluorescencia del FSII aumenta. La emisión máxima de fluorescencia se presenta cuando la disipación de energía es mínima o se encuentra inactiva y disminuye en función de la activación del NPQ (Figura 2).

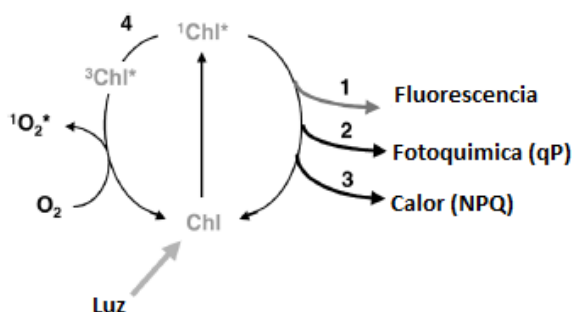


Figura 1. Vías de desexcitación de la energía capturada por las clorofilas.(1) Emisión de fluorescencia; (2) Fotoquímica, qP;(3) Disipación en forma de calor, NPQ; (4) Formación de estados excitados tripletes de la clorofila *a* y formación de radicales libres de oxígeno. Modificado de Muller *et al.* 2001.

Las mediciones de fluorescencia de la clorofila *a* (*Chl a*) se realizaron con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada sumergible (Diving PAM, Walz, Germany), que tiene una luz de medición de 428 nm (LED azul). Se utilizó la nomenclatura y los parámetros descritos por Van Kooten y Snel (1990). Para la medición de la eficiencia cuántica máxima del FSII (F_v/F_m), donde $F_v = F_m - F_0$, los simbiontes se mantuvieron en oscuridad por 5 minutos y la fluorescencia basal (F_0) se midió al exponer las muestras solamente a la luz de medición. La fluorescencia máxima (F_m) se midió al dar un pulso de luz saturante (3000 μmol

quanta $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) con una duración de 0.8 s. La fluorescencia mínima (F_0) se presenta cuando todos los centros de reacción del FSII están abiertos, es decir, que el aceptor primario (Q_A) está oxidado. F_m se detecta cuando todos los centros de reacción están cerrados (Q_A reducido). Bajo estas condiciones, la eficiencia fotoquímica es 0 y por lo tanto la fluorescencia es máxima (Figura 2).

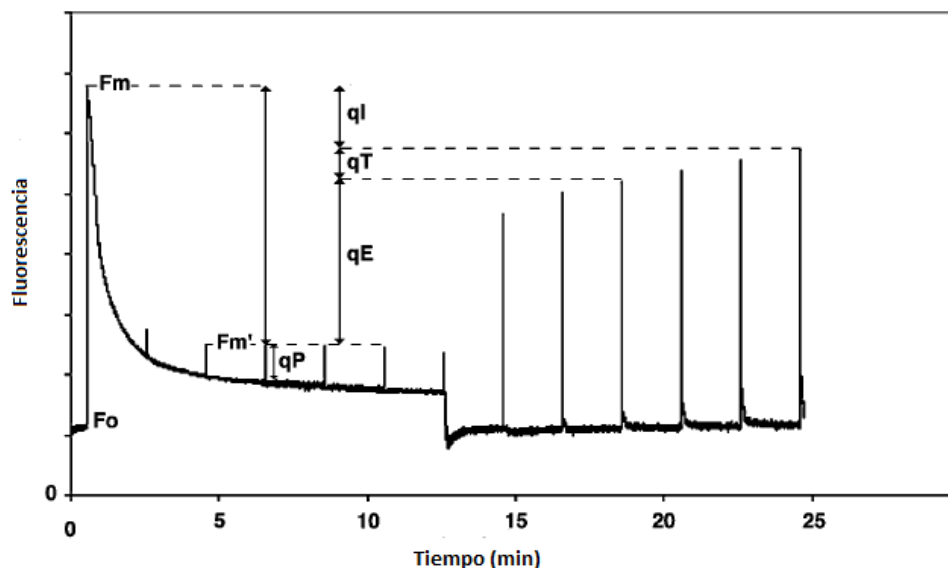


Figura 2. Análisis de quenching. Ejemplo de la variación de la fluorescencia de Chl *a* en una hoja de *Arabidopsis* expuesta a periodos de luz y oscuridad. La fluorescencia mínima (F_0) se detecta en presencia de la luz de medición solamente (tiempo 0-1 min en el esquema) en muestras adaptadas a oscuridad. Al dar un pulso de luz saturante o al exponer a las muestras a una luz intensa, la fotosíntesis se satura y la fluorescencia alcanza un nivel máximo (F_m). Al continuar la exposición con luz saturante se activan los mecanismos de disipación térmica. Al dar un pulso saturante en esta condición se observa una disminución de la emisión de fluorescencia máxima (F_m'). Esta reducción tiene un carácter no fotoquímico (NPQ) ya que al dar un pulso saturante (0.6-0.8 s) se bloquea momentáneamente la vía fotoquímica. El NPQ consta de tres componentes ($qE + qT + qI$) y es calculado como $F_m - F_m' / F_m'$. En oscuridad, una vez que estuvieron expuestas las muestras a luz, se observa un incremento en F_m' que refleja la disipación de los componentes que intervienen en el NPQ. Modificado de Muller *et al.* 2001.

Las mediciones se realizaron en celdas espectrofotométricas desechables de 4 mL dentro de las cuales se colocaron 2 ml de muestra. Las celdas se posicionaron dentro de una cámara de recirculación con temperatura controlada (15 °C). Las muestras se mantuvieron en agitación constante durante las mediciones. Para

iluminar las muestras se utilizó una lámpara blanca de halógeno de 125 W. Se utilizó una guía de fibra óptica conectada a la lámpara para iluminar las muestras. La fibra óptica de la lámpara fue posicionada de tal manera que toda la muestra fuera homogéneamente iluminada. La fibra óptica del fluorómetro fue colocada en un ángulo de 90° en relación a la fibra óptica de la lámpara. La intensidad de la luz a la cual fueron expuestos los simbioses fue medida con un sensor de luz tipo coseno conectado al fluorómetro con un área de exposición de 1 cm².

IV.4. Cuantificación de pigmentos mediante cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC).

La extracción de pigmentos lipofílicos se realizó por medio de disrupción mecánica de filtros que contenían a los simbioses en 1.5 ml de acetona fría. Los extractos fueron mantenidos en oscuridad a 4°C, centrifugados a 13000 rpm por 10 min a 4°C y almacenados a -20°C hasta su análisis. La cuantificación de pigmentos se realizó mediante Cromatografía Líquida de Alto Desempeño (HPLC), de acuerdo al protocolo descrito por Van Heukelem y Thomas (2001). El equipo de HPLC (Shimadzu AV-10) estaba equipado con una columna de fase reversa Zorbax DBX-C8 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm tamaño de partícula). Se utilizó una combinación de dos solventes, metanol:TBA 28 mM (70:30, v/v) como solvente A y metanol al 100% como solvente B. El perfil de abastecimiento de solventes fue (%B, min): 5%, 0 min; 5%, 5 min; 95%, 22 min; 95%, 27 min; 5%, 30 min. La longitud de onda de detección fue de 436 nm. El control del equipo y el cálculo del área de los pigmentos se realizó con el software de sistema de datos cromatográficos Shimadzu EZchrom (Shimadzu Scientific Instruments Inc., MD, USA).

IV.5. Aproximaciones experimentales.

Se realizaron distintos tratamientos para evaluar las características de inducción y disipación de NPQ y mecanismos de asociados. Se caracterizó la inducción de

NPQ a distintas intensidades lumínicas, así mismo, se evaluó la relación entre la interconversión de pigmentos de CX y la activación y desactivación del NPQ. Se utilizaron inhibidores de la formación del ΔpH , de la enzima violaxantina de-epoxidasa y de la transferencia de electrones del FSII para caracterizar el aporte de distintos mecanismos al NPQ. Se utilizó excitación preferencial del FSI para caracterizar la influencia de este en la regulación del NPQ. Con fines de claridad los protocolos específicos utilizados para cada experimento se describen junto con sus resultados.

V. Resultados

Se midió la viabilidad fisiológica de los dinoflagelados aislados durante cuatro horas posterior a su extracción mediante el cálculo de la tasa relativa de transporte de electrones en el FSII ($ETR = (F_v/F_m) \times E$) a diferentes irradiancias (E) sin registrarse cambio. En la figura 3 se muestra que la curva ETR vs E fue similar en simbioses mantenidos hasta 4 horas después de su aislamiento. Por lo tanto, la actividad fotosintética no disminuyó durante este periodo, durante el cual se realizaron los experimentos descritos en el presente trabajo.

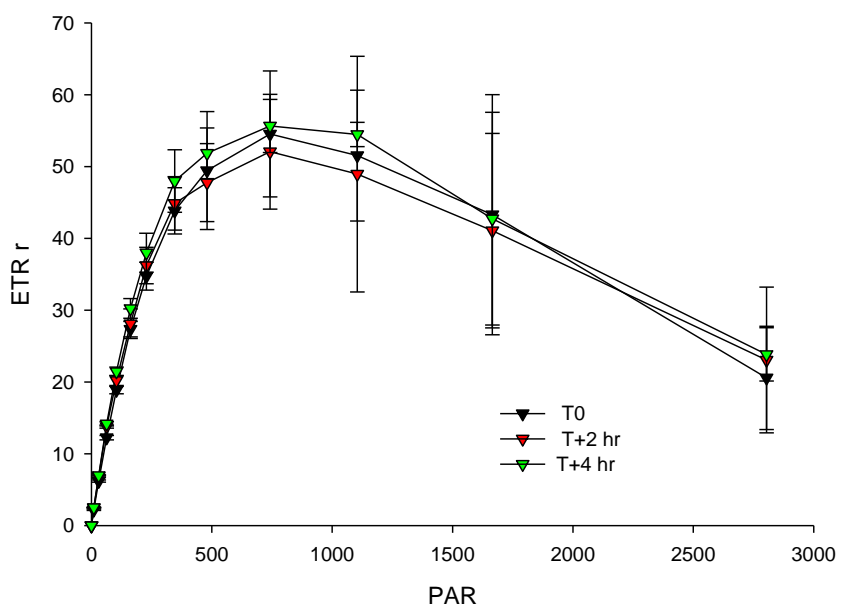


Figura 3.- Tasa de transporte de electrones relativa del FSII en simbioses expuestas a diferentes irradiancias. Las mediciones fueron realizadas a 0, 2 y 4 horas después de la extracción. Cada punto representa la media de 3 mediciones \pm su desviación estándar.

V.1 Activación y Desactivación de NPQ

Se caracterizó la cinética de inducción del NPQ en simbioses expuestas a distintas intensidades de luz. Asimismo, se monitoreó la disipación de esta variable en condiciones de oscuridad una vez inducida en luz. Los simbioses recién extraídos fueron expuestos a 200, 500, 1000 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ por 20 min y posteriormente se monitoreo por 15 minutos la emisión de fluorescencia del FSII en oscuridad.

V.1.1 Inducción de NPQ bajo distintas irradiancias

En la figura 4 se presenta el incremento de NPQ una vez que los simbioses son expuestos a distintas intensidades lumínicas. En los primeros 3 min de exposición a luz no se observan diferencias de NPQ entre los diferentes tratamientos ya que en este periodo de tiempo no se observó un incremento de NPQ. Después de 3 minutos de iluminación, el NPQ aumentó en las diferentes irradiancias probadas observándose un incremento mayor en las intensidades más altas. Después de 20 minutos de iluminación, los tratamientos de 500, 1000 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ alcanzaron un mismo valor de NPQ de 4.0 (± 0.05). Los simbioses expuestos a 200 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ presentaron un valor de NPQ menor as bajo (2.5 ± 0.03) a los 20 min. El tiempo medio de activación ($t_{1/2}$) del NPQ fue de 8.3 min (± 0.03) para los tratamientos de 200 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$, 7.08 min (± 0.08) para los tratamientos de 500 y 1000 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ y 6.5 (± 0.06) min para el tratamiento de 1500 $\mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$.

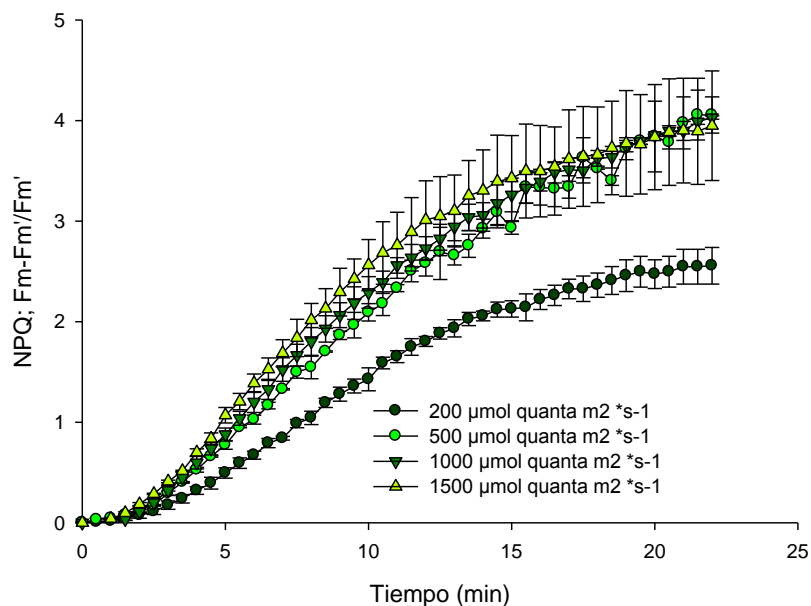


Figura 4.- Inducción de la disipación de la fluorescencia por procesos no fotoquímicos (NPQ; F_m-F_m'/F_m') en dinoflagelados simbiotes recién aislados de la anémona *Anthopleura elegantissima* expuestos a distintas irradiancias por 20 min. Cada punto representa la el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

Después de 20min de iluminación no se observó saturación del NPQ en ninguno de los tratamientos, por lo cual se evaluó el incremento de esta variable al exponer a los simbiotes a $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ por 60 min (Figura 5). Al igual que en los tratamientos con distintas intensidades lumínicas, no se registraron cambios en los valores de NPQ durante el primer minuto de iluminación. A partir del segundo minuto los valores de de NPQ aumentaron hasta alcanzar un valor máximo de 4.3 ± 0.35 , unidades de NPQ. Durante este experimento, se alcanzó un valor de NPQ de 3.1 a los 20 min de iluminación lo cual corresponde al 72% del valor de NPQ máximo. El tiempo medio de activación ($t_{1/2}$) del NPQ fue 11 min. Aunque los valores de NPQ al finalizar el tratamiento de 20 min y el de 60 min de exposición a luz no son distintos, la cinética de activación de ambos si lo es. Existe variabilidad en la respuesta de los simbiotes ya que al ser colectados del medio durante diferentes días, su fotoaclimatación puede presentar variaciones entre las muestras.

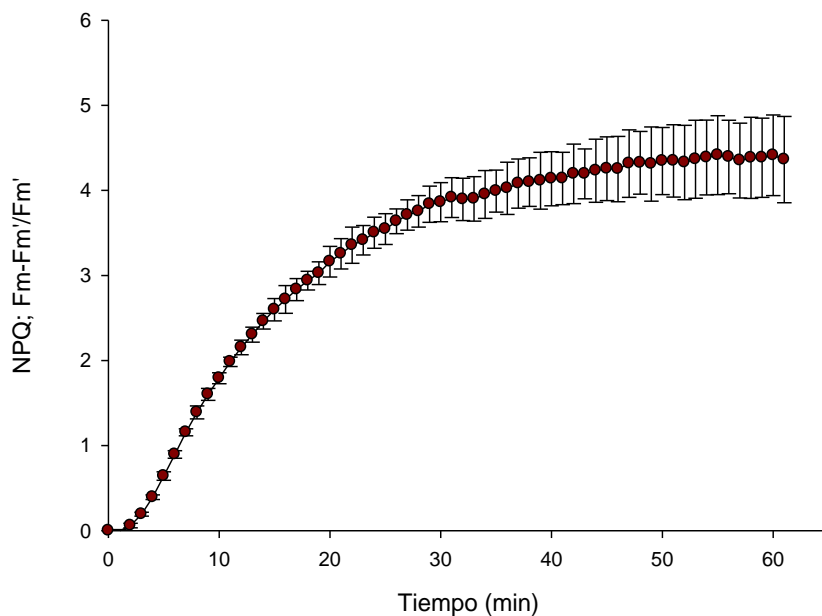


Figura 5.- Inducción de la disipación de la fluorescencia por procesos no fotoquímicos (NPQ; Fm-Fm'/Fm') en dinoflagelados simbiotes recién aislados iluminados con $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$. Cada punto representa la el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

V.1.2. Disipación de NPQ en oscuridad

Al mantener a los simbiotes en condiciones de oscuridad después de los tratamientos de luz se observó un aumento en la emisión de fluorescencia del FSII, por lo tanto, el NPQ disminuyó en estas condiciones.

En los tratamientos en los cuales se iluminó a los simbiotes con 500 y $1500 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ se registró una disipación rápida del NPQ durante los primeros dos minutos en oscuridad. Se observó una reducción de 1.2 y 0.8 unidades de NPQ respectivamente. Después de este periodo, los valores de NPQ se reducen 0.6 y 1.0 unidades de NPQ hasta alcanzar valores casi constantes a los 15 min. El valor de NPQ remanente a los 15 min de oscuridad fue aproximadamente un 45% del máximo NPQ detectado en luz de todos los tratamientos (Figura 6).

En el tratamiento de $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ no se registró una reducción rápida en los valores de NPQ durante los primeros dos minutos de oscuridad, sin embargo, después de 15 minutos en esta condición se detectaron valores de NPQ similares a los tratamientos de 500 , 1000 y $1500 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ ($\text{NPQ} = 2.0 \pm 0.1$). En el tratamiento de $200 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ el NPQ disminuyó 0.5 unidades durante los primeros 2 min y 0.8 unidades durante el periodo restante de medición. El valor NPQ a los 15 min en oscuridad fue de 1.3 .

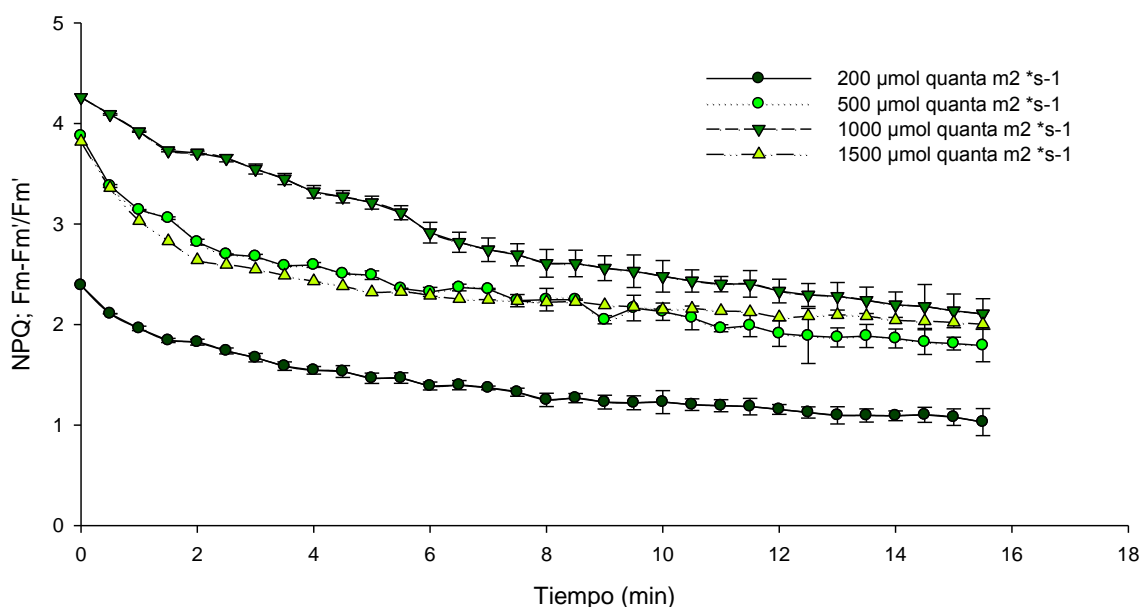


Figura 6.- Disipación de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién aislados en condiciones de oscuridad después de ser expuestos a distintas irradiancias por 20 min. Cada punto representa el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

Los valores de NPQ que se registraron a los 15 min en oscuridad se normalizaron al valor máximo medido durante el periodo de exposición a luz (Figura 7). No se observaron diferencias entre los tratamientos lo que sugiere que el NPQ remanente a los 15 de oscuridad es independiente del daño al FSII (qI), ya que este sería proporcional a la intensidad de luz a la que estuvieron expuestos los organismos.

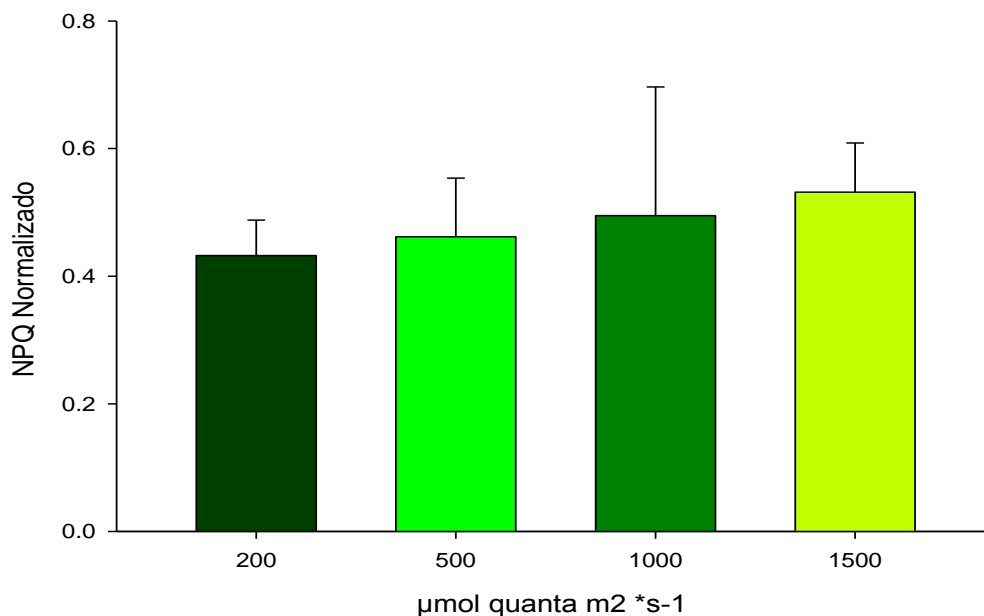


Figura 7.- NPQ detectado en simbioses recién aislados mantenidos en oscuridad por 15 min una vez expuestos a diferentes irradiancias por 20 min. Se presenta el NPQ normalizado por el valor máximo detectado después de 20 min de exponer a los organismos a distintas irradiancias. Cada barra representa el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

V.2. Interconversión de pigmentos del ciclo de xantofilas en luz y oscuridad.

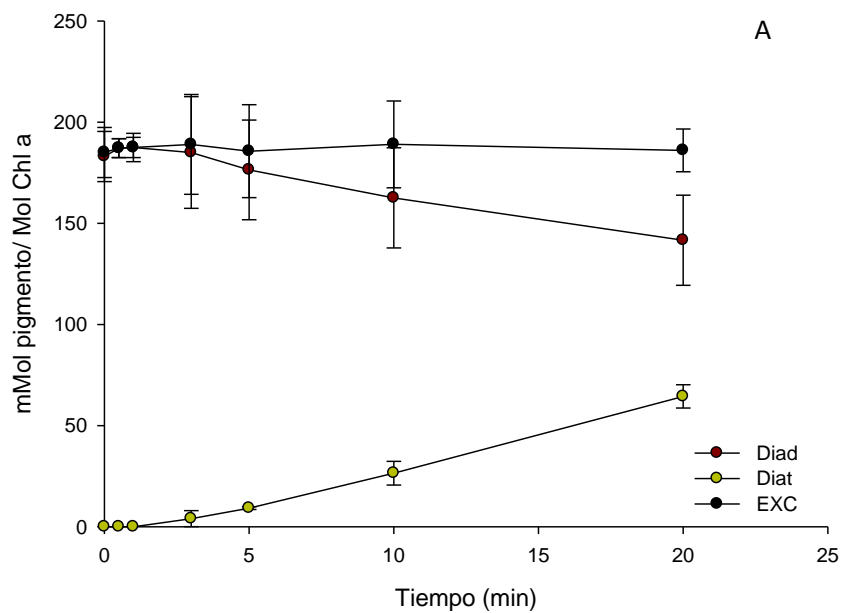
V.2.1. De-epoxidación de pigmentos del ciclo de las xantofilas (CX) en luz.

Para caracterizar la cinética de de-epoxidación de carotenoides del CX se expusieron simbioses recién aislados a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bajo las condiciones descritas en materiales y métodos. Se realizaron dos experimentos en donde las muestras fueron iluminadas durante 0.5, 1, 3, 5, 10, y 20 min y un segundo experimento en donde los simbioses fueron iluminados por 5, 15, 30, 40 y 60 min antes de ser recuperadas y filtradas para ser congeladas en N_2 líquido hasta su análisis por HPLC.

Se presenta la concentración de pigmentos del CX normalizada a la concentración de la Chl *a*, el principal pigmento fotosintético. Esta normalización se realizó para reducir la variación de la concentración medida de los pigmentos por diferencias en número de células colectadas en cada muestra ya que la concentración de la Chl *a* no cambia durante el periodo de experimentación. En la figura 8A se presenta la variación de la concentración pigmentos del CX normalizados por la concentración de clorofila *a* durante el periodo de exposición a luz saturante. En los primeros minutos de exposición no se detectó la conversión de diadinoxantina a diatoxantina. Este pigmento se detectó al exponer a los dinoflagelados por tres minutos a alta luz. La tendencia observada en el cambio de la concentración de pigmentos indica que el incremento en la concentración de diatoxantina es acompañada por una disminución en la concentración de diadinoxantina durante los 20 min de exposición a alta luz. Sin embargo, en este experimento no se observó una relación clara de la conversión molar de un pigmento a otro, ya que debido a la alta variabilidad registrada no existieron diferencias significativas de la concentración de diadinoxantina medida a diferentes tiempos de exposición.

En contraste con el primer experimento, cuando se caracterizó la conversión de pigmentos en simbiontes expuestos por 60 min a luz, se detectó que la síntesis de diatoxantina depende de la reducción del pigmento precursor diadinoxantina (Figura 8B). Asimismo, se registró que la máxima concentración de diatoxantina se alcanza aproximadamente a los 30 min de exposición a luz, sin cambio significativo después de este tiempo. La concentración de pigmentos del ciclo de las xantofilas (ΣCX) varió entre experimentos, probablemente por las diferencias en el estado de aclimatación de las muestras ya que fueron colectadas en diferentes fechas. El ΣCX para las muestras utilizadas para el tratamiento de 20 min de luz así como en las muestras utilizadas para las mediciones en de disipación de NPQ en oscuridad fue de 187 (± 5.3) mmol de ΣCX / Mol de Chl *a*. Para las muestras utilizadas para el tratamiento de 60 min de luz, el ΣCX fue de

214 (± 12.2) mmol de ΣCX / Mol de *Chl a*. No se detectaron diferencias significativas en estos valores durante el periodo de exposici3n a luz y en oscuridad. El $t_{1/2}$ de conversi3n de diadinoxantina a diatoxantina fue de 16 min en el tratamiento de 60 min en luz y 11 min para el tratamiento de 20 min en luz.



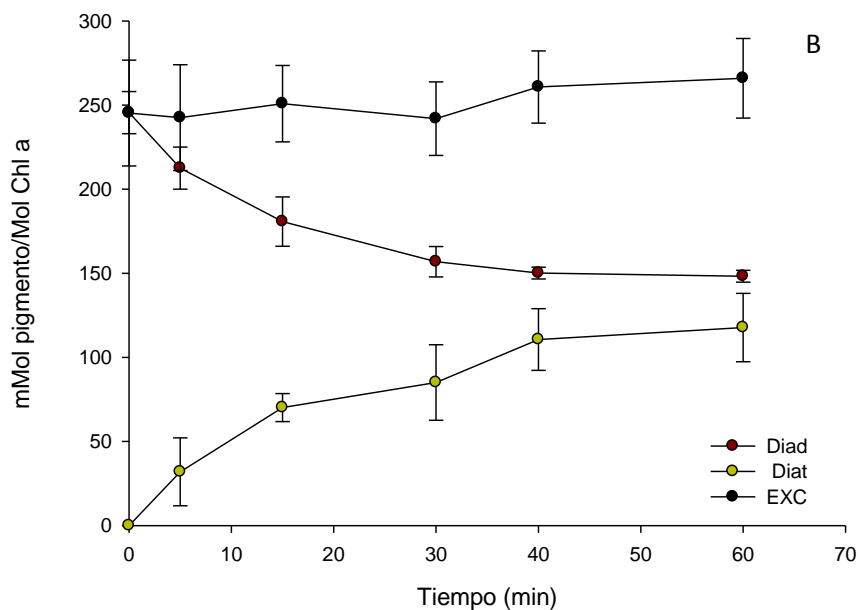


Figura 8.- Concentración de diadinoxantina (círculos rojo) y diatoxantina (círculos verdes) normalizados por la concentración de clorofila *a* en moles en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a 20 min (A) y 60 min de iluminación saturante (B). ECX= Sumatoria de pigmentos del CX (círculos negros) normalizados por la concentración de clorofila *a*. Cada punto representa la el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

Se evaluó la variación el estado de de-epoxidación (DPS) del CX durante el periodo de exposición a luz saturante. Este parámetro representa el estado fotoprotector de los carotenoides del CX involucrados en la disipación de energía en forma de calor que fotoprotege al aparato fotosintético (Pfundel y Bilger 1994). A los 20 min de exposición se detectó un DPS de 0.32 (± 0.02) y 0.43 (± 0.3) después de 60 min de iluminación (Figura 9).

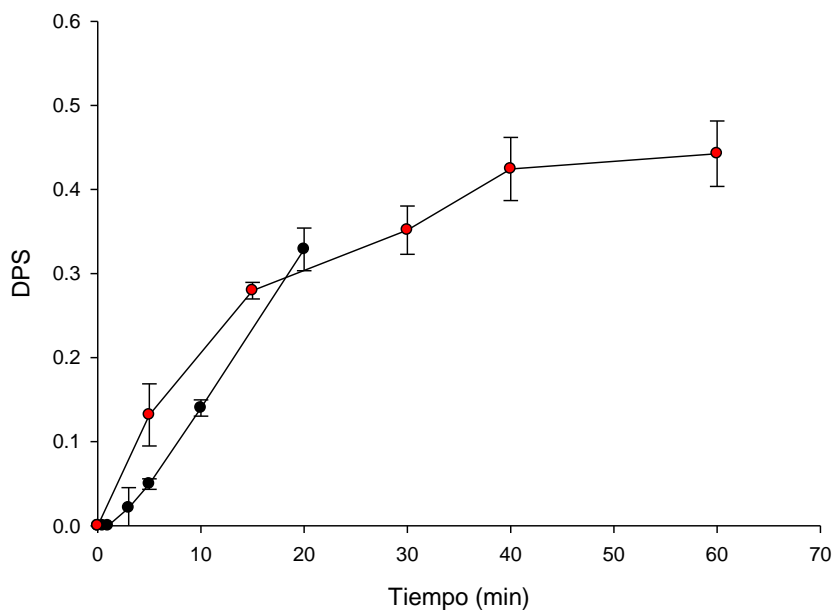


Figura 9.- Variación del estado de de-epoxidación de pigmentos del CX en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos por 20 min (círculos negros) y 60 min de iluminación saturante (círculos rojos). Cada punto representa el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

V.2.2. Epoxidación de pigmentos del CX en oscuridad

Se caracterizó la reacción de epoxidación del CX al mantener a dinoflagelados recién aislados en oscuridad después ser expuestos a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ por 30 min. Se evaluó la concentración de pigmentos en muestras mantenidas en oscuridad por 0, 1, 3, 5, 10 y 15 min antes de ser recuperadas y filtradas para ser congeladas en N líquido hasta su análisis por HPLC.

Al mantener a los simbiotes en oscuridad se detectó una conversión mínima de diatoxantina a diadinoxantina durante los primeros minutos en condiciones de oscuridad. Aún cuando no existió una diferencia significativa (ANOVA $p=0.041$) entre las concentraciones de diatoxantina medidas en los primeros puntos de muestreo, existió una tendencia clara de la disminución de este pigmento con el tiempo al mantener a los dinoflagelados en oscuridad. Se

detectó una concentración de diatoaxantina de 42.3 mmol Dtx/Mol Chl después de 15 min en oscuridad que representó un 56 % del valor acumulado en luz después de 20 min de exposición (t=0 en figura 10).

Al normalizar la concentración del pigmento fotoprotector diatoxantina entre la suma de los pigmentos del CX (DPS) se observa más claramente que la reacción de de-epoxidación esta inactiva en oscuridad y existe una acumulación de diadinoxantina a través de la reacción de epoxidación. Se detectó una disminución del DPS del 56 % del valor inicial (0.43) a los 15 min de mantener a los organismos en oscuridad (DPS= 0.23; Figura 11).

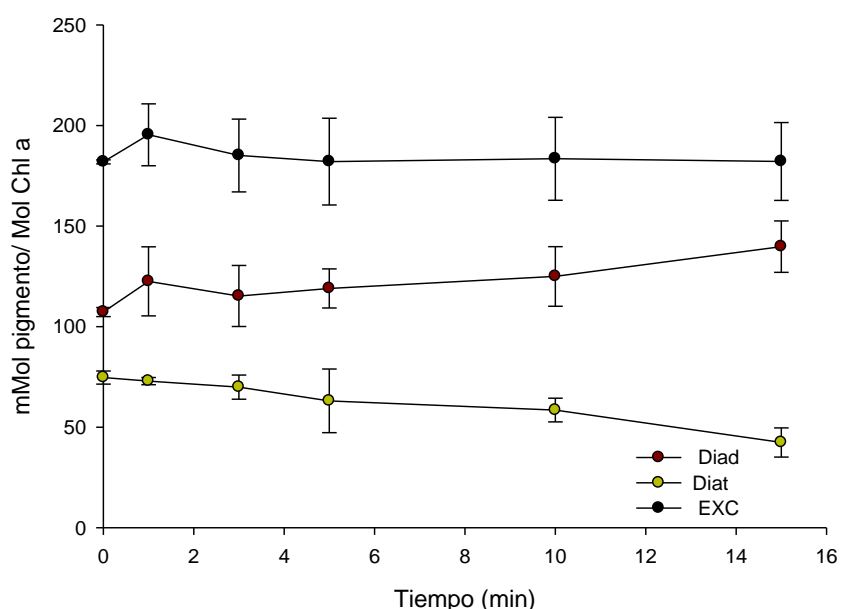


Figura 10.- Concentración de diadinoxantina (círculos rojos) y diatoxantina (círculos verdes) normalizados por la concentración de clorofila *a* en moles de dinoflagelados simbioses recién aislados expuestos a 30 min de luz y 15 min de oscuridad. EXC= Sumatoria de pigmentos del CX normalizada por la concentración de *Chl a* (círculos negros). Cada punto representa la el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

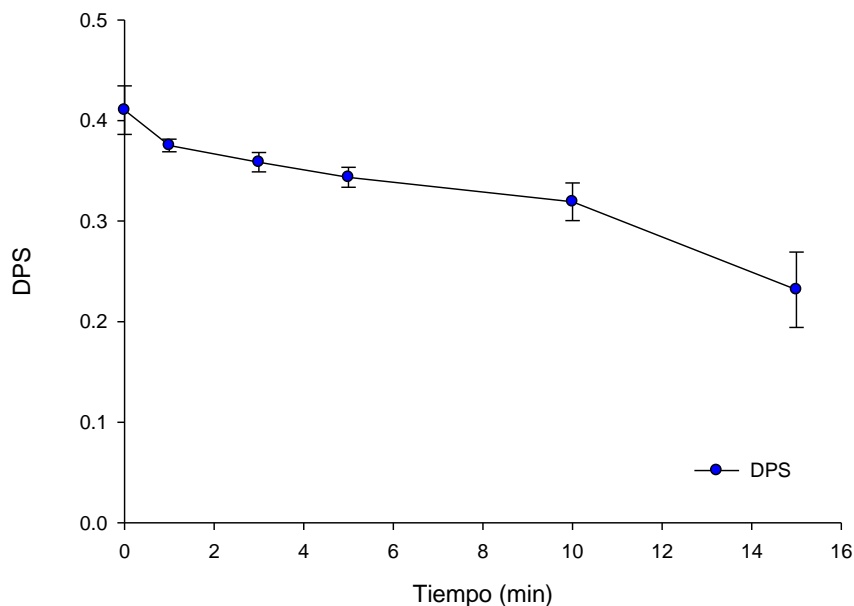


Figura 11.- Variación en el estado de de-epoxidación de pigmentos del CX de dinoflagelados simbiotes recién aislados mantenidos en condiciones de oscuridad 15 min después de ser expuestos a $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 30 min . Cada punto representa el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

V.3. Relación NPQ y Ciclo de las Xantofilas

Los datos obtenidos en los análisis de inducción/disipación del NPQ y la interconversión de pigmentos del CX fueron utilizados para evaluar la dependencia de la activación de la disipación térmica sobre la síntesis del pigmento fotoprotector diatoxantina (Figura12). Se realizó un análisis de regresión lineal entre el valor de NPQ y la concentración de diatoxantina medida en cada punto de muestreo. Este análisis demostró una alta dependencia de la formación de NPQ respecto a la concentración de diatoxantina. Se obtuvo una $r^2 = 0.94$ considerando solamente los datos obtenidos en los experimentos de inducción de NPQ en luz saturante, la cual se reduce a $r^2 = 0.92$ al analizar juntos los datos de los tratamientos de luz y oscuridad. Aunque el valor de correlación en oscuridad es más bajo que el que se obtuvo para los datos de luz, ambos tratamientos siguen la misma tendencia.

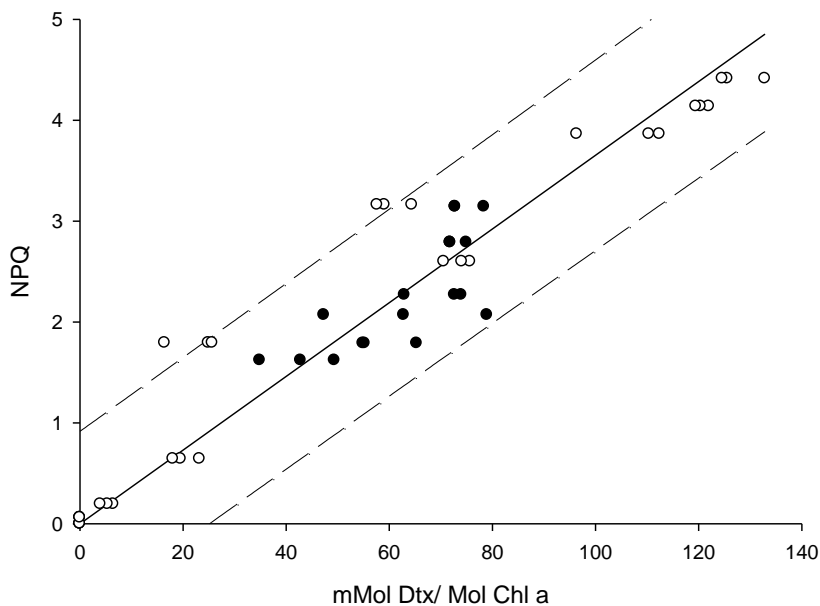


Figura 12.- Relación entre NPQ y la concentración de diatoxantina en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una iluminación de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (símbolos abiertos $r^2= 0.94$) y expuestos a $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 20 min y dejados en oscuridad por 15 min (símbolos cerrados) ($r^2=0.56$).

V.4. Inducción de NPQ en presencia de inhibidores del CX y de la formación del ΔpH

Se caracterizó el efecto de la inhibición de la enzima violaxantina de-epoxidasa y la disrupción el gradiente de protones (ΔpH) sobre la inducción del NPQ. Se inhibieron estos mecanismos en diferentes experimentos previo o durante la inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos expuestos a alta luz. Se utilizó el diothiotriethol (DTT) como inhibidor de la enzima violaxantina de-epoxidasa, aunque también afecta a la enzima que convierte a la diadinoxantina a diatoxantina (Olaizola *et al.* 1994). Se utilizó el cloruro de amonio (NH_4Cl), el cual al ser un ionóforo, rompe el gradiente de protones formado entre el lumen y estroma de la membrana tilacoide (García-Mendoza *et al.* 2002). Se probó el efecto del DTT sobre la inducción de NPQ, al incubar dinoflagelados en condiciones de oscuridad por 20 minutos en presencia de este inhibidor

(concentración final 1.5 mM). Los simbioses tratados con DTT fueron expuestos a $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ para monitorear la inducción de NPQ cuando el CX está inactivo.

Se realizaron así mismo, dos experimentos independientes utilizando el NH_4Cl . En el primer experimento se incubó a los simbioses con NH_4Cl previo al tratamiento de luz. Para esto, los simbioses fueron incubados con NH_4Cl a una concentración final de 150 mM en oscuridad por 5 minutos antes de ser expuestos a la luz. En un segundo experimento, el inhibidor se añadió una vez que los simbioses estaban expuestos a luz. En este experimento se expuso a los organismos a condiciones de alta luz de acuerdo a la metodología ya descrita y una vez transcurridos 25 min de tratamiento de luz se añadió el NH_4Cl a una concentración final de 150 mM. Una vez adicionado el NH_4Cl las muestras se mantuvieron en luz por 20 minutos más.

Se probó que los inhibidores utilizados funcionaran de acuerdo a lo esperado. Se cuantificó el cambio de pigmentos en muestras tratadas con DTT. No se registró cambios en la concentración de diadinoxantina y no se detectó a la presencia de diatoxantina después de exponer a los dinoflagelados por 10 min en luz. Respecto al NH_4Cl , se probaron diferentes concentraciones de este inhibidor hasta observar una reducción de NPQ.

En la figura 13 se presentan los resultados del efecto de estos inhibidores sobre la formación del NPQ. Se observa que la pre-incubación con inhibidores redujo significativamente la formación de NPQ, aunque no la inhibió completamente. En los tratamientos en los que se pre-incubó a los simbioses con NH_4Cl se detectó una reducción del 87% de los valores de NPQ registrados a los 20 min en organismos sin ningún inhibidor. En los simbioses pre-incubados con NH_4Cl y DTT se alcanza un valor de NPQ de 0.41 (± 0.02) después de exponerlos 20 min a luz saturante que representa una disminución del 89% de la emisión de fluorescencia en simbioses sin inhibidores a este tiempo. Al igual que en el tratamiento con NH_4Cl solo, se el NPQ continua aumentando después de mantener a los organismos en oscuridad después del tratamiento de luz. La

inducción del NPQ en los simbioses pre-incubados con DTT alcanza valores de $0.45 (\pm 0.03)$ a los 20 minutos de tratamiento que representa una disminución del 86% de la emisión de fluorescencia en simbioses sin inhibidores.

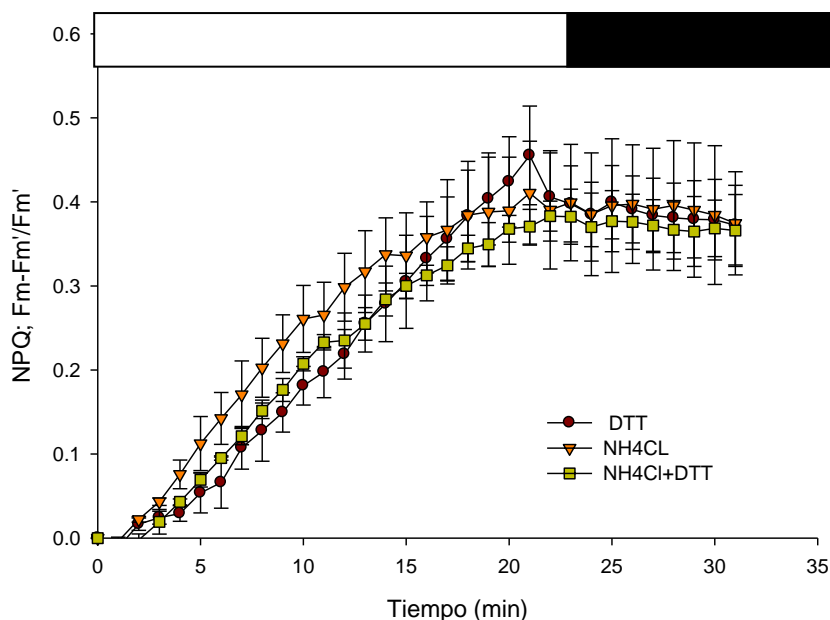


Figura 13.- Inducción de NPQ en dinoflagelados simbioses recién extraídos expuestos por 20 minutos en luz ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 10 minutos en oscuridad en presencia de NH_4Cl (círculos rojos), DTT (círculos naranjas) y DTT+ NH_4Cl (círculos verdes). Cada punto representa la el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

En el tratamiento en el cual se adicionó el ionóforo durante el periodo de exposición a luz, no se observó una reducción del NPQ inmediatamente después de agregar el NH_4Cl . Se registró un decaimiento lento del NPQ 2 min después de agregar el NH_4Cl . El NPQ no se disipa completamente después de 20 minutos de adicionado el NH_4Cl y se detectó un valor de NPQ de 1, que corresponde al 25% del NPQ medido antes de adicionar el reactivo (Figura 14).

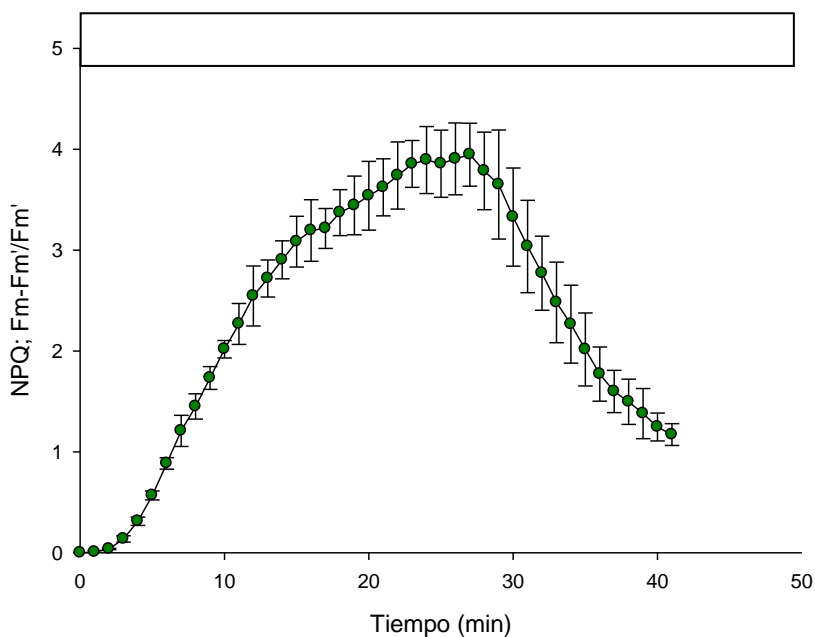


Figura 14: Efecto de la ruptura del gradiente de protones en la inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos después de 20 minutos bajo iluminación de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Cada punto representa la el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

V.5. Efecto del estado redox de la cadena transportadora de electrones sobre la reducción de la fluorescencia.

V.5.1. Efecto de iluminación tipo rojo lejano (excitación preferencial del FSI)

La inducción del NPQ en presencia de los inhibidores utilizados anteriormente indica que existe probablemente un proceso que afecta la emisión del FSII y en consecuencia el NPQ. Este proceso, es independiente de la actividad del CX y de la formación del gradiente de protones en la membrana tilacoide. Asimismo, la reducción de la fluorescencia debido al daño a la maquinaria fotosintética (qI) no tiene una influencia importante sobre el NPQ en las condiciones experimentales de este trabajo (c.f. Figura 7). Por lo tanto, se plantea que la separación de parte del complejo de antena de FSII (qT) esté asociada a la a inducción del NPQ

observada cuando se inhibió la actividad de la enzima de-epoxidasa y la formación del ΔpH (sección V.4).

Para probar si el cambio en los valores de NPQ esta influenciado por una probable reducción en el tamaño de la antena asociada al FSII se evaluó el efecto del estado redox de la cadena de transporte de electrones entre fotosistemas sobre la inducción del NPQ. Se excitó preferencialmente a la clorofila P700 del FSI mediante iluminación tipo Rojo Lejano (RL) en combinación con la iluminación utilizada anteriormente. Para la iluminación RL se utilizó la lámpara de diodos de un fluorómetro tipo Dual PAM (Waltz, Germany). Estos diodos tienen una emisión centrada 740 nm. La luz tipo RL se suministró a una irradiancia de $5 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{ s}^{-1}$ en un ángulo de 45° con respecto a la fibra óptica de la lámpara de halógeno descrita en la sección de materiales y métodos. En experimentos independientes, se caracterizó el efecto de la excitación preferencial del FSI junto con los inhibidores del ΔpH (NH_4Cl) y la enzima de-epoxidasa (DTT) en la inducción del NPQ.

Los simbiotes fueron incubados por 20 minutos en oscuridad con DTT 1.5 mM y NH_4Cl 100 mM y una combinación de ambos exponiéndolas a $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{ s}^{-1}$ por 20 min y posteriormente manteniéndolos por 10 min en oscuridad con y sin iluminación tipo RL.

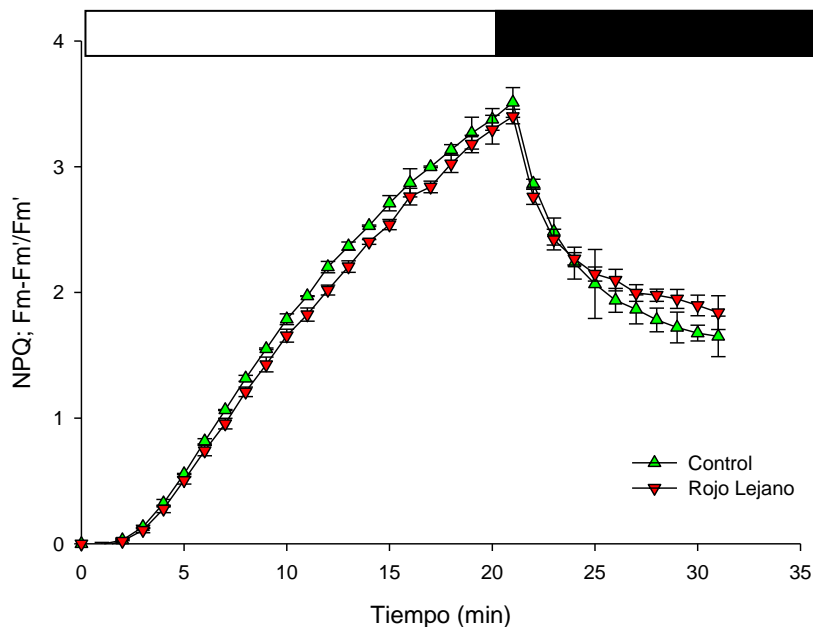


Figura 15: Inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos por 20 minutos en luz ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 10 minutos en oscuridad con y sin iluminación Rojo Lejano. Cada punto representa la el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

En el análisis de la inducción de NPQ en presencia de iluminación RL sin presencia de inhibidores no se observan diferencias entre el control y el tratamiento (Figura 15). De igual manera no se registraron diferencias significativas entre los valores de NPQ o la cinética de inducción para los tratamientos con DTT y $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{DTT}$ en presencia de iluminación RL (datos no mostrados). En el tratamiento en donde se incubó con NH_4Cl y se iluminó con RL hubo diferencias significativas entre tratamientos. El NPQ al finalizar el tratamiento de inducción en células pre-incubadas con NH_4Cl sin RL fue de 0.42 ± 0.06 y de $0.6 (\pm 0.02)$ U.R. de NPQ en células pre-incubadas con NH_4Cl mas iluminación RL (Figura 16). Esto representó el 14 y 20 % respectivamente, del NPQ registrado a los 20 min de iluminación en células sin ningún inhibidor y sin iluminación RL (c.f. Figura 5).

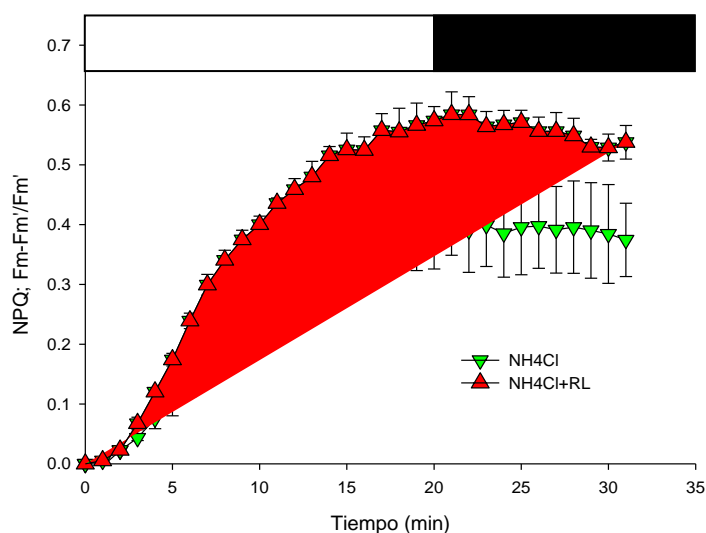


Figura 16: Inducción de NPQ en dinoflagelados simbiotes recién extraídos por 20 minutos en luz ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y 10 minutos en oscuridad con y sin iluminación Rojo Lejano en presencia de NH_4Cl . Cada punto representa el promedio de tres mediciones \pm su desviación estándar.

El análisis de la cinética del decaimiento de la fluorescencia muestra diferencias que no se pueden apreciar en las gráficas del cambio del NPQ en los diferentes tratamientos (Figura 17, 18 y 19). Específicamente, estas diferencias son evidentes en la cinética de recuperación de F_m y F_o en oscuridad después de haber sido expuestos los organismos a luz saturante. Cuando se utilizó NH_4Cl se observó que F_o aumenta en los primeros minutos al apagar la luz y posteriormente disminuye gradualmente. Es evidente que el incremento en F_o se asoció a un aumento considerable de esta señal entre pulsos de saturación. En presencia de iluminación RL no se observó un aumento en F_o al concluir el tratamiento de luz. Este incremento en los valores de F_o y su posterior decaimiento también se observa en los tratamientos en que se utilizó $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{DTT}$ que no fueron iluminados con RL, siendo el tratamiento con NH_4Cl el que presenta una diferencia más evidente entre tratamientos en la cinética de decaimiento de la fluorescencia basal (F_o) al apagar la luz. Este incremento al apagar la luz y el decaimiento gradual en los valores de F_o no se registró en los tratamientos con DTT con o sin iluminación tipo RL.

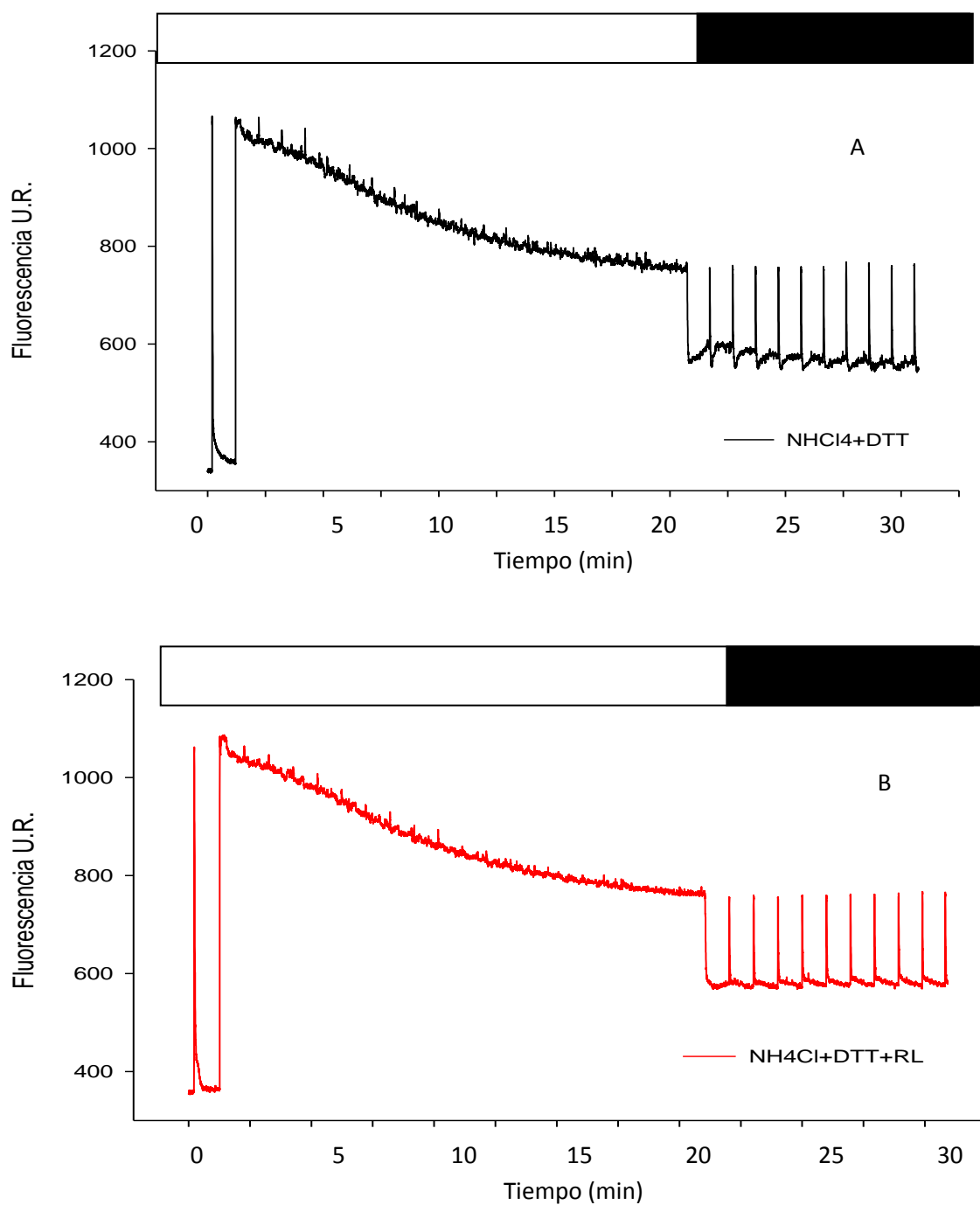


Figura 17.- Cinética de decaimiento de fluorescencia de clorofila *a* en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ por 20 minutos y 10 minutos en oscuridad en presencia de $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{DTT}$ con (A) (rojo) y sin (negro) iluminación Rojo Lejano). Cada línea representa el promedio de 3 mediciones

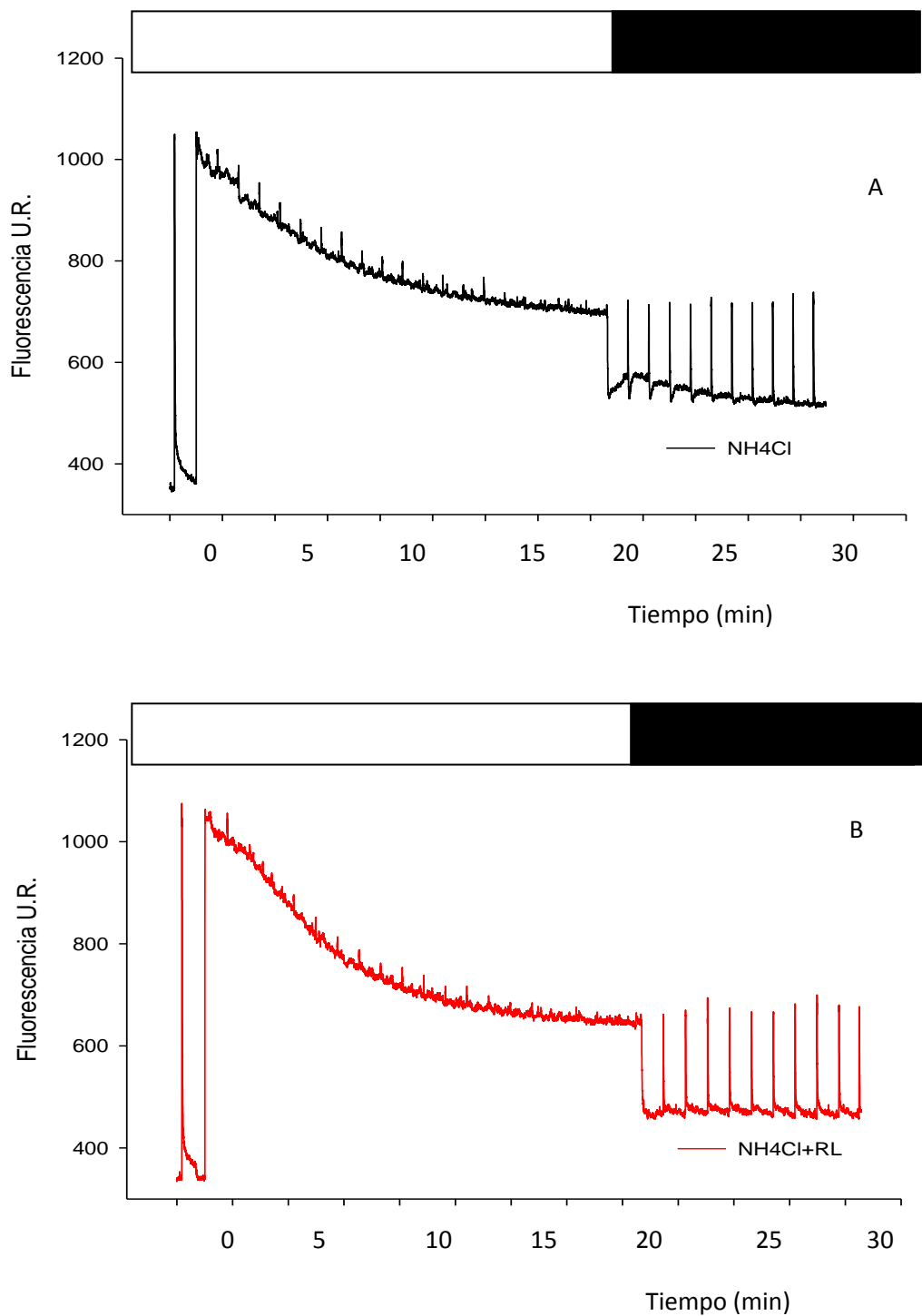


Figura 18.- Cinética de decaimiento de fluorescencia de clorofila *a* en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a por 20 minutos y 10 minutos en oscuridad en presencia de NH_4Cl con (A) (rojo) y sin (negro) iluminación Rojo Lejano (B). Cada línea representa el promedio de 3 mediciones

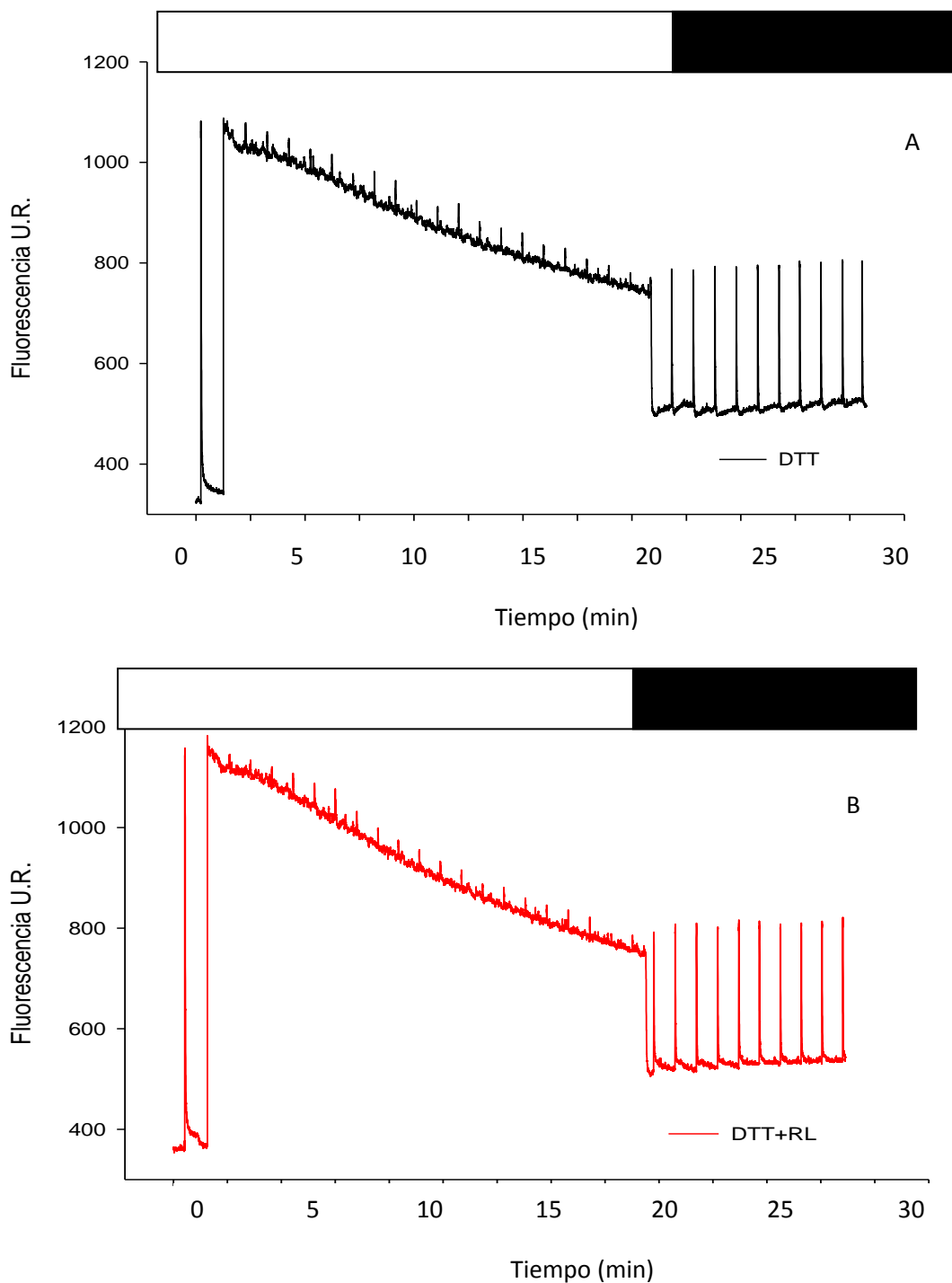


Figura 19.- Cinética de decaimiento de fluorescencia de clorofila *a* en dinoflagelados simbiotes recién aislados expuestos a una irradiancia de $1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{s}^{-1}$ por 20 minutos y 10 minutos en oscuridad en presencia de DTT con (A) (rojo) y sin (B) iluminación Rojo Lejano (F). Cada línea representa el promedio de 3 mediciones

V.5.2. Efecto de la inhibición de FSII sobre la inducción de NPQ

Se evaluó el efecto de inhibir la actividad del FSII sobre el NPQ independiente de CX descrito en secciones anteriores. Se probó si la disminución en la emisión de fluorescencia es independiente de la reducción de la cadena de transporte de electrones asociada a la actividad del FSII. Para esto, simbiontes recién extraídos fueron incubados en oscuridad en presencia de un inhibidor del FSII durante 20 minutos. Se utilizó DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) que ocupa el sitio de anclaje de la plastoquinona en la proteína D1 del FSII. Este inhibidor bloquea la transferencia de electrones del primer (Qa) al segundo aceptor (Qb) de electrones del FSII. Por lo tanto, su presencia inhibe el transporte de electrones desde el FSII a los aceptores subsecuentes.

Durante la incubación de los organismos con este inhibidor no se activó la luz de medición del PAM para evitar reducción de los FSII. La luz de medición del PAM se prendió al mismo tiempo que la iluminación saturante ($1000 \mu\text{mol quanta m}^2 \text{ s}^{-1}$). Por esto, en esta aproximación el nivel de fluorescencia inicial corresponde a Fm al estar todos los centros de reacción cerrados debido a la presencia del DCMU. La reducción del nivel de fluorescencia inicial está asociada a un mecanismo independiente de la fotoquímica. La variación de la fluorescencia en estas condiciones indica si existe un mecanismo que afecta la emisión del FSII independiente de su actividad. Se utilizaron las mismas condiciones experimentales descritas en secciones anteriores.

Asimismo, se probó el efecto del metyl violágeno (MV) en combinación con el DCMU. El MV es un aceptor de electrones de FSI con una alta afinidad hacia la ferredoxina reducida y por lo tanto evita la acumulación de electrones en donadores antes del FSI manteniendo el conjunto de la plastoquinona reducida. Por último, en combinación con estos dos reactivos se utilizó el NH_4Cl como desacoplador del gradiente de protones. El objetivo de usar estos reactivos fue evitar la reducción del conjunto de la plastoquinona para evaluar si este sistema regula la activación del mecanismo de reducción en la emisión de la fluorescencia independiente de la actividad del CX.

En la figura 20 se muestra el efecto de estos inhibidores sobre la variación de la emisión del FSII al ser expuestos los dinoflagelados a luz saturante. En organismos incubados sin la presencia de algún inhibidor (control) la fluorescencia del FSII disminuyó inmediatamente al ser expuestos a la luz saturante. Se observa una reducción exponencial de la emisión de fluorescencia del FSII observándose un nivel mínimo aproximadamente a los 15 min de exposición. Después del periodo de exposición a luz, en oscuridad se observa una reducción inmediata de la señal de fluorescencia incrementándose posteriormente hasta alcanzar los niveles detectados al final del periodo de luz.

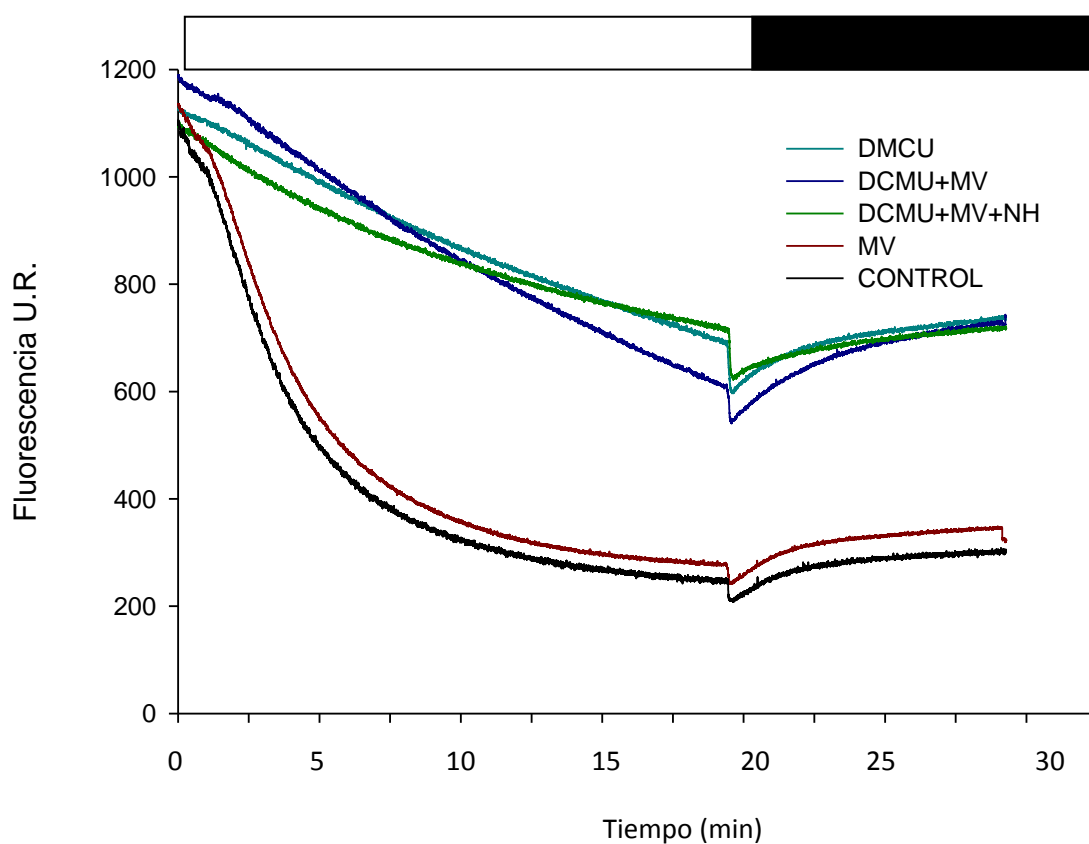


Figura 20: Variación de la fluorescencia de *Chl a* del FSII de simbiontes recién aislados expuestos a $1000 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ por 20 min en presencia de distintos inhibidores. Cada línea representa la media de tres mediciones.

Se observó un comportamiento similar en el decaimiento de la fluorescencia del FSII en simbionte incubados con MV, aunque se observaron valores de fluorescencia mayores probablemente asociada a variación en el número de células entre tratamientos. La emisión de fluorescencia del FSII en dinoflagelados incubados con DCMU disminuye linealmente con el tiempo de exposición. La emisión de fluorescencia se redujo un 40% con respecto a la emisión inicial al concluir la exposición a luz. Al apagar la luz se observa una reducción inmediata de la señal de fluorescencia, incrementándose posteriormente hasta alcanzar los niveles detectados al final del periodo de luz.

En el tratamiento con DCMU+MV+NH₄Cl se registraron valores de fluorescencia menores durante los primeros 15 min de iluminación que en el tratamiento con DCMU aunque sigue la disminución de la señal es similar al tratamiento solo con DCMU. Pasados 15 min de tratamiento, los valores de fluorescencia alcanzan los mismos valores que los obtenidos en el tratamiento con DCMU, superándolos antes de concluir el tratamiento. La reducción de la emisión de fluorescencia al concluir el tratamiento fue de un 40% de la emisión inicial. Al concluir el tratamiento de luz, se observa una reducción inmediata de la señal de fluorescencia incrementándose posteriormente hasta alcanzar los niveles detectados al final del periodo de luz.

En el tratamiento con DCMU+MV, la cinética del decaimiento de la fluorescencia del FSII fue distinta a las obtenidas en los tratamientos con DCMU y DCMU+MV+NH₄Cl. Aunque al igual que en los demás tratamientos con DCMU se sigue la misma tendencia en el decaimiento de la fluorescencia. En este tratamiento se registraron los valores de F_m más altos, así como un decaimiento menos gradual de la emisión de fluorescencia durante todo el tratamiento. La reducción en la emisión de fluorescencia fue del 50% con respecto a la emisión inicial. Al concluir el tratamiento de luz, la fluorescencia se recupera a los mismos niveles que en los tratamientos con DCMU y DCMU+MV+NH₄Cl, pero la

proporción del incremento es mayor en relación con los valores obtenidos durante el tratamiento de luz.

En un set distinto de experimentos se incubaron los simbiontes con DCMU como se describe anteriormente y se incubaron a distintas irradiancias (100, 500, 1000 y 1500 $\mu\text{mol quanta}\cdot\text{m}^2\text{ s}^{-1}$) por 20 min. Las mediciones de fluorescencia y las condiciones de medición fueron iguales a las descritas para los demás tratamientos.

Durante estos tratamientos se observó una caída en los valores de la fluorescencia con el tiempo en función de la intensidad lumínica (Figura 21). En el tratamiento con 100 $\mu\text{mol quanta m}^2\text{ s}^{-1}$ no se observa un decaimiento en los valores de fluorescencia durante los primeros 5 minutos de tratamiento, posteriormente se observa un decaimiento lineal hasta concluir el tratamiento con una reducción de aproximadamente 200 unidades de fluorescencia, que representa el 28% de la emisión detectada al iniciar el tratamiento. En los demás tratamientos se observa un decaimiento inmediato al encender la luz. El tratamiento en donde se observa la menor disminución en la emisión de fluorescencia fue cuando los dinoflagelados fueron expuestos a 500 $\mu\text{mol quanta m}^2\text{ s}^{-1}$. La emisión de fluorescencia disminuyó un 37% del valor inicial. El decaimiento de la fluorescencia fue menos gradual en los tratamientos de 1000 y 1500 $\mu\text{mol quanta m}^2\text{ s}^{-1}$. La emisión de fluorescencia disminuyó un 55% de la emisión de fluorescencia al iniciar el tratamiento. No se registraron diferencias entre estos dos tratamientos, las diferencias en los valores iniciales de fluorescencia se deben probablemente a la diferencia en el número de células entre cada tratamiento.

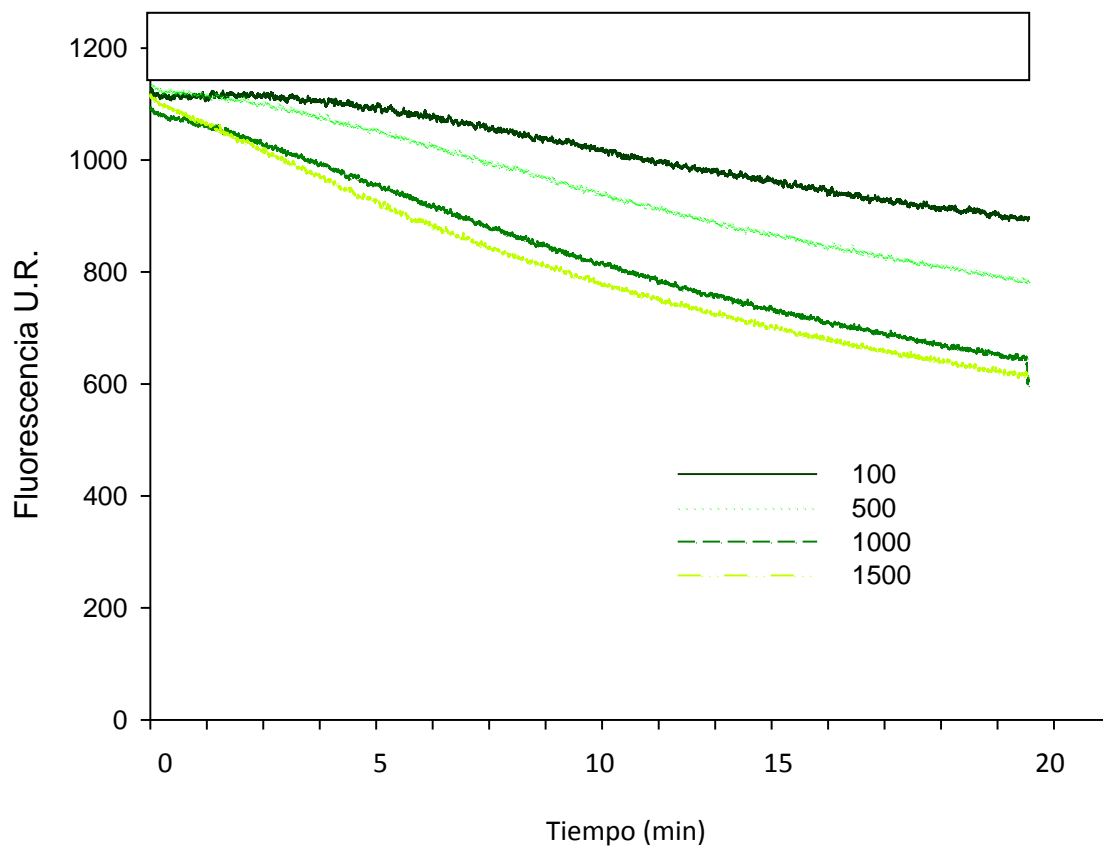


Figura 21.- Decaimiento de la fluorescencia de Chl *a* en simbioses recién aislados expuestos a distintas irradiancias por 20 min en presencia de DCMU. Cada línea representa la media(n=3)

VI. Discusión

VI.1. Inducción y Disipación del NPQ

La cinética de formación y disipación del NPQ está relacionada con la activación y desactivación de los componentes involucrados en este proceso. En plantas superiores, existe un componente asociado a la protonación de proteínas de la antena del FSII que ocasiona cambios alostéricos en los complejos colectores de luz. Estos cambios en la configuración de la antena funcionan como mecanismo de disipación en el sistema de manera rápida actuando en cuestión de segundos a minutos. Otro componente de acción más lenta está asociado a la de-epoxidación de los pigmentos del ciclo de las xantofilas (Morosinoto *et al.* 2003). De igual manera, la cinética de disipación del NPQ está regulada por la desactivación de estos mecanismos. La desprotonación de las proteínas específicas de las antenas en condiciones de baja luz u oscuridad revierten los cambios alostéricos que desactiva la disipación de energía en segundos. Al igual que la inducción del NPQ en luz, la actividad enzimática del ciclo de las xantófilas es responsable de la cinética lenta de disipación del NPQ en oscuridad (Horton *et al.* 2005).

Nuestros experimentos sobre la caracterización de la inducción del NPQ en luz y oscuridad sugieren que el componente rápido de control del NPQ no está presente en dinoflagelados simbiotes de la anémona *Anthopleura elegantissima*. Se observó que al exponer a los dinoflagelados a luz saturante, los valores de NPQ no aumentaron inmediatamente. El t_{1/2} de formación del NPQ para nuestros experimentos fue de 10 min mientras que en *Arabidopsis thaliana*, un organismo modelo para la caracterización del NPQ en plantas superiores, la inducción del NPQ alcanza valores cercanos al máximo después de 2 min en luz saturante (Niyogi *et al.* 2005). De igual manera en diatomeas, durante los primeros segundos de iluminación se alcanzan valores cercanos al máximo (Grounueva *et al.* 2008). La cinética y el tiempo medio de inducción del NPQ que obtuvimos en

nuestros resultados es similar a lo reportado para algas pardas, en donde se reportó la ausencia de un mecanismo de inducción rápida en el proceso de la disipación de energía (García-Mendoza *et al.* 2011). La ausencia de una respuesta rápida al iniciar los tratamientos indica que el ciclo de las xantofilas, es el principal mecanismo asociado al de NPQ. La energetización de la membrana parece no contribuir a la disipación de energía.

De igual manera, la disipación de NPQ en oscuridad en dinoflagelados simbiotes es diferente al comportamiento descrito para plantas superiores. En estos experimentos se registró una disminución del NPQ en oscuridad pero no se observó una caída inmediata en los valores al finalizar el tratamiento de luz. En ninguno de los tratamientos se observó la disipación total del NPQ después de 15 min en oscuridad. Todos los tratamientos mantuvieron un NPQ remanente correspondiente a aproximadamente 45% del NPQ registrado después de 20 min de exposición a alta luz. Aunque el tiempo de inducción fue mayor en nuestros experimentos, el valor de NPQ al alcanzar la saturación corresponde a valores considerados normales dentro de plantas superiores (Niyogi *et al.* 1999) y un valor promedio para organismos con diatoxantina (Goss *et al.* 2010). Asimismo, supera por 1.5 unidades a los valores máximos de NPQ obtenidos de dinoflagelados simbiotes de coral (Warner *et al.* 2006).

VI.2 De-epoxidación y epoxidación de pigmentos del CX en luz y oscuridad

No existen valores del ΣCX en dinoflagelados de con los que se puedan contrastar los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, los valores del estado de de-epoxidación de las xantofilas (DPS) corresponden con lo reportado para dinoflagelados simbiotes de coral al de-epoxidar el 40% de los pigmentos del CX (Warner *et al.* 2006). De igual manera coincide con los valores obtenidos en diatomeas y algas pardas. En estos organismos se ha reportado hasta un 40% de DPS al ser expuestos a luz saturante (Olaizola *et al.* 1994; García-Mendoza *et*

al. 2007). En comparación con plantas superiores, la de-epoxidación de pigmentos del CX fue menor ya que estos organismos son capaces de de-epoxidar hasta el 80% de sus pigmentos xantofílicos (García-Mendoza *et al.* 2007; Pfündel & Bilger, 1994). De igual manera la proporción de Σ CX en relación con *Chl a* es comparable a lo reportado para algunas especies de diatomeas (Lohr *et al.* 2001; Goos *et al.* 2006; Grounueva *et al.* 2008). La cantidad de pigmentos del CX y la conversión máxima de los pigmentos fotoprotectores (DPS) depende del estado de aclimatación de los organismos (Grounueva *et al.* 2008). Los organismos aclimatados a condiciones de alta luz presentaran una concentración mayor de estos pigmentos y mayor DPS al estar expuestos a luz saturante (Pfündel & Bilger, 1994). En el caso de los dinoflagelados simbiotes del género *Symbiodinium*, estos presentaron un DPS y Σ CX relativamente altos, comparable para lo reportado en organismos aclimatados a alta luz. En comparación con plantas superiores, con un CX con zeaxantina, la proporción entre Σ CX y *Chl a* es mayor en los dinoflagelados simbiotes de la anémona *Anthopleura elegantissima* sin embargo, esta es una característica que presentan todos los grupos algales que presentan un CX con diatoxantina (García-Mendoza *et al.* 2007).

La epoxidación de pigmentos en condiciones de obscuridad tampoco corresponde a lo reportado para otros organismos con CX con Dtx. En diatomeas se ha reportado que en algunas especies se observa una conversión total de Dtx a Ddx entre 2 a 5 min en condiciones de oscuridad después de alcanzar el máximo DPS al estar expuestas a luz. En estos organismos, la rápida conversión de Dtx a Ddx asociada a una rápida disipación del NPQ está asociada una actividad alta de la enzima epoxidasa (Goss *et al.* 2006). Esta enzima presenta una alta afinidad por su sustrato (diatoxantina), que es mucho mayor que la afinidad que presenta la enzima epoxidasa por la zeaxantina en plantas superiores (Goss *et al.* 2010). En diatomeas, la tasa de epoxidación de pigmentos del CX es comparable con la tasa de de-epoxidación, por lo cual, para lograr la

acumulación de Dtx y lograr la disipación de energía es necesario que la enzima responsable de la epoxidación se mantenga inactiva durante la exposición a luz (Goss *et al.* 2006b). En contraste en plantas superiores esta enzima se encuentra activa durante la exposición a luz. La afinidad de la enzima epoxidasa por la Dtx, así como una alta concentración de esta, permite que la epoxidación de pigmentos sea rápida en diatomeas en comparación con plantas superiores (Goss *et al.* 2010). La baja tasa de epoxidación, así como la epoxidación incompleta a los 15 min en oscuridad, indica que la actividad enzimática o los procesos de regulación de la misma, son diferentes entre diatomeas y dinoflagelados simbioses de la anémona *Anthopleura elegantissima*.

En ningún tratamiento se detectó un incremento en el ΣCX , por lo que la síntesis *de novo* de pigmentos xantofílicos es baja en estos organismos. Se ha reportado que en diatomeas y en específico en *Phaeodactylum tricorutum* el incremento de la concentración de pigmentos del CX es significativa y relativamente rápida, por lo que la síntesis *de novo* parece ser una respuesta importante a condiciones de luz estresantes en este organismo (Halac *et al.* 2009)

VI.3. Relación NPQ y CX

La relación entre la concentración de diatoxantina y el NPQ indica que existe una alta dependencia de esta última variable con respecto a la actividad del CX. Por lo tanto, la disipación de energía depende de la presencia de los pigmentos de-epoxidados del ciclo de las xantofilas. Esta misma dependencia se ha documentado para diatomeas (Goss *et al.* 2010). Sin embargo, en estos organismos se ha descrito que la disipación térmica también depende de la formación del ΔpH y este representa un mecanismo de disipación de energía independiente al CX. En contraste, en algas pardas se ha reportado que la inducción de NPQ depende solo de la formación de pigmentos de-epoxidados del CX y la formación del ΔpH sirve solo para activar la enzima violaxantina de-epoxidasa (García-Mendoza *et al.* 2007).

En dinoflagelados se calculó una r^2 menor ($r^2 = 0.56$) entre el NPQ y la concentración de diatoxantina en muestras mantenidas en oscuridad. La variabilidad no explicada en la relación entre estas variables en oscuridad puede estar asociada a que existan otros procesos que estén afectando la emisión de fluorescencia del FSII. Este proceso debe de tener una cinética de disipación lenta y se evidenció en el alto NPQ remanente detectado en oscuridad.

En nuestros experimentos se observaron cambios en los valores de fluorescencia que pueden indicar un cambio en el tamaño de la antena del complejo colector de luz como mecanismo de NPQ. No se registró la recuperación de los valores de fluorescencia basal (F_0) en condiciones de oscuridad después de ser expuestos los organismos a iluminación saturante, lo cual puede indicar la disminución del tamaño de antena que afecta a su vez los valores de NPQ y su relación con el CX. De igual manera, el uso de inhibidores demostró la presencia de un mecanismo de NPQ independiente del qE (ver sección VI.4.) y se descartó el daño a la maquinaria fotosintética (qI) como responsable de los valores de NPQ que se observaron en oscuridad después de 15 min (NPQ remanente; Figura 7).

VI.4 Inducción de NPQ en presencia de inhibidores del CX, de la formación del ΔpH y FSII e iluminación *Rojo Lejano*.

La inhibición del CX mediante el DTT bloqueó significativamente la formación del NPQ pero no lo inhibió por completo. Asimismo, la disrupción del ΔpH no inhibió por completo la formación del NPQ. El bloqueo parcial del NPQ en presencia de los inhibidores del ΔpH y CX indica que existe un mecanismo independiente del componente qE que afecta la emisión del FSII.

En plantas superiores, se ha descrito que además del qE existen otros mecanismos que pueden afectar la emisión de fluorescencia del FSII por lo que se ven reflejados en la cinética de inducción del NPQ (Niyogi 1999). En plantas

superiores y algunos grupos algales se ha descrito la separación reversible del complejo de la antena principal (LHCII), lo que se denomina estados de transición y su efecto en el NPQ se conoce como qT. La función de los estados de transición es permitir a los organismos responder a cambios en las condiciones de luz a través de la redistribución de la energía de excitación entre el FSII y el FSI. Mediante la asociación/disociación del complejo de la antena principal (LHCII) se logra balancear la capacidad de absorción de luz de los dos fotosistemas (Baroli *et al.* 2003).

En plantas superiores los estados de transición consisten de 3 pasos que conllevan al balance de energía entre el FSII y FSI. La excitación preferencial del FSII reduce el conjunto de plastoquinonas, el cual funciona como activador de las LHCII cinasas que fosforilan proteínas específicas en los complejos del FSII. El complejo fosforilado sufre cambios conformacionales que llevan a la difusión de este a través de la membrana tilacoidal. La unión del complejo fosforilado con el FSI completa el mecanismo de qT (transición de estado 2 a estado 1). Este es un proceso reversible, en condiciones de baja luz o mediante excitación preferencial del FSI que conlleva a la oxidación del pool de plastoquinonas y a la liberación del complejo de antena asociado con el FSI (estado 1 a estado 2) (Bellafiore *et al.* 2005). Los estados de transición también están bien caracterizados en algas verdes y al igual que en plantas superiores se llevan a cabo mediante la migración de complejos de antena del FSII al FSI. En algas verdes se ha reportado así mismo que el estado redox del pool de PQ es afectado por el flujo lineal de electrones modulando estos estados de transición. En dinoflagelados se ha reportado un mecanismo que se asemeja a los estados de transición (Iglesias-Prieto *et al.* 1997; McCabe *et al.* 2008) sin embargo, no se ha caracterizado que parte de la antena es la que se separa ni su aporte para la disipación de energía. Asimismo, no se conocen los procesos que inducen a esta disociación de parte de la antena del FSII en dinoflagelados.

Ya que se descartó que la reducción de la emisión de la fluorescencia este asociada a fotoinhibición (qI), el NPQ independiente del CX y ΔpH es de tipo qT o asociado a la reducción de antena del FSII similar probablemente a los estados de transición descritos para plantas superiores y algas verdes. Por lo tanto, se caracterizó la inducción de este tipo de NPQ manipulando el estado redox de la cadena de transporte de electrones entre fotosistemas.

En nuestros experimentos el estado redox del conjunto de plastoquinonas mediado por el flujo lineal no parece controlar el componente de NPQ parecido a qT. En las cinéticas de fluorescencia en presencia de inhibidores (NH_4Cl y DTT) no se registraron cambios en el tiempo en los valores de F_m al apagar la luz, lo cual indica la separación de la antena como mecanismo de NPQ al existir una sección transversal de absorción menor del FSII. En las muestras iluminadas con RL tampoco se registraron cambios en los valores de F_m en oscuridad, lo cual indica que igualmente se generó la inducción del mecanismo parecido a qT (Figuras 17, 18 y 19). La iluminación RL favorece la actividad del FSI, por lo cual durante los tratamientos en que se utilizó este tipo de iluminación hubo más oxidación de los acarreadores de electrones que en los tratamientos en que no se utilizó. Estos resultados indican que la inducción del componente de NPQ parecido a qT no es controlado por el estado de oxidación de los acarreadores de electrones.

Así mismo, al utilizar DCMU y bloquear el sitio de anclaje de la plastoquinona en la proteína D1 del FSII y bloquear así la reducción de los acarreadores de electrones, aún se registró inducción del NPQ (Figura 23). Durante este tratamiento, los valores de NPQ fueron similares a los registrados en los tratamientos con NH_4Cl+RL , en donde la vía fotoquímica no fue inhibida. Sin embargo, la inducción del NPQ en los tratamientos con NH_4Cl+RL es más rápida que en el tratamiento con DCMU durante los primeros 10 minutos, pasado ese tiempo los valores de NPQ se mantienen constantes (Figura 22). Esto puede deberse a que el aporte del FSII a la inducción del componente de NPQ parecido

a qT se satura por falta de acarreadores de electrones, algo que no sucede en presencia del DMCU en donde la transferencia de energía desde el FSII está inactiva. Lo anterior indica que la actividad del FSII acelera la inducción de la separación de antena (mecanismo de qT), pero no es indispensable para su activación. Esto puede deberse a que el control del mecanismo qT está asociado a un acarreador de electrones (sensor redox) que puede ser reducido por la actividad del FSII (flujo lineal) como por otro proceso que reduzca esta misma molécula independientemente de la actividad de este sistema.

Al incubar los simbioses con DCMU+MV se demostró que la activación del componente de NPQ parecido a qT no depende del estado redox de las plastoquinonas mediado por el flujo lineal. Durante estos tratamientos se inhibió tanto la actividad del FSII como la transferencia de energía desde el FSI y fue en este tratamiento en donde se obtuvieron los valores más altos de NPQ (Figura 23). Por lo tanto, es evidente que el estado reducción de los acarreadores de electrones generado por el flujo lineal (FSII-FSI) no controla directamente el mecanismo de separación de antena en nuestros experimentos.

Aunque el flujo lineal es el principal mecanismo de reducción de acarreadores de electrones, se han caracterizado la reducción de las plastoquinonas independiente de la actividad del FSII. En plantas superiores y algas verdes existe un flujo cíclico de transferencia de energía a través del FSI vía la ferredoxina (Fd) o mediante la reducción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) hacia los acarreadores de electrones (ver esquema figura 22). Este transporte cíclico resulta en la reducción del conjunto de plastoquinonas así como en la formación de un ΔpH . Mediante el flujo cíclico se aumenta la producción de ATP ayudando a mantener la relación estequiométrica entre esta molécula y el NADPH necesario para la fijación de carbono (Joliot *et al.* 1975). Existe otro mecanismo análogo a la respiración en mitocondrias que es capaz de reducir a las plastoquinonas en condiciones de oscuridad se ha reportado en plantas superiores, diatomeas, algas verdes y dinoflagelados simbioses (Cassano

et al. 2000; Peltier *et al.* 2002; McCabe *et al.* 2008). Este mecanismo se conoce como cloro-respiración y al igual que el flujo cíclico utiliza los electrones de la Fd o del NADPH para la reducción de las plastoquinonas las cuales son oxidadas posteriormente por una oxidasa terminal (Figura 22).

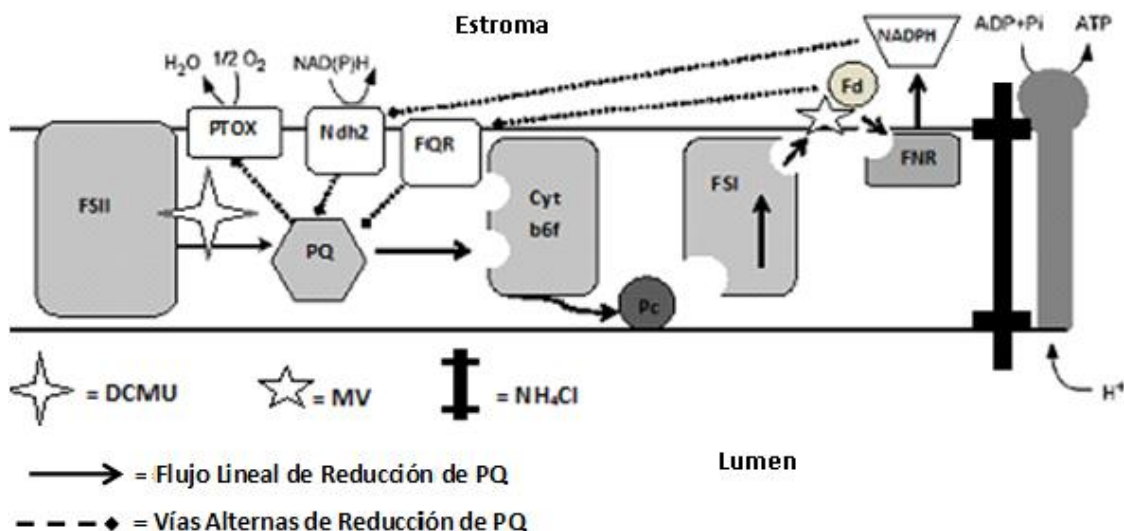


Figura 22.- Modelo de las vías de reducción de los acarreadores de electrones en el aparato fotosintético. La línea continua representa la transferencia de electrones por flujo lineal del fotosistema II (FSII) vía el citocromo b_6/f (Cyt b_6/f) y el fotosistema I (FSI) hasta la ferredoxina (Fd). La línea punteada representa las vías alternas de reducción del conjunto de plastoquinonas (PQ). La reducción no lineal de estos acarreadores se puede llevar a cabo mediante la transferencia de electrones de la ferredoxina vía la enzima FQR (ferredoxin PQ reductasa) o mediante la reducción de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) por la enzima NADPH reductasa 2 (Ndh2). La formación del NADPH se lleva a cabo mediante la reducción de NADP vía la enzima FNR una vez que existió la transferencia de energía de la Fd a esta enzima. La oxidasa terminal (PTOX) oxida las plastoquinonas aun en condiciones de oscuridad en un proceso análogo a la respiración. Los sitios de acción de los inhibidores DCMU, MV y NH_4Cl son indicados en el esquema. Modificado de Peltier *et al.* 2000.

En las cinéticas de fluorescencia de los tratamientos pre-incubados con NH_4Cl sin iluminación RL se registró un incremento en los valores de F_0 al apagar la luz, mismo que gradualmente fue disminuyendo (Figura 16 A). En dinoflagelados simbioses este tipo de cambios en la fluorescencia basal en oscuridad correspondientes a la reducción de las plastoquinonas y su posterior

oxidación se han reportado como clororespiración (McCabe et al 2008). Por lo tanto, probablemente sea la clororespiración sea el mecanismo que regule la disociación parcial de antena del FSII. Durante los tratamientos con $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{RL}$, la sobre-excitación del FSI generó mas oxidación de los acarreadores de electrones, por lo cual el incremento y posterior decaimiento en los valores de F_o correspondientes el aporte de la clororespiración en la reducción y oxidación en oscuridad de estos no fue detectada (Figura 16 B).

Al incrementar la actividad del FSI mediante la iluminación tipo RL, se registraron valores más altos de NPQ que en el tratamiento en que no se utilizó este tipo de iluminación (Figura 23). Es probable que en estos tratamientos se genere un incremento en la concentración de Fd y NADPH mediada por el flujo cíclico alrededor de FSI. Esto puede indicar que en nuestros experimentos la actividad de la clororespiración, mediada por la cantidad de Fd o NADPH disponible para reducir las plastoquinonas, controla la activación del mecanismo de NPQ parecido a q_T .

Durante los tratamientos con DTT, el CX fue inhibido, sin embargo este reactivo también logra reducir a los acarreadores de electrones. Es probable que la transferencia de energía del flujo cíclico se haya visto limitada por la concentración de acarreadores en estado oxidado. Al encontrarse limitada esta vía de transferencia, no puede haber un incremento en la concentración de Fd y NADPH por lo cual la iluminación preferencial del FSI con RL no logró un incremento en el NPQ.

Así mismo, al inhibir la actividad del FSII se hizo evidente el aporte del flujo cíclico para el control de la clororespiración al igual que para la activación del mecanismo de separación de antena. Igualmente se comprobó la influencia del ΔpH en la inducción del NPQ (Figura 23).

Al incubar a los simbioses con DCMU se inactiva la transferencia de electrones del FSII, sin embargo la actividad del FSI no es inhibida por lo cual

durante este tratamiento, mediante flujo cíclico se logra la reducción y oxidación de los acarreadores de electrones (PQ) y como consecuencia, la inducción del componente de NPQ parecido a q_T . Durante estos tratamientos, la transferencia de cargas entre los acarreadores de electrones probablemente genera una diferencia de pH a través de la membrana que mantiene activa a la enzima ATP sintetasa la cual utiliza protones de lumen para la formación de ATP, por lo cual no da la formación de un ΔpH . Al inhibir la transferencia de energía del FSII y el FSI mediante DCMU+MV, la ATP sintetasa se encuentra inactiva y se da la formación de un ΔpH generado por la actividad de la cloro respiración. En estas condiciones la inducción del NPQ fue rápida al compararla con el tratamiento de DCMU e igualmente se registraron valores más altos. Al incubar a los simbioses con DCMU+MV+NH₄Cl, el ionóforo rompe el gradiente de protones generado por la cloro respiración limitando la inducción del NPQ.

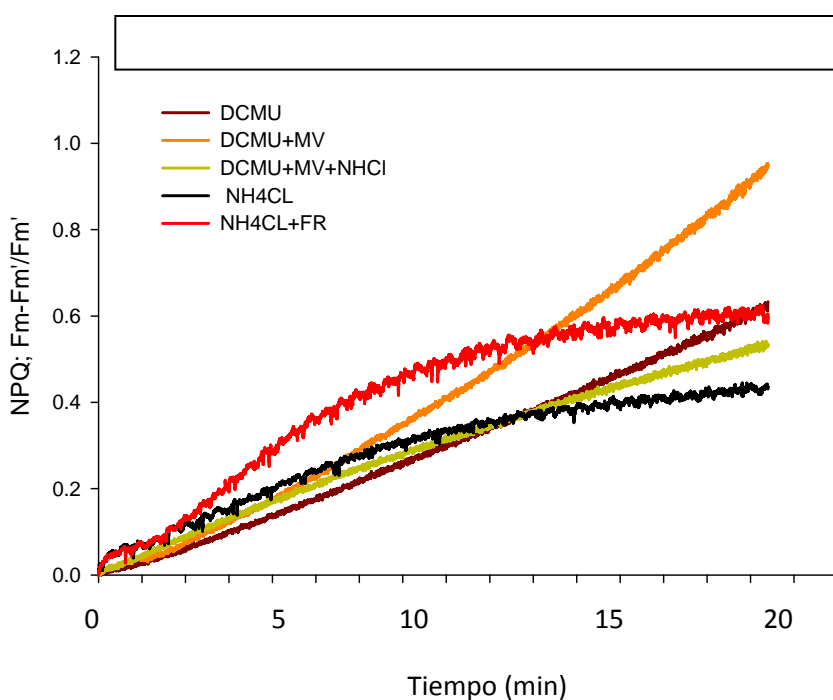


Figura 23: NPQ calculado a partir de la cinética de decaimiento de la fluorescencia de *Chl a* en simbioses recién aislados expuestos a $1000 \mu\text{mol quanta} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ por 20 min en presencia de distintos inhibidores. Cada línea representa el promedio de 3 mediciones.

Estos resultados indican que la clororespiración, probablemente el único mecanismo de reducción de PQ no afectado por los inhibidores, está asociada con la inducción de la separación parcial de antena que afecta la emisión de fluorescencia del FSII. Este proceso sería análogo al componente qT del NPQ descrito para plantas superiores y algas verdes. Sin embargo, es probable que el ΔpH sí influya en la inducción de la separación de antena, probablemente facilitando su liberación del FSII. Es probable que el ΔpH , al igual que en plantas superiores y diatomeas, genere cambios alostéricos en el complejo de antena del FSII que faciliten su liberación. Sin embargo, en caso de ser este un proceso análogo al de plantas superiores, no se puede descartar que el ΔpH aumente la actividad de las cinasas destinadas a fosforilar la antena.

De igual manera, cuando el FSII no es funcional (en presencia de DCMU; Figura 21) se detectó que el NPQ independiente del CX tarda en activarse al estar los organismos expuestos a una intensidad lumínica baja. En contraste, en altas irradiancias la activación es inmediata. Parece que el NPQ independiente del CX es un mecanismo asociado al FSI con una cinética de activación en función de la intensidad lumínica. Con estos resultados se comprueba que la actividad del flujo cíclico alrededor del FSI influenciado por el incremento en el tamaño de antena, favorece la actividad de la clororespiración mediante el incremento en la concentración de Fd y NADPH. El aporte del flujo cíclico no es evidente durante los primeros minutos de iluminación a bajas irradiancias, sin embargo, una vez que se da la separación de antena del FSII y su adición al FSI, el aporte de este mecanismo a la inducción del NPQ genera una caída lineal en los valores de fluorescencia.

Con estos experimentos quedó demostrado que en los dinoflagelados simbiontes de la anémona *Antopleura elegantissima* es el estado de reducción de las plastoquinonas controla la separación de antena parecido a qT a través de la clororespiración. Así mismo, se demostró el aporte del flujo cíclico del FSI en la regulación de este componente de NPQ.

Aunque no se generó evidencia directa de la separación de las antenas, los valores de NPQ sugieren la presencia de este mecanismo actuando en conjunto con el CX en la disipación de energía. La acción combinada de estos dos mecanismos sugiere un modelo de regulación distinto a aquel propuesto tanto para plantas superiores como para diatomeas. La dependencia de la activación del NPQ en la síntesis de diatoxantina combinada con el efecto de la separación de antenas sugiere que para la unión de la diatoxantina al complejo colector de luz y lograr la formación de un estado disipador de la antena, es necesaria la disociación de esta.

La cinética de inducción de NPQ en tratamientos sin inhibidores es similar al cambio de NPQ que se detectó en presencia de DTT y NH_4Cl . Esto es particularmente evidente al principio de la exposición de los organismos a alta luz. Se observó que en la mayoría de los tratamientos el aumento de NPQ empieza de después de 3 min de iluminación. La similitud en las cinéticas de inducción entre los tratamientos con y sin inhibidores puede explicarse a que probablemente la separación de parte de la antena de FSII es necesaria para la inducción del NPQ asociado al CX. En plantas superiores, el ΔpH genera cambios alostéricos en los complejos de luz que ocasionan la liberación de la violaxantina de su punto de unión en el complejo colector de luz para que esta sea alcanzada por la VDE (Niyogi *et al.* 1999). En diatomeas, aunque no se han reportado cambios alostéricos en las antenas para lograr la liberación de la diadinoxantina, este cambio es considerado como necesario para el funcionamiento de los mecanismos ya descritos sobre la inducción del NPQ (Goss *et al.* 2010).

Es posible que en los dinoflagelados de la anémona *Anthopleura elegantissima* sea necesaria la separación parcial de la antena del FSII para lograr la liberación de la diadinoxantina de los complejos protéicos para que pueda ser de-epoxidada. Este proceso sería lento en comparación a otros organismos ya que no se detectó la presencia de diatoxantina durante los primeros 3 min de exposición a luz. La ausencia de un componente del NPQ regulado por la

protonación de los complejos colectores de luz evidenciado por una lenta cinética de activación se asemeja a lo reportado en algas pardas (García-Mendoza *et al.* 2011) en donde se ha comprobado la ausencia de este mecanismo y que el ΔpH solo funciona para activar la enzima de-epoxidasa y no representa un mecanismo de disipación de energía en sí. Aun así, la cinética de inducción del NPQ en el tratamiento con DCMU+MV y la cinética de decaimiento de fluorescencia del tratamiento con DTT indican que el mecanismo de NPQ parecido a qT se acelera en presencia del ΔpH . Esto puede indicar que existen cambios alostéricos que faciliten la liberación de la antena del FSII, sin embargo no representan un mecanismo de fotoprotección como el descrito para plantas superiores, algas verdes y diatomeas. De igual manera, en caso de que el mecanismo de qT sea análogo al descrito en plantas superiores y algas verdes, no se puede descartar el incremento de la actividad de las enzimas cinasas responsables de la fosforilación de la antena por el cambio en el pH.

Los cambios en la fisiología de los organismos fototróficos se inducen en respuesta a las variación en la cantidad y calidad de luz que inciden sobre estos. En organismos planctónicos, esta variación está asociada a los movimientos de las células en la columna de agua pudiendo presentarse en periodos de tiempo cortos. Bajo estas condiciones es indispensable contar con un mecanismo de fotoprotección rápida y reversible capaz de disipar el exceso de energía sin alterar la capacidad de captación de luz a largo plazo. Los mecanismos de fotoprotección descritos para diatomeas se ajustan a esta respuesta. La protonación de complejos colectores de luz así como la rápida activación del ciclo de las xantofilas en condiciones de estrés lumínico es un eficiente mecanismo eficiente cuya reversibilidad permite la regulación de la energía recibida sin alterar la estructura de las antenas pigmentarias. Estas respuestas a los cambios de luz son resultado de la adaptación de estos organismos a las condiciones plantónicas en las que habitan (Goss *et al.* 2010).

En dinoflagelados, la respuesta fisiológica a las variaciones de luz puede no estar ligada a la adaptación de estos a su ambiente. La condición fototrófica de los dinoflagelados es resultado de varias simbiosis de estos con organismos autótrofos y no está presente en todas las especies de dinoflagelados, habiendo especies mixótrofas o heterótrofas (ten Louhis *et al.* 1998). Particularmente, se cree que el ciclo de xantofilas con diatoxantina como pigmento fotoprotector es resultado de la endosimbiosis de los dinoflagelados con un organismo perteneciente al linaje de las algas rojas (Goss *et al.* 2010). Más aun, la condición simbiótica con organismos bénticos representa un ambiente lumínico al cual difícilmente se encuentran los organismos plantónicos, por lo cual es de esperarse que la respuesta fisiológica al exceso de luz sea regulada de una forma distinta. En dinoflagelados simbiontes, los cambios más drásticos en las condiciones de luz no resultan del movimiento de la columna de agua si no del comportamiento activo del hospedero así como del régimen de mareas en el que se encuentre. De igual manera, la pigmentación del hospedero puede generar variaciones en la intensidad y longitud de onda de luz incidente en los simbiontes regulando en forma independiente a estos la cantidad y calidad de luz (Dove *et al.* 2006).

Así mismo la peridinina, el principal pigmento accesorio de los complejos colectores de luz en dinoflagelados, no se encuentra en ningún otro organismo autótrofo y se encuentra presente igualmente en las especies de dinoflagelados no fotosintéticos (ten Louhis *et al.* 1998). Aunque existe información acerca de la estructura y composición de los complejos colectores de luz que forma este pigmento (Peridinin Chlorophyll Protein), se desconoce su función en la disipación de energía.

Con este trabajo se comprobó que los mecanismos que intervienen en la disipación de energía de forma no fotoquímica en dinoflagelados simbiontes de la anémona *Anthopleura elegantissima* presentan variaciones respecto a los procesos ya reportados de NPQ en otros organismos. Aunque los componentes

del NPQ que se describieron aquí han sido reportados para otros organismos, los procesos de regulación de los mismos presentan diferencias.

VII. Conclusión

Los resultados de este trabajo demuestran que el control de la disipación térmica en dinoflagelados simbiontes de la anémona *Anthopleura elegantissima* es diferente a otros organismos. La cinética y procesos que la regulan parece ser diferente a lo reportado para otros organismos y particularmente a aquellos que presentan el mismo tipo de ciclo de xantofilas.

VIII. Referencias

Allen, J.F., J. Bennett, K.E. Steinbach y C.J. Arntzen. (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation between photosystems. *Nature*. 291:25-29.

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.

Aro E.M., I. Virgin y B. Andersson. (1993) Photoinhibition of photosystem II. inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta.* 143:113–134.

Baroli I., Melis A. (1998) Photoinhibitory damage is modulated by the rate of photosynthesis and by the photosystem light-harvesting chlorophyll antenna size. *Planta* 205:288–96.

Banaszak A.T. y R.K. Trench. (1995) Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal–invertebrate symbiosis. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 194:233–250.

Bellafiore S., F. Barneche, G. Peltier y J. Rochaix. (2005) State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* 433: 892-895.

Bendall, D.S. y R.S. Manasse.(1995) Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1229: 23–38.

Brown, B. E., Ambarsari, I., Warner, M. E., Fitt, W. K., Dunne, R. P., Gibb, S. W. y Cummings, D. G. (1999) Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophylls concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs.* 18: 99–105.

Cassano L.M., J. Zapata, M. Martín y B. Sabater. (2000) Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron acceptor between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J. Biol. Chem.* 275:942-948.

Demmig-Adams B. (1990) Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1020: 1-24.

Demmig-Adams B. y W.W. Adams. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.

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

Dove, S., J. C Ortiz, S. Enríquez, M. Fine., P. Fisher, R Iglesias-Prieto, D. Thornhill y O. Hoegh-Guldberg. (2006) Response of holosymbiont pigments from the scleractinian coral *Montipora monasteriata* to short-term heat stress. *Limnol. Oceanogr.* 51: 1149-1158.

Downs C.A., J. Fauth, C. Halas, P. Dustan, J. Bemiss, y C. Woodley. (2002) Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology & Medicine.* 33: 533–543.

Engebretson H.P. y G. Muller-Parker. (1999) Translocation of photosynthetic carbon from two algal symbionts to the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Bio. Bull.* 197: 72-81.

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

García-Mendoza E y M.F. Colombo-Pallotta. (2007) The giant kelp *Macrocystis pyrifera* presents a different non-photochemical quenching control than in higher plants. *New Phycol.* 173:526–536

García-Mendoza E, H. Ocampo-Álvarez y Govindjee. (2011) Photoprotection in the brown alga *Macrocystis pyrifera*: Evolutionary implications. *Journal of Photochemistry and Photobiology.* DOI:10.1016.

Gates RD, G. Baghdasarian y L. Muscatine. (1992) Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Bio. Bull.* 182:324-332.

Goss R, T. Jakob. (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynthesis Research*. DOI: 10.1007

Goss R, E. Pinto, C. Wilhelm y M. Richter. (2006b) The importance of a highly active and DpH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin cycle containing algae. *J. Plant Physiol.* 163:1008–1021.

Grouneva I, T. Jakob, C.Wilhelm y R.Goss. (2008) A New Multicomponent NPQ Mechanism in the Diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Plant Cell Physiol.* 49(8): 1217–1225.

Halac S, E. García-Mendoza y AT. Banaszak. (2009) Ultraviolet radiation reduces the photoprotective capacity of the marine diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae, Heterokontophyta), *Journal of Photochemistry and Photobiology.* 85, 807-815.

Hill R., A.W.D. Larkum, C. Frankart , M. Kuhl y P.J. Ralph. (2004) Loss of functional Photosystem II reaction centres in zooxanthellae of corals exposed to bleaching conditions: using fluorescence rise kinetics. *Photos. Res.*82:59–72.

Hiller R.G, P.M. Wrench y F.P. Sharples. (1995). The light harvesting chlorophyll *a-c*-binding protein of dinoflagellates: a putative polyprotein. *FEBS Lett* 363: 175–178.

Hoegh-Guldberg O. (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Marine & Freshwater Research.* 8: 839-86.

Horton P., M.P. Johnson, M.L. Perez-Bueno, A.Z. Kiss y A.V. Ruban. (2008) Photosynthetic acclimation: does the dynamic structure and macroorganisation of photosystem II in higher plant grana membranes regulate light harvesting states? *FEBS J.* 275:1069–1079.

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

Iglesias-Prieto, R. y R.K. Trench. (1997) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates II. Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 130: 23-33.

Jackson J. y K.G. Johnson. (2001). Measuring past Biodiversity. *Science.*93: 2401-04.

Jakob T., R Goss y C. Wilhelm. (2001) Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiology* 158: 383--390.

Joliot P. y B. Kok. (1975) Oxygen evolution in photosynthesis. In Govindjee, ed, *Bioenergetics of Photosynthesis*. Academic Press, New York, pp. 388-441.

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

Larkum A.W.D., S.E. Douglas, J.A Raven (eds). (2003) *Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 437-455 pp.

La Jeunesse T.C., J.D. Thornhill, E.F. Cox, F.G.Stanton, W.K. Fitt y G.W. Schmidt. (2004) High diversity and host specificity observed among symbiotic dinoflagellates in reef coral communities from Hawaii. *Coral Reefs.* 23: 596-603.

Lesser M.P. (1997) Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs.* 16: 87-192.

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

McCabe J., F. Reynolds, B. U. Bruns, W. K. Fitt, y G. W. Schmidt. (2008) Enhanced photoprotection pathways in symbiotic dinoflagellates of shallow-water corals and other cnidarians. *PNAS.* 105: 13674--13678.

Morosinotto, T., S.Caffari, L. Dall'Osto y R. Bassi. (2003) Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant thylakoids. *Plant Physiology*. 119: 347–354.

Morse, D. (1995) A nuclear encoded Form-II Rubisco in dinoflagellates. *Science*. 269: 17-17.

Muller P, L. Ping y K.K. Niyogi. (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiology*. 125: 1558– 1566.

Mueller-Parker, G. y S.K. Davy. (2001) Temperate and tropical algal-sea anemone symbioses. *Invertebr. Biol.* 120:104–123.

Mueller-Parker G., J.Pierce-Cravens y B. L. Bingham. (2007) Broad thermal tolerance of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium muscatinei* (Dinophyta) in the sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Cnidaria) from northern latitudes. *J. Phycol.* 43: 25–31.

Muscatine L.M. (1990) The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. In *Coral Reefs Ecosystems of the World* (Dubinsky, Z., ed.), pp. 75–87, Elsevier, Vol. 25.

Niyogi K.K. (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-359.

Niyogi K.K., Li X-P, V. Rosenberg , H-S. Jung . (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *Journal of Experimental Botany*. 56: 375–382.

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

Peers G., B. Truong, E. Ostendorf, A. Busch, D. Elrad, M. Grossman y K.K. Niyogi. (2009) An ancient light-harvesting protein is critical for the regulation of algal photosynthesis. *Nature*. 462: 518–521.

Peltier G. y L.Cournac. (2002) Chlororespiration. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 53: 523–550.

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

ten Lohuis M.R. y D. J. Miller. (1998) Light-regulated transcription of genes encoding peridinin chlorophyll a proteins and the major intrinsic light-harvesting complex proteins in the dinoflagellate *Amphidinium carterae* hulburt (Dinophyceae). Plant Physiol. 117: 189–196.

Trench R. K. (1997). Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses. Proc. 8th Int. Coral Reef Symp. 2: 1275–1286.

Warner M.E., y S. Berry-Lowe. (2006) Differential xanthophyll cycling and photochemical activity in symbiotic dinoflagellates in multiple locations of three species of Caribbean coral. J.Exp. Mar. Biol. Ecol. 339: 86–95.

Warner M.E., W.K. Fitt, y G.W. Shmidt. (1999) Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. PNAS. 96: 8007–8012.

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

Verde E. A., y L. R. McCloskey. (1996) Photosynthesis and respiration of two species of algal symbionts in the anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt) (Cnidaria, Anthozoa). J.Exp. Mar. Biol. Ecol. 195: 187–202.

Verde E.A., y L. R. McCloskey. (2001) A comparative analysis of the photobiology of zooxanthellae and zoochlorellae symbiotic with the temperate clonal anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt) I. Effect of temperature. *Mar. Biol. Ecol.* 138: 477- 489.

Yamamoto H.Y., T.O.M. Nayakama, C.O. Chichester. (1962) Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 97: 168–173.

Younge A., D. Phillip , A. Ruban, P. Horton y H.A.Frank. (1997) The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure & Appl .Chem.* 69:2125-2130.