



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Regulación de la Fotoinhibición de la Fotosíntesis en el Pasto Marino

Zostera marina

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN OCEANOGRAFÍA COSTERA
P R E S E N T A
ENEAS AGUIRRE VON WOBESER

Ensenada, Baja California, Junio de 2002

RESUMEN

Irradiancias excesivas pueden reducir la fotosíntesis de organismos fotosintéticos, incluyendo pastos marinos. A este fenómeno se le conoce como fotoinhibición de la fotosíntesis. La fotoinhibición puede afectar estimaciones de la productividad de praderas de pastos marinos, ya que puede reducir la fotosíntesis en las horas de mayor irradiancia. En este trabajo, se estudió el papel de la irradiancia en la regulación de la fotoinhibición del pasto marino *Zostera marina* ante irradiancias elevadas. La fotoinhibición de la fotosíntesis de *Z. marina* se evaluó mediante fluorescencia de pulsos de amplitud modulada, considerando como fotoinhibición una reducción de la tasa de transporte de electrones en el fotosistema II ante incrementos de irradiancia. La tasa de transporte de electrones presentó una relación lineal positiva con la irradiancia. Lo anterior demuestra que la tasa de transporte de electrones es un parámetro adecuado para estudiar fenómenos que afectan la fotosíntesis. Pastos expuestos a altas irradiancias presentaron una reducción de la fotosíntesis de 30% en las horas de mayor irradiancia. La pendiente de la relación entre la fotosíntesis y la irradiancia se redujo de 0.2 a 0.16 $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}/\mu\text{mol}$ a irradiancias superiores a 800 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, al tiempo que la disipación no fotoquímica de energía, determinada por fluorescencia, se incrementó de 0.25 a 0.6. La disipación no fotoquímica de energía presentó una correlación con la tasa de transporte de electrones. Lo anterior sugiere que la disipación no fotoquímica de energía juega un papel importante en la regulación de la fotosíntesis en *Z. marina*. Pastos de la zona intermareal aclimatados a bajas

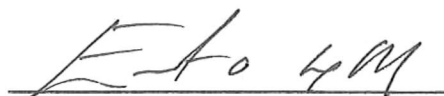
irradiancias sufrieron fotoinhibición de la fotosíntesis al exponerlos a altas irradiancias. Sin embargo, la fotoinhibición desaparece en menos de 8 d. Pastos de la zona submareal presentaron fotoinhibición de la fotosíntesis al ser expuestos a altas irradiancias, pero se aclimataron en menos de 6 d. Lo anterior sugiere que los pastos de la zona submareal se podrían aclimatar a las irradiancias presentadas en la zona intermareal. También se analizó el efecto de las altas irradiancias en la morfología de *Z. marina*. Se ha observado que pastos de la zona intermareal presentan hojas de menor longitud que los de la zona submareal. Menores longitudes pueden reducir la fotoinhibición, ya que una mayor longitud permite que una parte del organismo se encuentre más tiempo en contacto con la parte superficial de la columna de agua, donde la irradiancia es mayor. Se demostró que la longitud de los haces de *Z. marina* decrece ante irradiancias elevadas.

Resumen aprobado por:



Dr. Alejandro Cabello Pasini
Presidente del Jurado

Dr. José A. Zertuche González
Sinodal Propietario



Dr. Ernesto García Mendoza
Sinodal Propietario

REGULACIÓN DE LA FOTOINHIBICIÓN
DE LA FOTOSÍNTESIS EN EL PASTO
MARINO *Zostera marina*

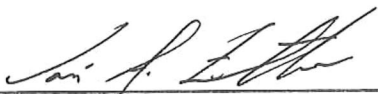
TESIS
QUE PRESENTA PARA OBTENER EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN OCEANOGRAFIA COSTERA:

ENEAS AGUIRRE VON WOBESER

Aprobada por:



Dr. Alejandro Cabello Pasini
Presidente del Jurado



Dr. José A. Zertuche González
Sinodal Propietario



Dr. Ernesto García Mendoza
Sinodal Propietario

AGRADECIMIENTOS

Agradezco por su invaluable ayuda en la realización de esta tesis a las siguientes personas e instituciones

Alejandro Cabello

Miriam Morales

Gisela von Wobeser, Eugenio Aguirre, Ernesto García, José Zertuche, Raquel Muñiz, Alonso Galindo, José Guzmán, Edgar Arrollo, Socorro Muñoz, Gloria Padilla, Nemer Narchi, David Ward ...

Angélica

Todos mis compañeros de generación (especialmente a Alejandra, Juan Antonio y Juan Manuel)

Todos mis maestros (especialmente a los de macroalgas y los de luz y fotosíntesis)

Mis cuates.

Los del fotón de la calle

Familia Aguirre Muñoz

Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología

Facultad de Ciencias Marinas

Instituto de Investigaciones Oceanológicas

ÍNDICE

Resumen	ii
Votos aprobatorios	iv
Agradecimientos	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
Abreviaturas.....	xi
Introducción	1
Antecedentes	5
Fotoinhibición de la fotosíntesis	5
La fluorescencia como medida de la fotoinhibición	8
La fotoinhibición de la fotosíntesis en <i>Zostera marina</i>	11
Hipótesis	13
Objetivos	14
Métodos	15
Pastos Marinos.....	15
Incubaciones a Diferentes Irradiancias.....	15
Fluorescencia	15
Fotosíntesis por Evolución de Oxígeno.....	17
Irradiancia Incidente	18
Diseño Experimental	18
Correlación entre la Fluorescencia y Evolución de Oxígeno.....	18
Fotoinhibición de la fotosíntesis en <i>Z. marina</i>	19

Ciclos diurnos de fotoinhibición	19
Aclimatación de <i>Z. marina</i> a las altas irradiancias	19
Efecto de la irradiancia sobre la morfología de <i>Z. marina</i>	20
Estadística.....	20
Resultados	21
Relación entre la fluorescencia y la evolución de oxígeno	21
Fotoinhibición de la fotosíntesis	21
Efecto de la irradiancia sobre la fotosíntesis.	21
Efecto de la preaclimatación sobre los ciclos diurnos de fotosíntesis	29
Aclimatación de <i>Z. marina</i> a la fotoinhibición	32
Aclimatación de pastos submareales e intermareales.....	35
Efecto de la irradiancia en la morfología de la <i>Zostera marina</i>	38
Discusiones	41
Conclusiones	48
Referencias	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Correlación entre la Tasa de Transporte de Electrones (ETR) y la fotosíntesis medida por evolución de oxígeno en <i>Zostera marina</i>	22
Figura 2. Cambios diurnos de la Tasa de Transporte de Electrones en <i>Zostera marina</i> , colectada en la zona intermareal y en la zona submareal bajo el 100% de la irradiancia incidente.....	23
Figura 3. Efecto de la irradiancia sobre la fotosíntesis de <i>Zostera marina</i> aclimatada por 38 días a 20, 55 y 100% de la irradiancia incidente.....	24
Figura 4. Tasa de Transporte de Electrones de <i>Zostera marina</i> en función de la Disipación No Fotoquímica (NPQ) de energía.	26
Figura 5. Absortancia de <i>Zostera marina</i> colectada en la zona intermareal y submareal en función del tiempo de incubación a 20, 55 y 100% de la irradiancia incidente.....	28
Figura 6. Cambios diurnos de la Tasa de Transporte de Electrones de <i>Zostera marina</i> aclimatada previamente a 20 y 100% de la irradiancia incidente, bajo 100% y bajo 20% de la irradiancia incidente	30
Figura 7. Tasa de Transporte de Electrones en función de la irradiancia de <i>Zostera marina</i> a 100% de la irradiancia incidente en pastos aclimatados al 20 y 100% de la irradiancia incidente	31
Figura 8. Cambios diurnos de la Tasa de Transporte de Electrones en <i>Zostera marina</i> a lo largo de un día, preaclimatada al 20 y 100% de la irradiancia incidente e incubada a 100% de la irradiancia incidente por 1, 8 y 14 d	33

Figura 9. Tasa de Transporte de Electrones de <i>Zostera marina</i> aclimatada al 20% de la irradiancia incidente, relativa a la Tasa de Transporte de Electrones de <i>Z. marina</i> aclimatada al 100% de irradiancia incidente a la hora de máxima irradiancia de cada día con el 100% de la irradiancia incidente	34
Figura 10. Cambios diurnos de la Tasa de Transporte de Electrones en <i>Zostera marina</i> de la zona submareal e intermareal e incubada a 100% de la irradiancia incidente por 1, 5 y 11 d.....	36
Figura 11. Tasa de Transporte de Electrones de <i>Zostera marina</i> de la zona submareal, relativa a la Tasa de Transporte de Electrones de <i>Z. marina</i> de la zona intermareal a la hora de máxima irradiancia de cada día con el 100% de la irradiancia incidente.....	37
Figura 12. Longitud del haz de <i>Zostera marina</i> al ser colectada en el campo (inicial) y después de 52 días de incubación bajo 20 , 55 y 100% de la luz solar incidente	39
Figura13. Ancho del haz de <i>Zostera marina</i> después de haber sido incubada por 52 días bajo 20, 55 y 100% de la luz solar incidente.....	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1- Parámetros de curvas Fotosíntesis – Irradiancia realizadas en pastos colectados en la zona intermareal y aclimatados por 41 d a 20 y 100% de la irradiancia incidente.....	27
---	----

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosina Trifosfato
E	Irradiancia incidente
E_K	Coeficiente de saturación
ETR	Tasa de transporte de electrones a través del fotosistema II
ETR_{MAX}	Tasa de Transporte de Electrones en saturación por luz
F_m'	Fluorescencia máxima en condiciones de luz
F_t	Fluorescencia basal
NPQ	Disipación no fotoquímica de energía
P	Fotosíntesis
$P(O_2)$	Evolución fotosintética de oxígeno
PAM	Pulsos de amplitud modulada
Plantas C_3	Plantas cuya asimilación de carbono se basa únicamente en el ciclo de reducción de las pentosas
Plantas C_4	Plantas cuya asimilación de carbono incluye la carboxilación del fosfoenol piruvato
PSI	Fotosistema I
PSII	Fotosistema II
RUBISCO	Ribulosa 1,5 Difosfato Carboxilasa Quinasa
ΔF	Fluorescencia Variable
$\Delta F/F_m'$	Rendimiento Cuántico Efectivo del Fotosistema II

α_{ETR}

Pendiente de la relación entre la Tasa de Transporte de Electrones
y la Irradiancia en la parte lineal a bajas irradiancias

INTRODUCCIÓN

Los organismos fotosintéticos utilizan la energía de la luz solar que llega a la superficie de la tierra para producir energía química y materia orgánica. La fotosíntesis aumenta típicamente con el incremento de la irradiancia hasta saturarse en un valor máximo (King y Schramm, 1976; Dubinsky *et al.*, 1995; Beach y Smith, 1996a). En ocasiones la fotosíntesis máxima se ve reducida con exposiciones prolongadas a altas irradiancias (Jiménez *et al.*, 1987; Dawes, 1992; Osmond, 1994). La reducción de la fotosíntesis asociada a altos niveles de irradiancia se conoce como fotoinhibición (Leverenz *et al.*, 1990; Osmond, 1994).

Las irradiancias altas pueden dañar el aparato fotosintético de plantas acuáticas y terrestres. Cuando la absorción de luz excede la capacidad máxima de procesamiento de energía de un organismo fotosintético, se acumulan transportadores de electrones reducidos, tales como la plastoquinona. La presencia de la plastoquinona reducida dificulta la separación de cargas en el fotosistema II (PSII), y el tiempo de vida del centro de reacción excitado se incrementa (Krause y Weis, 1991). La permanencia de la excitación en el centro de reacción permite la formación de radicales que requieren más tiempo que la separación de cargas para formarse. Estos radicales incluyen estados de excitación singuletes de oxígeno, que son altamente reactivos, y destruyen las proteínas que constituyen el centro de reacción (Demmig-Adams y Adams, 1992).

Los organismos fotosintéticos han desarrollado mecanismos fotoprotectores para disminuir la destrucción de las proteínas del aparato fotosintético en presencia

de altas irradiancias. Algunos mecanismos fotoprotectores disminuyen la absorción de energía en el PSII, mientras que otros favorecen la disipación de energía ya absorbida. Los cloroplastos, por ejemplo, pueden migrar dentro de la célula a una posición que minimiza absorción de luz. En algunas plantas, las xantofilas, unos carotenoides comunes en organismos fotosintéticos, se modifican a una forma capaz de recibir energía de excitación de la clorofila *a* y transformarla en calor (Demmig-Adams y Adams, 1992; García Mendoza, 2000).

La fotosíntesis máxima no puede ser sostenida en altas irradiancias en ausencia de mecanismos adecuados de disipación del exceso de energía. Sin embargo, los mecanismos fotoprotectores implican inversiones en carbono y energía, que serían superfluos en ausencia de altas irradiancias. Por lo tanto, si se incrementa la irradiancia diaria integrada que recibe un organismo o se le expone a factores que incrementan su sensibilidad a la irradiancia, como bajas temperaturas, escasez de nutrientes, etc. (Osmond, 1994), la eficiencia de disipación de energía puede ser insuficiente. La acumulación de energía en el aparato fotosintético incrementa la probabilidad de formación de radicales oxidantes en el aparato fotosintético, y en consecuencia la fotoinhibición de la fotosíntesis. En general, los organismos aclimatados o adaptados a altas irradiancias tienen más capacidad de disipación no fotosintética de energía (Osmond, 1994). Los organismos aclimatados a bajas irradiancias, en cambio, son más propensos a sufrir fotoinhibición (Osmond, 1994).

Los organismos fotosintéticos bentónicos no pueden regular la irradiancia que reciben debido a que se encuentran fijos al sustrato. En la zona intermareal, la luz que reciben los organismos bentónicos es altamente variable y depende fuertemente de la marea (Zimmerman *et al.*, 1994). Por lo tanto, la fotoinhibición de la fotosíntesis puede afectar a los organismos fotosintéticos intermareales (Hanelt *et al.*, 1994). Los organismos bentónicos, sin embargo, pueden aclimatarse a diferentes niveles de irradiancia, minimizando los daños al aparato fotosintético en luz intensa (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2000) o incrementando la concentración de pigmentos en luz baja (Ramus *et al.*, 1976a; Beach y Smith, 1996b; Cabello-Pasini *et al.*, 2000). Sin embargo, muchos organismos intermareales sufren periodos de baja irradiancia intercalados con periodos de irradiancia excesiva (Zimmerman *et al.*, 1994; Hanelt *et al.*, 1994). El aparato fotosintético de algunos organismos del intermareal bajo probablemente se encuentra aclimatado a bajas irradiancias, y sufre fotoinhibición cuando se expone a altas irradiancias en mareas vivas.

El pasto *Zostera marina* L. es una angiosperma subacuática común en lagunas costeras de Baja California. Gran parte de las praderas de *Z. marina* se encuentran descubiertas en marea baja, mientras que permanecen sumergidas el resto del tiempo (Cabello-Pasini *et al.*, en prensa; Cabello-Pasini *et al.*, en revisión). Es probable que *Z. marina* se encuentre aclimatado a las condiciones prevalecientes de baja irradiancia, y sufra fotoinhibición de la fotosíntesis en mareas vivas cuando la marea baja coincide con el mediodía. El estudio de la fotoinhibición en *Z. marina* es crítico para incorporar los resultados en futuros modelos de

productividad primaria y planes de manejo de humedales. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es analizar las condiciones en que se presenta fotoinhibición de la fotosíntesis en *Z. marina*.

ANTECEDENTES

Fotoinhibición de la fotosíntesis

La fotosíntesis engloba muchos mecanismos biofísicos que funcionan en cadena, de manera que los productos de una reacción son utilizados para las reacciones subsecuentes. Por lo tanto, si hay un exceso de luz en relación a la capacidad de la célula de utilizar productos de la fase luminosa, los componentes de la fase luminosa no tienen dónde canalizar la energía que acumulan. Cuando toda la ferredoxina se encuentra reducida, el PSI no puede canalizar más electrones, y deja de oxidar la plastocianina que proviene del complejo citocromo b_6/f . El complejo citocromo b_6/f , a su vez, deja de oxidar la plastoquinona reducida que proviene del PSII. En estas condiciones, el sitio de anclaje de plastoquinona Q_B se encuentra vacío, y la plastoquinona que se encuentra fija en el sitio Q_A carece de un receptor de electrones, y permanece reducida. La presencia del primer aceptor de electrones en forma reducida inhibe la separación de cargas y favorece la recombinación de cargas (Krause y Weis, 1991). Esto provoca que la clorofila a se encuentre más tiempo excitada, y aumente la probabilidad de que reaccione con el oxígeno, formando radicales altamente oxidantes, como singuletes de oxígeno (Falkowsky y Raven, 1997).

Los radicales oxidantes que se forman en irradiancias excesivas pueden reaccionar con diferentes tipos de materia orgánica (Falkowsky y Raven, 1997). Sin embargo, comúnmente reaccionan con la proteína D1 del PSII, que contiene al centro de reacción. El centro de reacción excitado tiene un alto potencial de

oxidación, y tiene una alta probabilidad de formar radicales oxidantes en presencia de oxígeno (Krause y Weis, 1991). La proteína D1 se encuentra en constante regeneración en presencia de luz en muchos organismos fotosintéticos (Krause y Weis, 1991). Sin embargo, en ocasiones la tasa de destrucción excede la tasa de regeneración, y se acumulan centros de reacción PSII inactivos. La falta de actividad de una fracción de los centros de reacción PSII provoca una reducción de la capacidad máxima de fotosíntesis del organismo (Osmond, 1994). Para evitar el daño a los centros de reacción del PSII, algunos organismos han desarrollado estrategias de fotoprotección, que involucran una reducción de la absorción de luz, una eficientización de la utilización de energía química y poder reductor producidos en la fotosíntesis y una disipación de energía por vías alternas a la separación de cargas, y el transporte de electrones.

La síntesis de enzimas del ciclo de Calvin, así como el incremento evolutivo de su velocidad y afinidad por el sustrato, son estrategias para la tolerancia a las altas irradiancias. La presencia de más enzimas o de enzimas más eficientes favorece la utilización de los productos de la fase luminosa, y permite un mayor flujo de electrones, reduciendo el daño al PSII (Osmond, 1994). Asimismo, otras rutas metabólicas que consumen poder reductor y energía química, como la asimilación de nitratos, pueden proteger el aparato fotosintético si la eficiencia de las proteínas involucradas en las reacciones enzimáticas se incrementa evolutivamente.

La energía que llega al aparato fotosintético se puede disminuir de diferentes maneras. A nivel ecológico, las poblaciones pueden incrementar su densidad, para que unos organismos provoquen sombra a otros, o pueden crecer a la sombra de otros organismos u objetos. A nivel morfológico, los organismos pueden reducir la irradiancia que llega a una fracción de las células, incrementando el espesor de los tejidos, de manera que unas células hagan sombra sobre otras. Otro mecanismo morfológico de fotoprotección es reducir el área superficial en relación al espesor. A nivel celular, los organismos pueden cambiar la distribución de los cloroplastos dentro de las células, de manera que se hagan sombra unos a otros o se protejan con otras estructuras. A nivel cloroplasto, los organismos pueden cambiar la concentración de pigmentos antena, que son los encargados de captar la luz solar y canalizar su energía a los centros de reacción. Finalmente, algunos organismos han desarrollado estrategias a nivel molécula para protegerse de las altas irradiancias. La presencia de β -caroteno y otros carotenoides en el aparato fotosintético ayuda a de-excitar al oxígeno singulete una vez formado (Demmig-Adams y Adams, 1992). Sin embargo, existen carotenoides capaces de recibir energía directamente de la clorofila *a* singulete, y evitar la formación de radicales altamente oxidantes (Moisan *et al.*, 1998; Demmig-Adams y Adams, 1992; García-Mendoza, 2000). La zeaxantina, la antheraxantina y la diatoxantina son xantofilas capaces de recibir energía directamente de la clorofila *a* que se encuentran en el aparato fotosintético de algunos organismos. Sin embargo, la antheraxantina y la zeaxantina son constantemente transformadas a violaxantina, mientras que la diatoxantina se transforma en diadinoxantina. La violaxantina y la diadinoxantina, a diferencia de la

antheraxantina, zeaxantina y diatoxantina, son pigmentos accesorios, que absorben luz solar y canalizan su energía a la clorofila *a*. Sólo cuando el pH en el lumen disminuye a menos de seis, indicando un transporte de electrones elevado y, por lo tanto, un estrés por luz, se activan las enzimas que transforman la violaxantina en antheraxantina y zeaxantina ó la diadinoxantina en diatoxantina. Este mecanismo, conocido como ciclo de las xantofilas, permite que las mismas estructuras aporten energía para la fotosíntesis cuando la luz es escasa, y disipen energía del aparato fotosintético cuando la luz es excesiva (Demmig-Adams y Adams, 1992).

La fluorescencia como medida de la fotoinhibición

La fluorescencia de la clorofila *a in vivo* puede ser utilizada para estudiar la fotoinhibición de la fotosíntesis (Hanelt y Nultsch, 1994; Cabello-Pasini *et al.*, 2000; Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2001). La energía que absorben los pigmentos antena del PSII tiene una probabilidad de ser emitida como fluorescencia mientras se encuentra en la clorofila *a* (Krause y Weis, 1991). Cuando un centro de reacción no está disponible para recibir la energía, el tiempo que la energía permanece en la antena es mayor y la probabilidad de que sea emitida como fluorescencia aumenta (Krause y Weis, 1991).

La fluorescencia en una solución de clorofila *a* es proporcional a la irradiancia. En una célula fotosintética, en cambio, la fluorescencia de la clorofila *a* varía dentro de un intervalo de acuerdo al estado fisiológico. En condiciones de baja irradiancia, la fluorescencia se ve disminuida porque la fotosíntesis compite por la

excitación de la clorofila. Si se aplica un pulso de luz intensa, la fluorescencia se incrementa hasta saturarse en un valor máximo. Cuando un centro de reacción se encuentra procesando la energía de un fotón, no puede recibir la excitación de otros fotones que sean captados por la antena, y la energía es disipada en forma de calor o fluorescencia. La fluorescencia es máxima cuando todos los centros de reacción se encuentran ocupados, y no hay competencia de la fotosíntesis por la excitación. El intervalo entre la fluorescencia en presencia y en ausencia del pulso de saturación depende del rendimiento cuántico del PSII, que es su capacidad de utilizar la excitación de los fotones absorbidos para transporte de electrones. El rendimiento cuántico efectivo se calcula como la diferencia entre la fluorescencia máxima (en presencia del pulso de saturación de luz) y la fluorescencia basal (en ausencia del pulso de saturación) entre la fluorescencia máxima, y es una medida de la eficiencia fotosintética (Genty *et al.*, 1989). La medición de fluorescencia mediante la técnica de fluorescencia de pulsos de amplitud modulada (PAM), permite distinguir la fluorescencia inducida por una luz de medición muy tenue inclusive en un contexto de alta irradiancia (Schreiber, 1986). Consecuentemente, la técnica PAM permite la estimación del rendimiento cuántico efectivo en presencia de luz actínica, que induce procesos fotoquímicos en el material biológico en estudio.

El rendimiento cuántico efectivo se puede multiplicar por la irradiancia que llega al PSII para calcular la tasa de transporte de electrones (ETR) a través de este complejo. El cálculo de ETR implica la suposición de que el rendimiento cuántico es

la cantidad de electrones transportados por cantidad de fotones absorbidos. Una reducción de los valores de ETR ante un incremento de irradiancia se puede considerar como fotoinhibición de la fotosíntesis, ya que el transporte de electrones es fundamental en la fijación fotosintética de energía.

La tasa de transporte de electrones en el PSII puede utilizarse como una medida de la fotosíntesis, ya que de ella depende la formación de poder reductor y, en cierta medida, la producción de ATP. Sin embargo, los valores de ETR no siempre tienen una relación lineal directa con la fotosíntesis evaluada con los métodos tradicionales, como son la medición de la evolución de oxígeno o la incorporación de ^{14}C al tejido. Una posible explicación a la discrepancia entre la fotosíntesis medida por fluorescencia y por métodos de intercambio gaseoso es la fotorrespiración, reacción que produce un intercambio gaseo inverso al de la fotosíntesis. La fotorrespiración depende de la concentración de CO_2 relativa a la concentración de oxígeno en el ambiente circundante a RUBISCO. Las plantas C_4 tienen células especializadas en proporcionar CO_2 a las células fotosintéticas. En plantas C_4 , donde la fotorrespiración es muy reducida, se ha encontrado una relación lineal entre parámetros de fluorescencia y de intercambio gaseoso (Genty *et al.*, 1989; Edwards y Baker, 1993). No está claro si los pastos marinos son organismos C_3 o C_4 (Andrews y Abel, 1979; Touchette y Burkholder, 2000). Aparentemente no son estrictamente C_4 , pero algunas especies, incluyendo *Z. marina*, tienen mecanismos de concentración de carbono (Touchette y Burkholder, 2000), que evitan la fotorrespiración. Se ha encontrado una relación lineal entre la

fotosíntesis medida con oxígeno y con fluorescencia en los pastos marinos

Halophyla stipulacea, *H. ovalis* y *Cymodocea nodosa*, pero no en *Halodule wrightii* y *Zostera marina* (Beer *et al.* 1998; Beer y Björk, 2000). Sin embargo, estos autores no exploraron el efecto de diferentes tiempos de incubación en la relación entre la fotosíntesis medida con fluorescencia o con oxígeno.

La fotoinhibición de la fotosíntesis en *Zostera marina*

Existen diferentes trabajos que demuestran fotoinhibición de la fotosíntesis en pastos marinos. *Thalassia hemprichii* del Mar Chino, por ejemplo, presenta una fotoinhibición dinámica al mediodía, que se manifiesta en una reducción del rendimiento cuántico óptimo (Hanelt, 1992). La fotoinhibición de la fotosíntesis en *T. hemprichii* es especialmente notoria cuando la marea baja coincide con el mediodía (Hanelt y Nultsch, 1994). Dawson y Dennison (1996) observaron fotoinhibición de la fotosíntesis por radiación fotosintéticamente activa en los pastos marinos *Cymodocea serrulata* y *Syringodium isoetifolium*. Sin embargo, *Halophila ovalis*, *Halodule uninervis* y *Zostera capricorni* no presentaron fotoinhibición de la fotosíntesis. Jiménez *et al.* (1987) observaron fotoinhibición de la fotosíntesis en *Z. marina* en curvas fotosíntesis-irradiancia, pero no analizaron la fotoinhibición con luz solar natural, donde los incrementos de irradiancia son mucho más graduales. La aclimatación a corto plazo juega un papel importante en la tasa de transporte de electrones de algunos pastos marinos (Ralph *et al.*, 1998), y probablemente también en la fotoinhibición. Backman y Barilotti (1976) encontraron mayor abundancia de *Z. marina* en las regiones más someras de una pradera. Las diferencias de densidad

de *Z. marina* con la profundidad se atribuyen a la mayor competencia por luz en las partes profundas (Backman y Barilotti, 1976), pero posiblemente también se deben a una fotoprotección por autosombreado en las partes someras.

Zostera marina presenta variaciones en su morfología de acuerdo con la profundidad. En las zonas submareales, que reciben poca luz, las hojas largas y anchas proporcionan probablemente una máxima superficie de absorción de luz. En las zonas someras, en cambio, las hojas de *Z. marina* son cortas y delgadas. Las hojas cortas y delgadas son probablemente una aclimatación a las altas irradiancias, ya que tienen una menor área expuesta a la luz. Estas variaciones se han observado en plantas de la misma población, y se deben aparentemente a una plasticidad morfológica y fisiológica, y no a una adaptación genética (Muñiz-Salazar *et al.*, en revisión). Es probable que la irradiancia incidente (E) controle los cambios de morfología de *Z. marina* respecto a la profundidad. También es posible que existan cambios en la fisiología fotosintética de *Z. marina* de acuerdo al régimen de irradiancia.

HIPÓTESIS

- 1.- Hay una relación lineal y positiva entre la fotosíntesis determinada por evolución de oxígeno y los valores de ETR determinados por fluorescencia
- 2.- El pasto marino *Zostera marina* presenta fotoinhibición de la fotosíntesis cuando se incrementa la irradiancia máxima diaria que recibe.
- 3.- Existe una aclimatación de *Zostera marina* a las altas irradiancias, que se refleja en una disminución de la fotoinhibición de la fotosíntesis
- 4.- *Zostera marina* presenta modificaciones en su morfología (longitud, ancho y número de hojas por haz) ante diferentes regímenes de irradiancia.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el papel de la irradiancia en la aclimatación a la fotoinhibición de la fotosíntesis en *Zostera marina*.

Objetivos Particulares

- 1.- Determinar si los valores de ETR, determinados con fluorescencia de pulsos de amplitud modulada, pueden ser utilizados para estimar la fotosíntesis en términos de evolución de oxígeno en *Zostera marina*.
- 2.- Determinar si se presenta fotoinhibición de la fotosíntesis en *Zostera marina* ante incrementos de irradiancia
- 3.- Determinar si se presenta una aclimatación a altas irradiancias en *Zostera marina*, reflejada en una disminución de la fotoinhibición de la fotosíntesis
- 4.- Determinar si existen variaciones en la morfología de *Zostera marina* como respuesta a la fotoinhibición de la fotosíntesis.

MÉTODOS

Pastos Marinos

El pasto marino *Zostera marina* de la zona intermareal y submareal fue colectado manualmente durante mareas bajas en el Estero de Punta Banda y San Quintín. Los rizomas y raíces de los pastos fueron limpiados del sedimento que los contenía utilizando agua de mar. Los pastos fueron trasladados en hieleras de plástico con agua de mar al Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California. Haces con al menos 4 cm de rizoma fueron sembrados en recipientes de 2.5 L con sedimento de la zona de colecta. Los pastos marinos fueron mantenidos en tanques exteriores de 1200 L con un flujo continuo de agua y aireación ligera para asegurar la mezcla del agua.

Incubaciones a diferentes irradiancias

Se realizaron incubaciones en tanques exteriores bajo 20, 50 y 100% de E, utilizando malla para reducir la luz solar incidente. Diez macetas con 300 a 650 haces m^{-2} fueron colocadas a cada nivel experimental de irradiancia.

Fluorescencia

La fluorescencia de la clorofila *a* asociada al PSII se evaluó utilizando fluorómetros de pulsos de amplitud modulada (PAM-2000 y Diving-PAM; Walz, Effeltrich, Alemania). El rendimiento cuántico se determinó como $\Delta F/F_m'$, donde ΔF es la diferencia entre la fluorescencia máxima en el tejido expuesto a la luz (F_m') y la fluorescencia basal (F_t) en las condiciones en que se encuentra el tejido (Genty et

al. 1989). Los valores de F_m' y F_t se obtuvieron utilizando una luz modulada muy tenue (650 nm, $0.3 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), que no activa la fotosíntesis de forma significativa, pero sí produce fluorescencia. Las mediciones de F_m' se realizan durante la aplicación de un pulso de saturación de luz (0.4 s, aprox. $9000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), que reduce todos los centros de reacción y suprime la actividad del PSII.

Los valores de ETR se determinaron mediante el producto de $\Delta F/F_m'$, E , la absorptancia del tejido y 0.5, considerando que la luz absorbida se distribuye igualmente en ambos fotosistemas. La absorptancia se consideró constante en el lapso de tiempo de un mismo experimento y en un mismo organismo, y se determinó al término de cada experimento utilizando una lámpara de halógeno y un sensor de irradiancia. La absorptancia se determinó como la fracción de luz atenuada al interponer el tejido entre el sensor y la fuente lumínica. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en la segunda hoja de cada planta, aproximadamente 10 cm arriba de la región basal de la hoja.

Se realizaron curvas de ETR en función de la irradiancia, utilizando incrementos sucesivos de irradiancia aplicados por una lámpara de halógeno integrada en el equipo PAM. Los resultados se ajustaron al modelo exponencial descrito por Webb *et al.* (1974) utilizando un algoritmo no lineal de ajuste directo (Sigma Plot, Jandel Scientific). El modelo relaciona la fotosíntesis y la irradiancia de la siguiente manera:

$$ETR(E) = ETR_{\max}(1 - e^{-\alpha_{ETR} \cdot E/ETR_{\max}})$$

donde E es la irradiancia, $ETR_{\max}$ es la fotosíntesis máxima, α_{ETR} es la eficiencia fotosintética y R es la respiración. Los parámetros $ETR_{\max}$ y α_{ETR} se utilizaron para comparar la fisiología fotosintética de los pastos marinos bajo diferentes condiciones experimentales. Adicionalmente, se calculó el coeficiente de saturación E_K , que es la razón $ETR_{\max}/\alpha_{ETR}$. El coeficiente de saturación es una medida de la cantidad de luz necesaria para saturar la fotosíntesis, y se puede considerar como la irradiancia óptima para el flujo adecuado de energía en el aparato fotosintético (Falkowsky y Raven, 1987).

La disipación no fotoquímica de energía (NPQ), que es un mecanismo que transforma la energía de la luz absorbida en calor, se calculó como

$$NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$$

donde F_m es la fluorescencia máxima antes del amanecer.

Fotosíntesis por evolución de oxígeno

La producción de oxígeno en función de la irradiancia, como una medida de la fotosíntesis, se evaluó polarográficamente en segmentos de tejido de *Z. marina* de 0.8 a 1.2 cm² bajo diferentes condiciones experimentales. Las mediciones se realizaron en cámaras de borosilicato refrigeradas de 5 mL. Los cambios en la concentración de oxígeno en las cámaras se evaluaron con agitación continua con electrodos tipo Clark (Rank Brothers, Inglaterra). La luz con la que se activó la fotosíntesis se obtuvo de lámparas de 500 W con bulbos incandescentes. Los

niveles de irradiancia de 0 a 700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvieron regulando el voltaje suministrado a las lámparas, y se evaluaron mediante un sensor tipo coseno conectado al fluorómetro PAM (diving-PAM). Para determinar la irradiancia en las cámaras de incubación se utilizó un factor de calibración previamente determinado con un sensor tipo 4π LICOR. Los resultados se normalizaron respecto al área de tejido utilizado.

Irradiancia incidente

La irradiancia incidente (E) en los tanques de incubación se monitoreó cada 15 minutos con un sensor 2π LI-190SA, y los datos se almacenaron en una tarjeta de adquisición de datos (LICOR 1000).

Diseño experimental

Correlación entre la fluorescencia y evolución de oxígeno

Se realizaron mediciones simultáneas de evolución de oxígeno y rendimiento cuántico efectivo, seguidas de determinaciones de la absortancia, con el fin de determinar la correlación entre los valores de ETR y la evolución de oxígeno. Se utilizaron cuatro muestras colectadas durante el día, provenientes del tratamiento de 100% E.

*Fotoinhibición de la fotosíntesis en *Z. marina**

Se realizaron 10 a 15 mediciones del rendimiento cuántico efectivo durante cada hora a lo largo de un día, en plantas incubadas bajo 20, 55 y 100% E. Se calcularon los valores de ETR utilizando los datos de E medidos *in situ* durante el experimento.

Ciclos diurnos de fotoinhibición

Se transfirieron aproximadamente 30 haces del tratamiento de 20% E al de 100% E, y se determinaron las variaciones de ETR a lo largo de un día. Asimismo, se midieron las variaciones de ETR a lo largo de un día en pastos colectados en la zona submareal y en la zona intermareal, expuestos al 20, 55 y 100% de E. Una disminución de los valores de ETR ante un incremento en la irradiancia se consideró fotoinhibición de la fotosíntesis.

*Aclimatación de *Z. marina* a las altas irradiancias*

Se determinaron las variaciones diarias de ETR 1, 8 y 14 d después de haber incubado a 100% E pastos preaclimatados a 20% E. Una disminución de la fotoinhibición de la fotosíntesis se consideró como evidencia de aclimatación.

Se determinaron las variaciones de ETR a lo largo de un día en pastos colectados en la zona intermareal y en la zona submareal, después de 1, 5 y 11 d de incubación a 20, 55 y 100% E. Una disminución de la fotoinhibición de la fotosíntesis se consideró como evidencia de aclimatación.

Efecto de la irradiancia sobre la morfología de Z. marina

Se colectaron de forma aleatoria 15 haces en una pradera intermareal de *Z. marina* y se midió la longitud de los haces. Se incubaron los pastos bajo 20, 55 y 100% E y se determinó la longitud y ancho de las hojas y el número de hojas por haz a los 52 d.

Estadística

La significancia estadística de las diferencias en los valores de reducción de ETR y recuperación se determinaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), después de corroborar que los requisitos de homocedasticidad y normalidad se cumplieron (Sokal y Rohlf, 1984). Las pruebas *a posteriori* se realizaron utilizando la prueba Newman-Keuls. La correlación entre las mediciones simultáneas de evolución de oxígeno y ETR en función de la irradiancia se evaluó mediante un análisis de correlación de Pearson. La significancia estadística de las diferencias entre la longitud, el ancho y el número de hojas por haz se evaluó mediante un Análisis de Varianza (ANOVA), después de comprobar homocedasticidad y normalidad de los datos (Sokal y Rohlf, 1984). La significancia estadística de las diferencias entre las absorptancias de los pastos de la zona submareal e intermareal, con 20, 55 y 100% de irradiancia los días 1, 4, 6 y 8 d se realizó utilizando una ANOVA anidada.

RESULTADOS

Relación entre la fluorescencia y la evolución de oxígeno

Los valores de ETR determinados por fluorescencia en *Zostera marina* presentaron una regresión lineal positiva ($p < 0.01$) con la evolución de oxígeno, determinada polarográficamente (Fig. 1). El coeficiente de correlación entre la evolución de oxígeno y los valores de ETR fue de 0.87. Los valores de ETR fueron 3.8 veces mayores a la evolución de oxígeno.

Fotoinhibición de la fotosíntesis

Pastos colectados en la zona submareal presentaron una reducción de ETR en las horas de mayor irradiancia cuando fueron incubados a 100% E (Fig. 2). Los valores de ETR de pastos colectados en la zona intermareal se incrementaron hasta alcanzar un máximo de aproximadamente $220 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la hora de mayor irradiancia. Los valores de ETR de los pastos colectados en la zona submareal, en cambio, se incrementaron hasta alcanzar un máximo de aproximadamente $180 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a una irradiancia de aproximadamente $1100 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y se redujeron a aproximadamente $150 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ cuando la irradiancia alcanzó $1150 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Efecto de la irradiancia sobre la fotosíntesis

Los valores de ETR de pastos colectados en la zona intermareal e incubados por 38 días a 20, 55 y 100% E se incrementaron a lo largo del día, alcanzando su valor máximo a la hora de mayor irradiancia (Fig. 3A). Los valores máximos de ETR

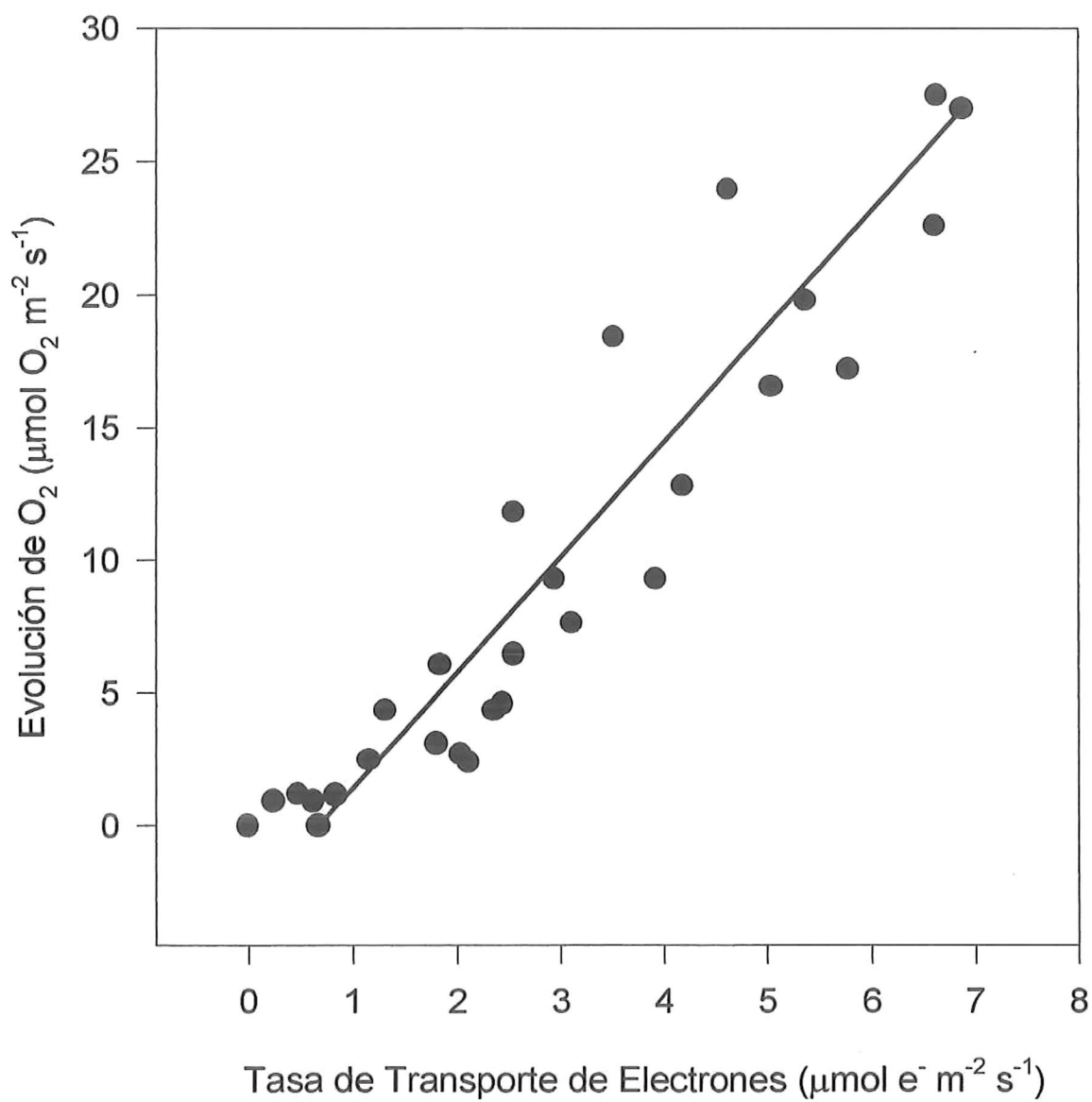


Figura 1. Correlación entre la Tasa de Transporte de Electrones (ETR) y la fotosíntesis medida por evolución de oxígeno en *Zostera marina* ($n=4$). La línea continua es la regresión lineal de todos los datos ($P(\text{O}_2) = 0.23 \text{ ETR} + 0.67$; $R^2 = 0.87$).

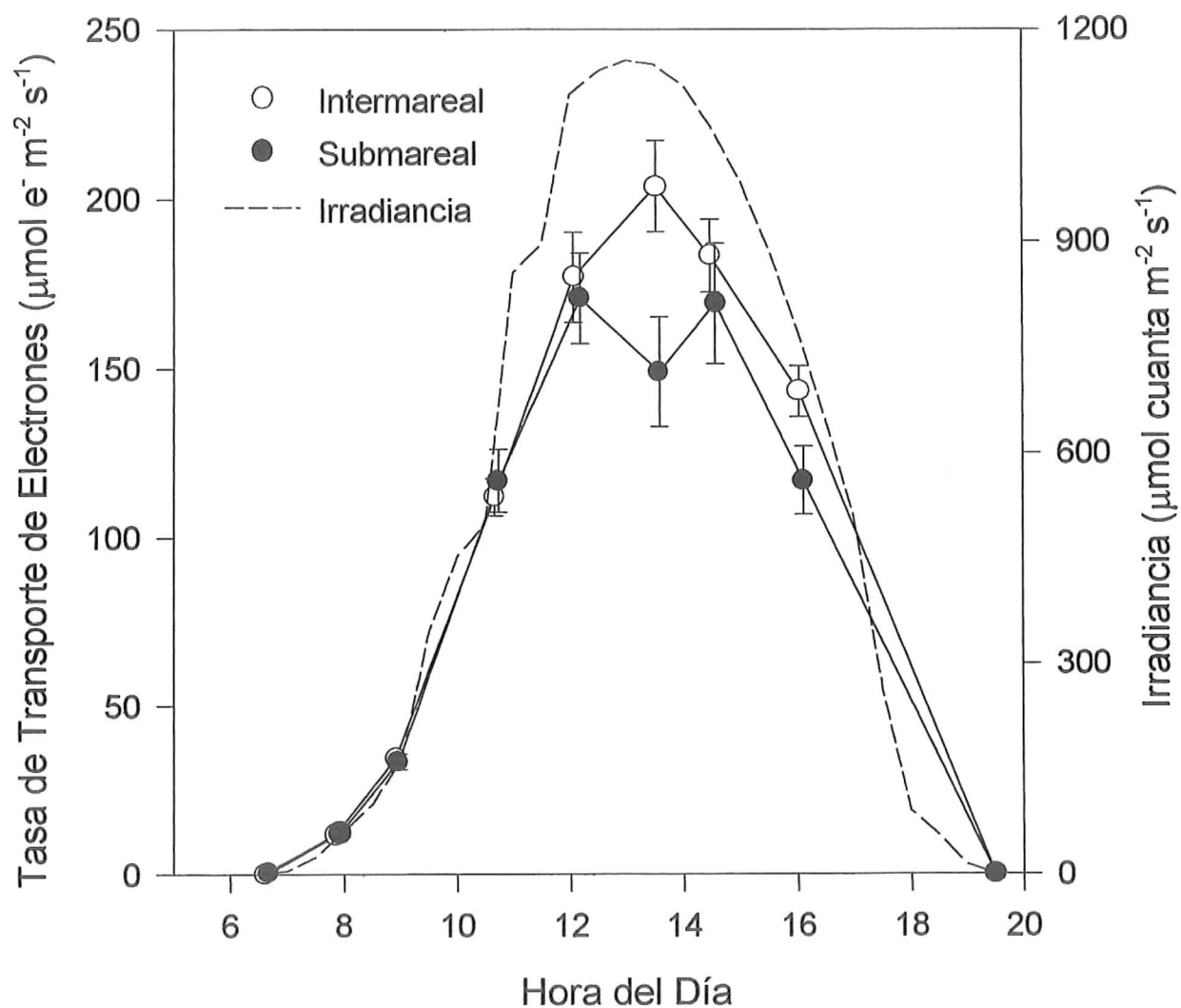


Figura 2. Cambios diurnos de Tasa de Transporte de Electrones en *Zostera marina* a lo largo de un día, colectada en la zona intermareal y en la zona submareal bajo el 100% de la irradiancia incidente. Los puntos representan promedios y las barras errores estándar.

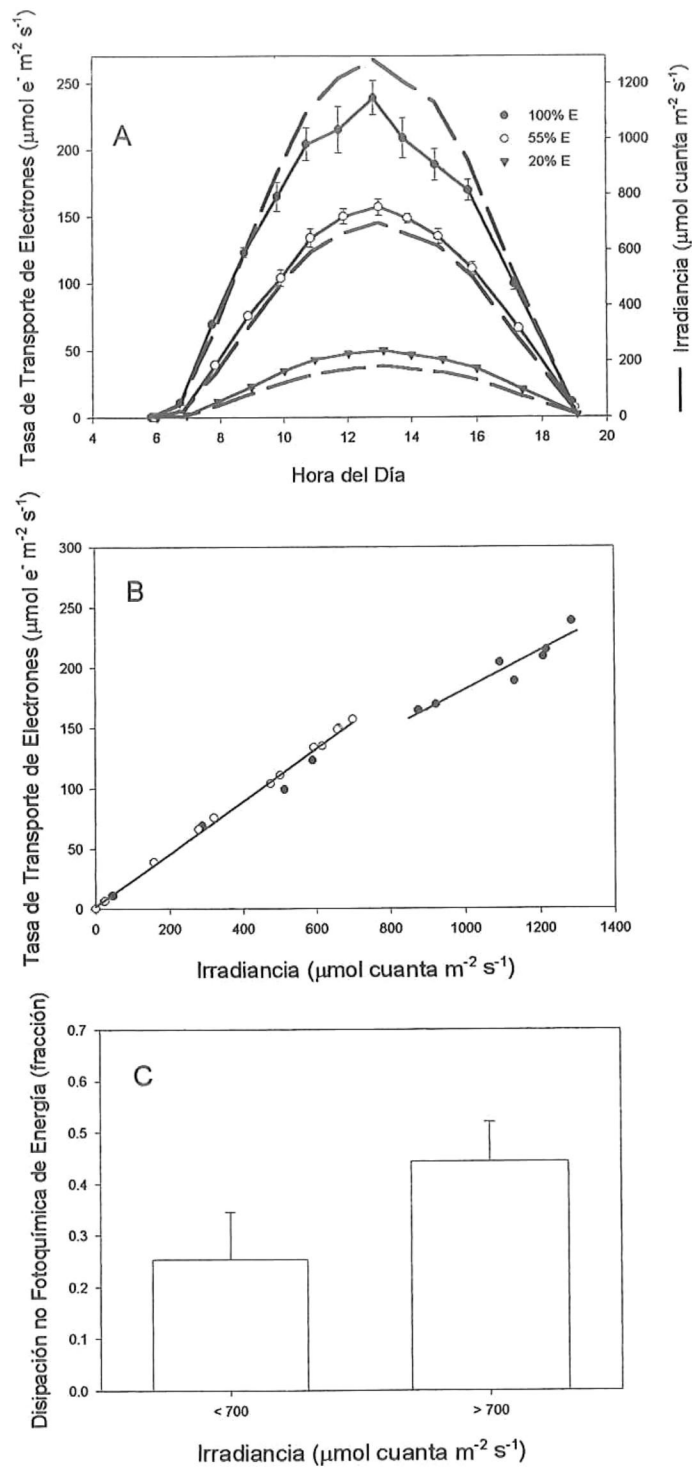


Figura 3. Efecto de la irradiancia sobre la fotosíntesis de *Zostera marina* aclimatada por 38 días a 20, 55 y 100% de la irradiancia incidente A. Tasa de Transporte de Electrones a lo largo de un día. Los puntos representan medias y las barras errores estándar B. Tasa de Transporte de Electrones de electrones en función de la irradiancia C. Disipación de Energía No Fotoquímica (NPQ). Las columnas representan medias y las barras errores estándar.

alcanzados fueron de aproximadamente $250 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el tratamiento de 100% E, $150 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el tratamiento de 55% E y $50 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en el de 20% E. Los valores de ETR mantuvieron una tendencia lineal respecto a la irradiancia, con una pendiente similar (aproximadamente $0.2 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en los tres tratamientos, excepto en el tratamiento de 100% E, donde la pendiente disminuyó significativamente ($p < 0.01$) a aproximadamente $0.16 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig.3B). La disminución de la pendiente de ETR respecto a la irradiancia coincide con un incremento significativo ($p < 0.01$) del NPQ de aproximadamente 0.25 a 0.6 (Fig. 3C). Los valores de ETR presentan una relación lineal positiva ($R^2 = 0.42$; $p < 0.05$) con NPQ, indicando una aparente regulación de ETR por NPQ (Fig. 4).

Los parámetros de las curvas fotosíntesis-irradiancia fueron diferentes en pastos aclimatados a 20% E y 100% E (Tabla 1). Tanto los valores de ETR_{MAX} como los de E_K fueron mayores en los pastos aclimatados a 100% E, que los de 20% E. Los valores de α_{ETR} no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

La absorción de los pastos de la zona submareal se redujo significativamente de 0.65 a 0.58 en 8 d en el tratamiento de 100% ETR, pero permaneció invariable en los tratamientos de 20% y 55% E (Fig. 5). La absorción de los pastos de la zona intermareal no varió con el tiempo en los tres tratamientos. La absorción de los pastos de las zonas submareal (0.65) fue mayor ($p < 0.01$)

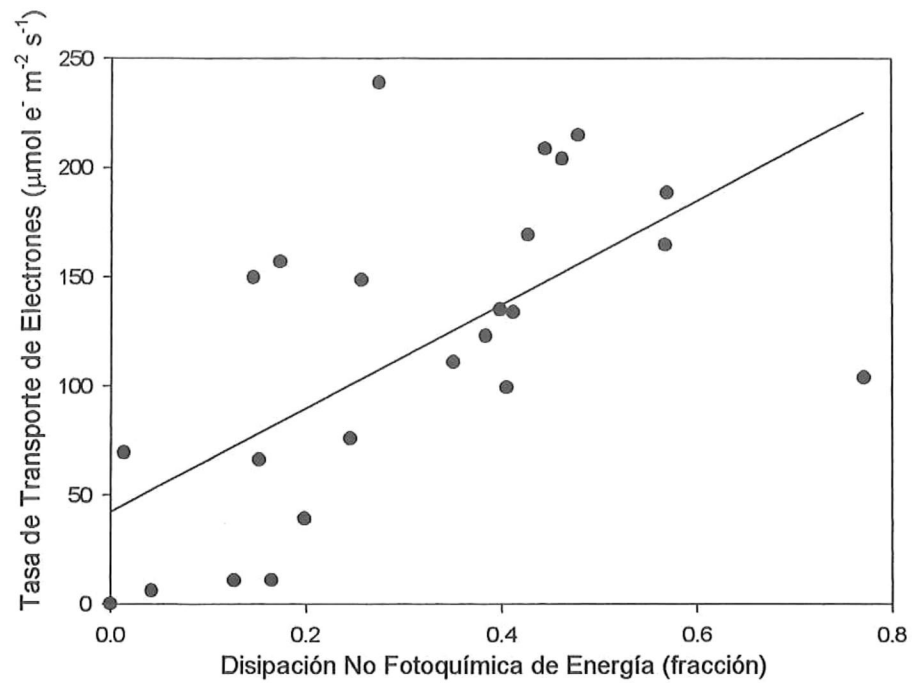


Figura 4. Tasa de Transporte de Electrones de *Zostera marina* en función de la Disipación No Fotoquímica (NPQ) de energía.

Tabla 1- Parámetros de curvas Fotosíntesis – Irradiancia realizadas en pastos colectados en la zona intermareal y aclimatados por 41 d a 20 y 100% de la irradiancia incidente. Curvas realizadas entre las 15:00 y 16:00. * - diferencia significativa al 90 % de confianza. ** - diferencia significativa al 95 % de confianza. n.s. – diferencia no significativa.

	Unidades	100% E ₀	20% E ₀	Significancia
ETR _{MAX}	$\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	52.6 ± 11.8	34.9 ± 8.3	*
α_{ETR}	$\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.04	n.s.
	$(\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1})^{-1}$			
E _K	$\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	207.9 ± 45.7	142.9 ± 51.3	**

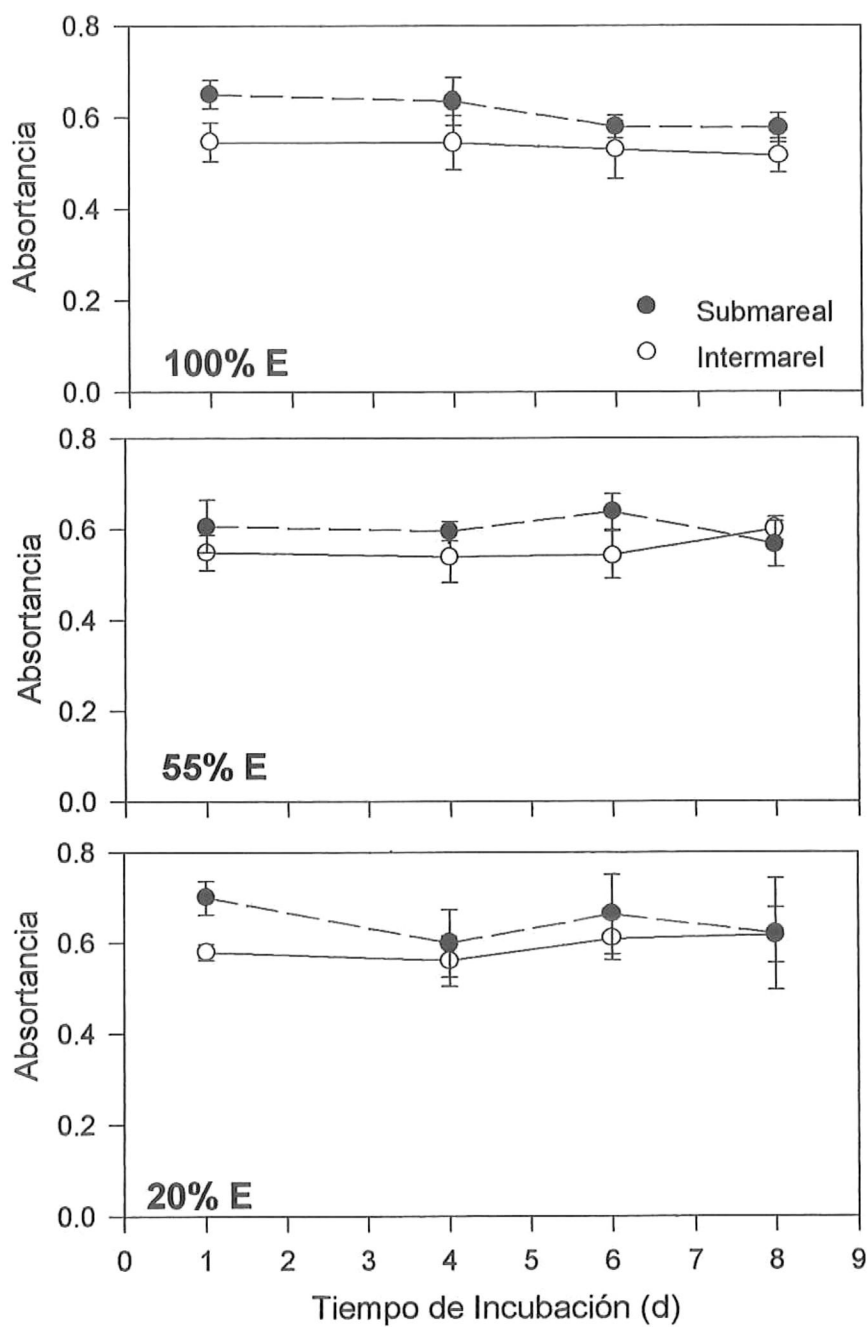


Figura 5. Absortancia de *Zostera marina* colectada en la zona intermareal y submareal en función del tiempo de incubación a 20, 55 y 100% de la irradiancia incidente. Los puntos representan promedios y las barras errores estándar.

que la de la zona intermareal (0.55) el primer día de incubación, que refleja probablemente las condiciones en el campo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre todos los tratamientos en los pastos submareales e intermareales a lo largo de los 8 d, probablemente por bajo poder estadístico ($n = 5$, 24 combinaciones).

Efecto de la preaclimatación sobre los ciclos diurnos de fotosíntesis

Pastos de la zona intermareal preaclimatados por 38 d a 20% E presentaron fotoinhibición de la fotosíntesis cuando fueron incubados a 100% E (Fig. 6A). Los valores de ETR de los pastos preaclimatados a baja irradiancia alcanzaron un máximo de $110 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aproximadamente a los $800 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y disminuyeron hasta $80 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mientras la irradiancia se incrementó hasta $1200 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los valores de ETR de los pastos preaclimatados a 100% E en el tratamiento de 100% E se incrementaron hasta alcanzar un valor máximo de aproximadamente $140 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a la hora de máxima irradiancia. Los pastos preaclimatados a 20 y 100% E e incubados en el tratamiento de 20% E presentaron valores idénticos de ETR a lo largo del día, independientemente del tratamiento de origen, alcanzando un máximo de $30 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a la hora del día de mayor irradiancia (Fig. 6B).

Los valores de ETR de los pastos aclimatados a 20% E incubados a 100% E, se incrementaron en función de la irradiancia durante la mañana (Fig. 7A). Sin embargo, cuando la irradiancia se estabilizó en aproximadamente $1100 \mu\text{mol cuanta}$

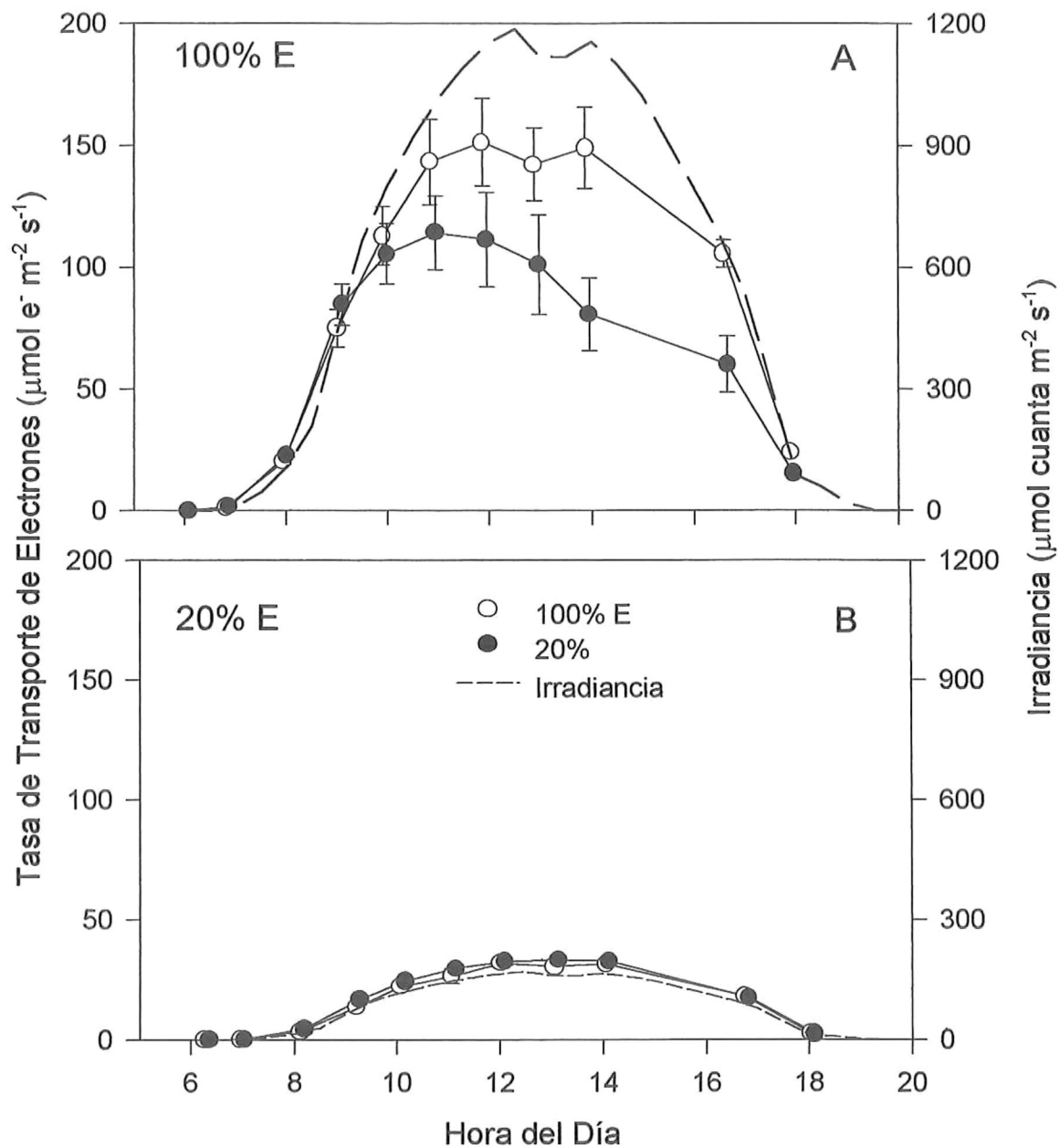


Figura 6. Cambios diurnos de Tasa de Transporte de Electrones en *Zostera marina* aclimatada previamente a 20 y 100% de la irradiancia incidente, A. bajo 100% y B. bajo 20% de la irradiancia incidente. Los puntos representan promedios y las barras errores estándar.

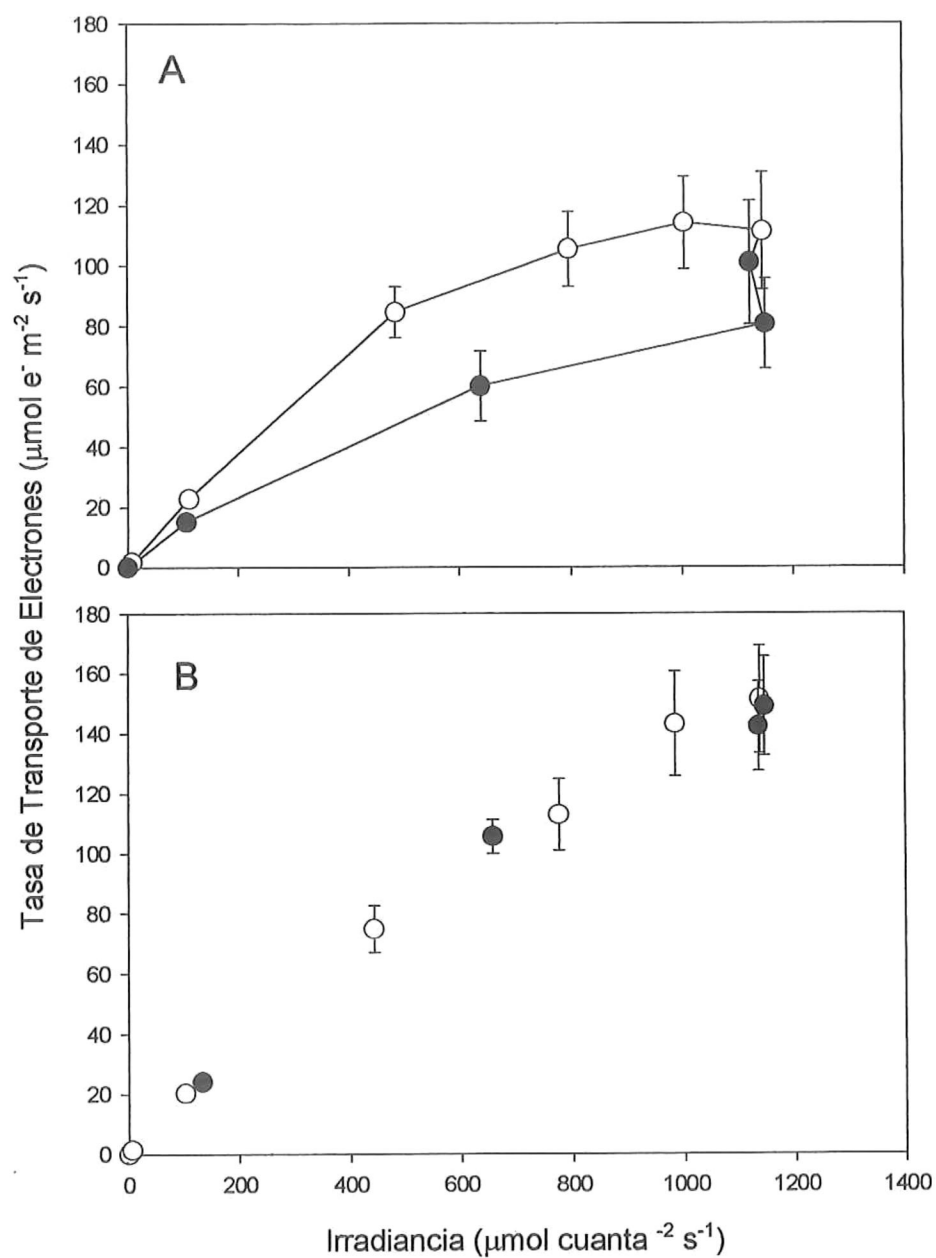


Figura 7. Tasa de Transporte de Electrones en función de la irradiancia de *Zostera marina* a 100% de la irradiancia incidente A. pastos aclimatados al 20% de irradiancia. B. pastos aclimatados al 100% de irradiancia. O datos de la mañana ● datos de la tarde. Los puntos representan promedios y las barras errores estándar.

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los valores de ETR disminuyeron. Cuando la irradiancia decreció, los valores de ETR presentaron una marcada histéresis, disminuyendo relativamente a los valores de irradiancias similares en la mañana. Los valores de ETR de los pastos aclimatados a 100% E presentaron una relación lineal positiva con la irradiancia, con pendiente de $0.13 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} / \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, tanto en la mañana como en la tarde (Fig. 7B).

Aclimatación de *Z. marina* a la Fotoinhibición

Los pastos preaclimatados a 20% E presentaron fotoinhibición de la fotosíntesis el primer día de incubación a 100% E, manifestada como una reducción de ETR respecto a los pastos preaclimatados a 100% E ante un incremento de la irradiancia (Fig. 8A). Los pastos preaclimatados a 20 y 100% E presentaron valores similares de ETR después de 8 d de incubación a 100% E, con máximos de ETR de aproximadamente $170 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a aproximadamente $1100 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 8B). Los valores de ETR de los pastos preaclimatados a 20 y 100% E fueron similares después de 12 d de incubación a 100% E, alcanzando aproximadamente $180 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $1100 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 8C).

Los valores de ETR de los pastos preaclimatados a 20% E disminuyeron ($p < 0.05$) respecto a los valores de ETR de los pastos preaclimatados a 100% E el primer día de incubación a 100% E (Fig. 9). Sin embargo, los valores de ETR de los pastos preincubados a 20% E fueron similares ($p > 0.05$) a los de los pastos preincubados a 100% E después de 8 y 14 d de incubación a 100% E.

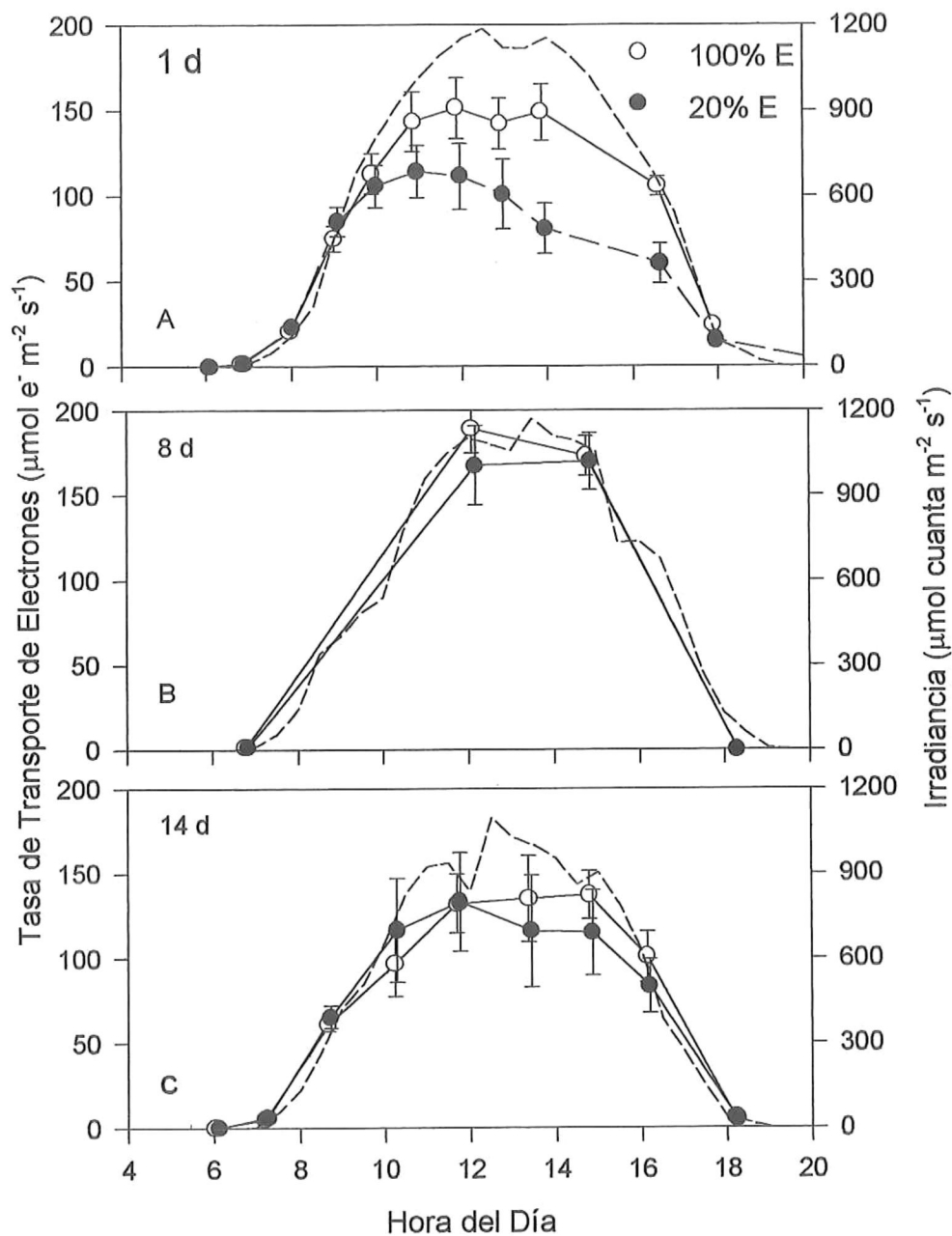


Figura 8. Cambios diurnos de Tasa de Transporte de Electrones en *Zostera marina*, preaclimatada al 20 y 100% de la irradiancia incidente e incubada a 100% de la irradiancia incidente A. por 1 d. B. por 8 d y C. por 14 d. Los puntos representan promedios y las barras errores estándar.

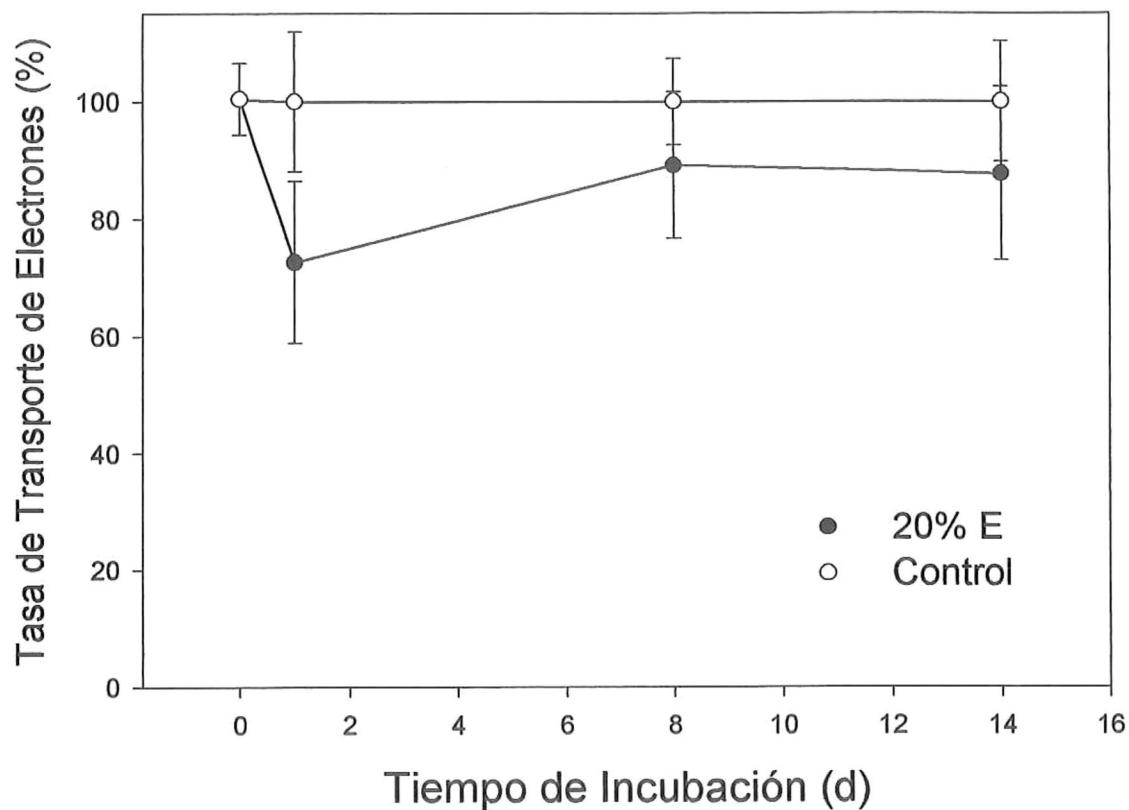


Figura 9. Tasa de Transporte de Electrones de *Zostera marina* aclimatada al 20% de la irradiancia incidente, relativa a la Tasa de Transporte de Electrones de *Z. marina* aclimatada al 100% de irradiancia incidente. Datos tomados a la hora de máxima irradiancia de cada día con el 100% de la irradiancia incidente. Los puntos representan medias y las barras errores estándar. El primer punto representa un control sin fotoinhibición.

Aclimatación de pastos submareales e intermareales

Los pastos colectados en la zona submareal presentaron valores de ETR menores que los pastos colectados en la zona intermareal, el primer día de incubación a 100% E (Fig. 10A). Los valores de ETR de pastos colectados en la zona intermareal se incrementaron hasta alcanzar un máximo de aproximadamente $220 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la hora de mayor irradiancia. Los valores de ETR de los pastos colectados en la zona submareal, en cambio, se incrementaron hasta alcanzar un máximo de aproximadamente $180 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ antes de la hora de máxima irradiancia, y se redujeron a aproximadamente $150 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en la hora de máxima irradiancia.

Los pastos de la zona submareal, después de 5 días en el tratamiento de 100% E, presentaron valores de ETR similares a los de los pastos de la zona intermareal, de aproximadamente $200 \mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 10B). Asimismo, los pastos de la zona submareal e intermareal presentaron valores similares de ETR después de 11 d de incubación a 100% E (Fig. 10C).

Los pastos de la zona submareal presentaron una aclimatación a las altas irradiancias a los 5 d de incubación a 100% E (Fig. 11). Los pastos de la zona submareal presentaron valores de ETR significativamente menores ($p < 0.05$) a los de la zona intermareal el primer día de incubación a 100% E. Sin embargo, los valores de ETR no fueron diferentes entre los pastos de la zona submareal e intermareal a los 5 y a los 11 d de incubación.

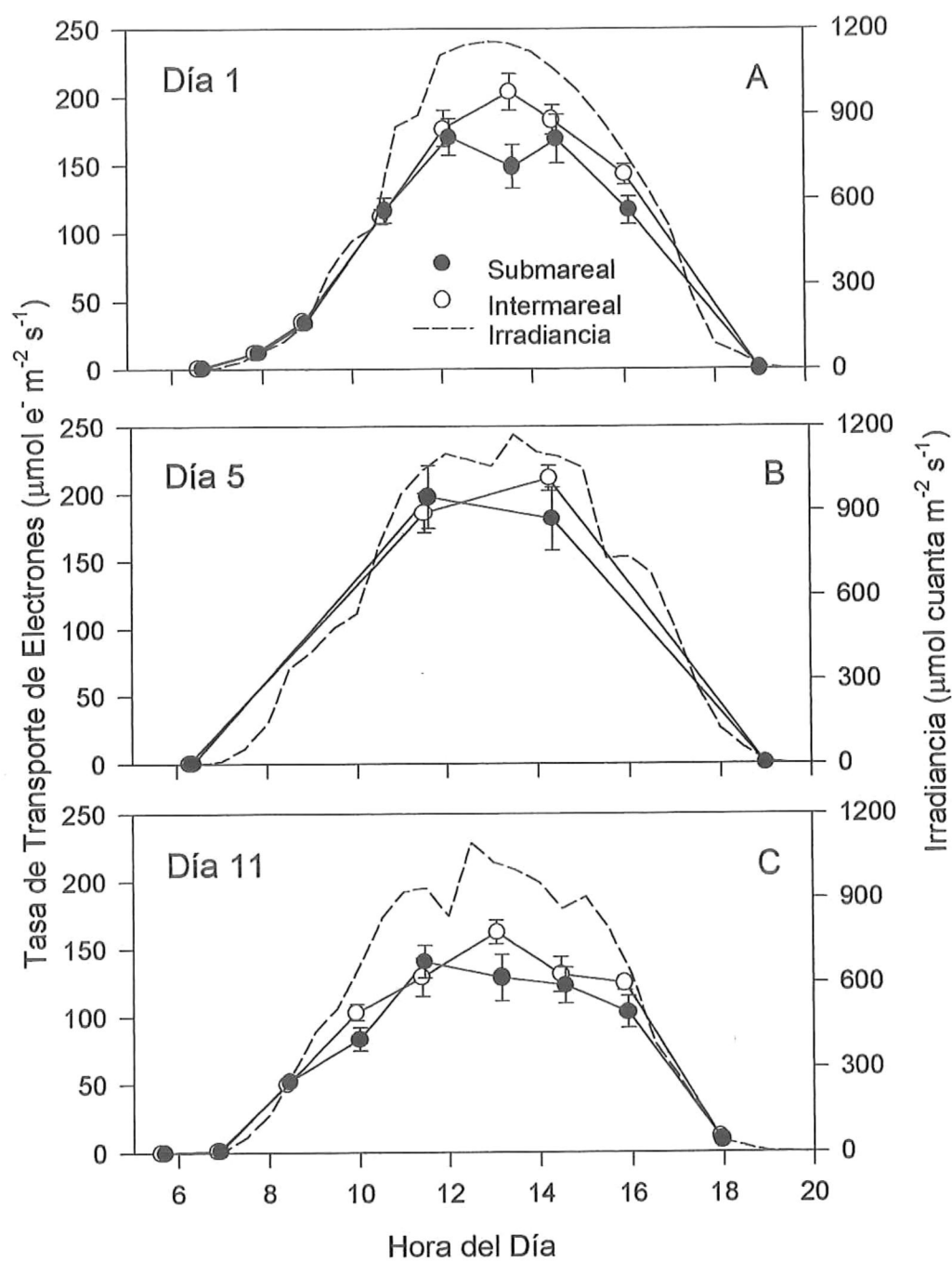


Figura 10. Cambios diurnos de Tasa de Transporte de Electrones en *Zostera marina* de la zona submareal e intermareal e incubada a 100% de la irradiancia incidente A. por 1d, B. por 5 d y C. por 11 d. Los puntos representan promedios y las barras errores estándar.

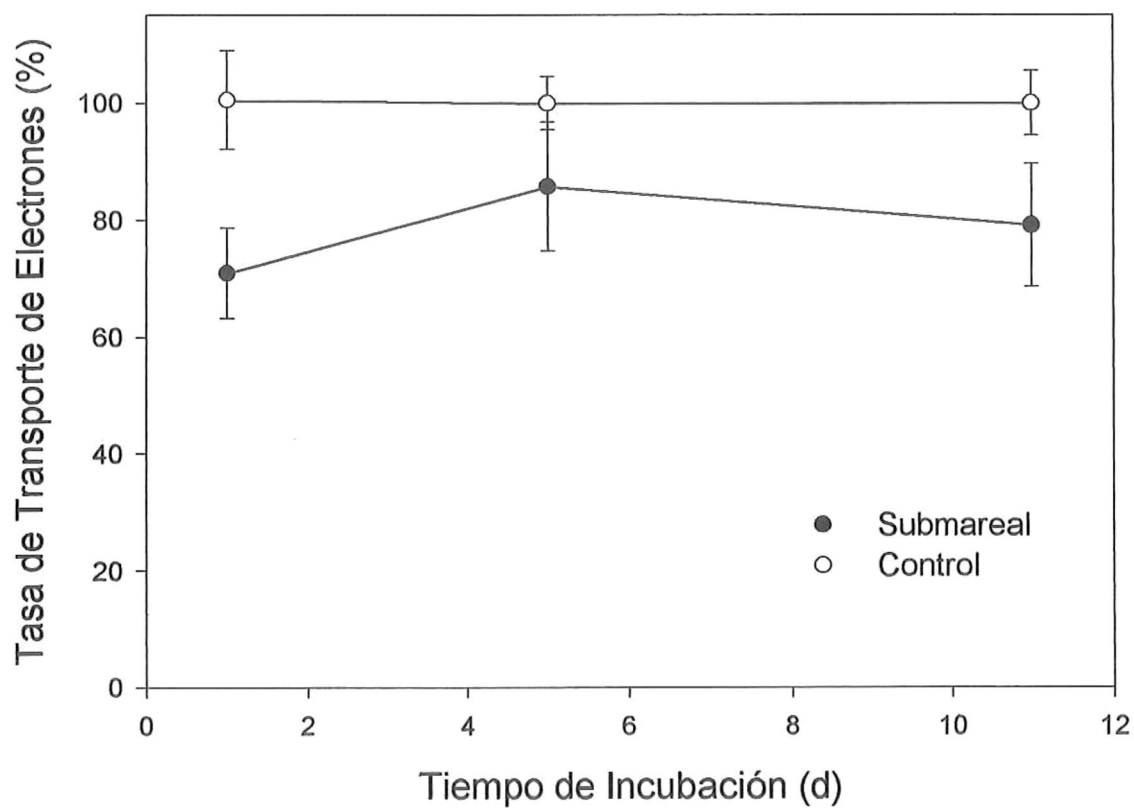


Figura 11. Tasa de Transporte de Electrones de *Zostera marina* de la zona submarginal, relativa a la Tasa de Transporte de Electrones de *Z. marina* de la zona intermarginal. Datos tomados a la hora de máxima irradiancia de cada día con el 100% de la irradiancia incidente. Los puntos representan medias y las barras errores estándar. El primer punto representa un control sin fotoinhibición.

Efecto de la irradiancia en la morfología de *Zostera marina*

Haces de *Z. marina* colectados en la zona intermareal presentaron cambios morfológicos después de ser incubados por 52 d a tres diferentes irradiancias. La longitud de los pastos al ser colectados del campo fue de 21 ± 1.9 cm (Fig. 12). Después de 52 d, la longitud de los pastos en el tratamiento de 20% E fue de 21.4 ± 3.3 cm, igual al valor inicial ($p > 0.05$). Las longitudes de los pastos en los tratamientos de 55 y 100% E disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) a 15.9 ± 2.6 cm y 12.9 ± 1.3 , respectivamente. El ancho de las hojas de *Z. marina* después de 52 d de incubación a 20, 55 y 100% E no fue significativamente diferente entre los tres niveles de irradiancia ($p > 0.05$; Fig. 13). Sin embargo, se observa una tendencia hacia una disminución del ancho de las hojas conforme aumenta la irradiancia de los tratamientos. El número de hojas por haz no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) después de 52 d de incubación a 20, 55 y 100% E.

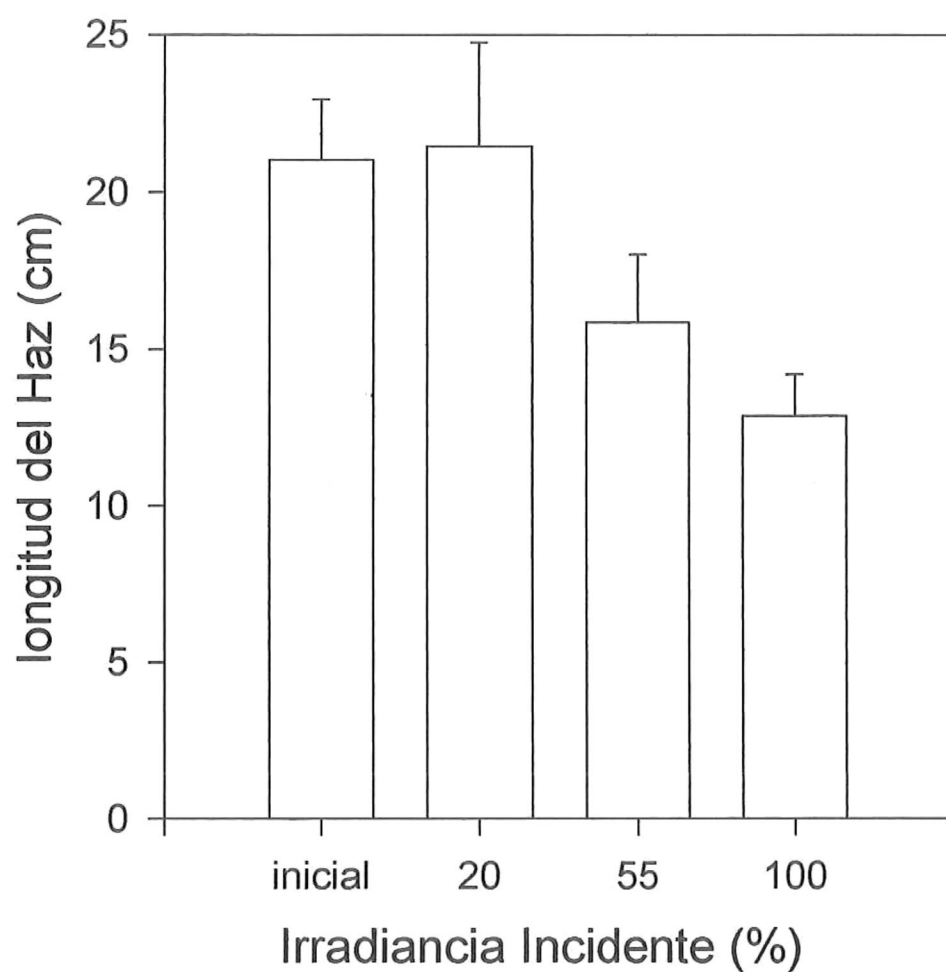


Figura 12. Longitud del haz de *Zostera marina* al ser colectada en el campo (inicial) y después de 52 días de incubación bajo 20 , 55 y 100% de la luz solar incidente.

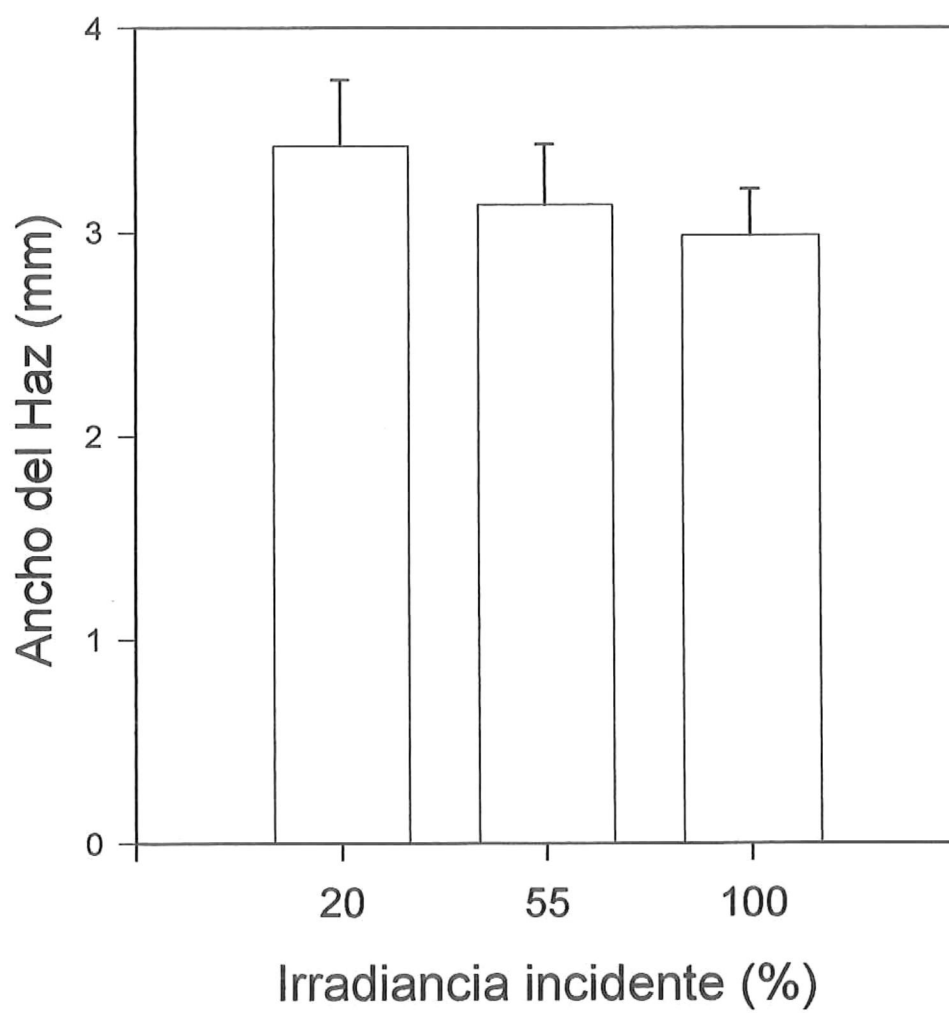


Figura13. Ancho del haz de *Zostera marina* después de haber sido incubada por 52 días bajo 20, 55 y 100% de la luz solar incidente.

DISCUSIONES

La evolución de oxígeno ha sido ampliamente utilizada como medida de la fotosíntesis de organismos acuáticos (Ramus *et al.*, 1976b; Jiménez *et al.*, 1987; Beach y Smith, 1996a). Sin embargo, su determinación requiere del aislamiento de los organismos del medio ambiente. En la última década se han desarrollado técnicas fluorimétricas que permiten la estimación de ETR mediante la medición de la fluorescencia *in situ*, de forma no destructiva y en unos segundos. La linealidad de la relación entre los valores de ETR y la evolución de oxígeno encontrada para *Z. marina* en este estudio demuestra que ETR es un parámetro adecuado para el estudio de fenómenos que afectan la fotosíntesis en esta especie. La linealidad encontrada entre los valores de ETR y la evolución de oxígeno en este trabajo es consistente con la presencia de mecanismos de concentración de carbono en *Z. marina* (Touchette y Burkholder, 2000). La concentración de carbono favorece la linealidad de la respuesta al disminuir la fotorrespiración en plantas C₄ (Genty *et al.*, 1989; Edwards y Baker, 1993). Algunos pastos marinos que también presentan mecanismos de concentración de carbono como *Cymodocea nodosa* y *Halophila ovalis*, (Touchette y Burkholder, 2000) también presentan una respuesta lineal de ETR respecto a la irradiancia (Beer *et al.* 1998; Beer y Björk, 2000). Por otro lado, *Halodule wrightii* presenta mecanismos de concentración de carbono (Touchette y Burkholder, 2000) pero presenta una relación curvilínea entre los valores de ETR y la evolución de oxígeno (Beer y Björk, 2000). Es posible que existan diferencias en la actividad de los mecanismos de concentración de carbono en diferentes poblaciones de algunos pastos, incluyendo *Z. marina*. Beer *et al.* (1998), a

diferencia de lo encontrado en este estudio, encontraron una relación cuadrática entre ETR y la evolución de oxígeno en *Z. marina*. Lo anterior sugiere que posiblemente existan diferencias en el metabolismo fotosintético entre poblaciones de la misma especie de distintas localidades posiblemente debidas a diferencias genéticas o al efecto de condiciones medioambientales como la irradiancia, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, etc.

La fotosíntesis generalmente se satura por luz cuando las enzimas encargadas de la fijación de carbono, especialmente RUBISCO, se encuentran saturadas por productos de la fase luminosa (Davison, 1991; Falkowsky y Raven, 1997). Un exceso de transporte de electrones en irradiancias elevadas tiene como consecuencia el agotamiento de los sustratos de la fase luminosa. La regeneración neta de los sustratos de la fase luminosa es imposible en condiciones de transporte de electrones sostenido y saturación de las enzimas del ciclo de Calvin. Consecuentemente, el transporte de electrones se ve disminuido por la fotoprotección y la fotoinhibición. Idealmente, los mecanismos fotoprotectores disipan la cantidad de energía excedente del máximo nivel de transporte de electrones sostenible (cuyo límite está impuesto por la actividad máxima de las enzimas del ciclo de Calvin). Los decrementos de ETR ante incrementos de irradiancia son inconsistentes con la función de los mecanismos fotoprotectores. Los decrementos de ETR en las horas de mayor irradiancia observados en *Z. marina* en este trabajo son, por lo tanto, consecuencia de una fotoinhibición. El retardo observado en la recuperación de ETR cuando la irradiancia baja a niveles

inferiores a los que causaron la disminución también indica la presencia de fotoinhibición crónica.

La fotosíntesis es un fenómeno complejo que depende de muchos factores ambientales, incluyendo la irradiancia, la temperatura, y numerosos nutrientes. Los organismos fotosintéticos tienen que adaptarse evolutivamente al intervalo de variabilidad de cada uno de estos factores en su hábitat modificando su acervo genético. La expresión diferencial de genes permite a los organismos aclimatarse a las condiciones prevalecientes en un momento y lugar determinado. Los sistemas producidos por la expresión de genes se regulan fisiológicamente para la aclimatación más fina, variable en tiempos segundos a horas (García-Mendoza, 2000). Los tres niveles de adaptación biológica se conocen como adaptación evolutiva, adaptación de desarrollo y adaptación fisiológica (las dos últimas también conocidas como aclimatación; García-Mendoza, 2000). La adecuación del aparato fotosintético a las condiciones ambientales requiere de procesos adaptativos a nivel evolutivo, de desarrollo y fisiológico. La irradiancia es el factor más variable en la naturaleza de todos los que influyen la fotosíntesis. Los efectos de otros parámetros ambientales, como la temperatura, repercuten finalmente en la forma en que los organismos utilizan la luz para la fotosíntesis (Aguirre-von-Wobeser *et al.*, 2001). La reducción de la eficiencia de utilización de la luz en altas irradiancias, mediada por la disipación no fotoquímica de energía, es un ejemplo de adaptación fisiológica a la irradiancia (García-Mendoza, 2000). En este estudio, *Z. marina* presentó un incremento de disipación no fotoquímica de energía en las horas de mayor irradiancia, que resultaron en una reducción de la respuesta de la fotosíntesis

a la irradiancia. Esta respuesta es un mecanismo de fotoprotección. El aparato fotosintético se ajusta a las condiciones de luz, mediante el ciclo de las xantofilas y otros mecanismos, de manera que una mayor cantidad de energía pueda ser disipada como calor (Demmig-Adams y Adams, 1992; Osmond, 1994). Los cambios en la absorción observados en *Z. marina* son, posiblemente, adaptaciones a nivel de desarrollo, ya que probablemente implican la síntesis de pigmentos, como se ha observado en otros organismos (Ramus *et al.*, 1976a). El papel de la absorción en la adaptación a la irradiancia es claro. Una mayor absorción, como se presenta en los pastos de la zona submareal, permite a los organismos de ambientes con poca irradiancia tener más energía para crecer. Una menor absorción, como la observada en los pastos de la zona intermareal, ayuda a los organismos de altas irradiancias a absorber menos luz y evitar la fotoinhibición. Los cambios en la relación entre la fotosíntesis y la irradiancia también son derivados de una combinación entre la expresión de genes y la regulación fisiológica (Geider y Osborne, 1992). Los parámetros que describen la relación entre fotosíntesis e irradiancia son consistentes con la aclimatación a la irradiancia. *Zostera marina* presentó un ETR_{MAX} elevado después de una incubación en altas irradiancias, que deriva probablemente de una mayor presencia de enzimas del ciclo de Calvin, que permite una mejor canalización de la energía absorbida por el aparato fotosintético. Similarmente, el E_K fue mayor para los pastos aclimatados a altas irradiancias. Un valor de E_K elevado permite probablemente a los pastos aclimatados a 100% E permanecer durante más tiempo a irradiancias iguales o menores a la irradiancia óptima (Falkowsky y Raven, 1997).

El pasto *Z. marina* demostró tener capacidad de aclimatarse a un amplio intervalo de irradiancias (20 a 100% E). Se ha demostrado que los pastos de la zona submareal y la zona intermareal de lagunas del Pacífico Mexicano no presentan diferencias genéticas consistentes (Muñiz Salazar *et al.*, en revisión). Lo anterior sugiere que la aclimatación a nivel de desarrollo y fisiológico (García Mendoza, 2000) es probablemente un mecanismo importante de sobrevivencia en el ambiente de irradiancia altamente variable que prevalece en las lagunas costeras. Aparentemente, la evolución ha favorecido la capacidad de aclimatación sobre la especialización a los diferentes regímenes de irradiancia.

El pasto marino *Z. marina* tiene la capacidad de aclimatarse a condiciones de irradiancia potencialmente fotoinhibitorias, incluyendo la exposición al 100% de la irradiancia incidente. Pastos de la zona intermareal aclimatados a bajas irradiancias sufren fotoinhibición si se les expone a altas irradiancias. Es posible que en el campo los organismos se aclimaten a bajas irradiancias durante periodos prolongados de marea alta durante el día. Sin embargo, los organismos tienen la capacidad de aclimatarse nuevamente a las altas irradiancias, ya que la fotosíntesis máxima alcanzada durante el día se recupera en pocos días. Los pastos de la zona submareal también se pueden aclimatar a las altas irradiancias, y alcanzar niveles de fotosíntesis tan elevados como los de los pastos colectados en la zona intermareal. La capacidad de *Z. marina* de la zona submareal de aclimatarse a altas irradiancias es consistente con la similitud genética reportada para los pastos de ambos ambientes (Muñiz-Salazar *et al.*, en revisión). Es posible que áreas

azolvadas en avenidas de ríos sean colonizadas por pastos de las zonas más profundas adyacentes. Estos pastos podrían aclimatarse en pocos días a las nuevas condiciones de luz.

La morfología puede ser una estrategia importante para la aclimatación y adaptación a medios ambientes con diferentes niveles de irradiancia. La luz incidente sobre los cloroplastos en las diferentes partes del tejido puede variar de acuerdo a la posición de las hojas, su área superficial, etc. El sombreado de unos organismos a otros también puede jugar un papel en la exposición a la irradiancia. El área superficial de *Z. marina* se encuentra aparentemente regulado por la irradiancia. La disminución significativa de la longitud de las hojas y la tendencia a una reducción de su ancho sugieren una disminución del área superficial en presencia de altas irradiancias. Una reducción del área superficial puede ayudar a reducir la E por unidad de volumen. El número de hojas por haz no está aparentemente regulado por la irradiancia, lo que sugiere que la regulación del sombreado por hojas del mismo haz no es una estrategia importante de aclimatación a la irradiancia.

La comprensión de los fenómenos que regulan la fotosíntesis, incluyendo la fotoinhibición, puede ser muy importante para la planeación de estrategias de cultivo y repoblamiento de organismos fotosintéticos marinos. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el pasto *Z. marina* puede

aclimatarse en pocos días a un intervalo amplio de regímenes de irradiancia, independientemente de la irradiancia en el lugar de donde provengan.

Zostera marina presentó una gran capacidad de aclimatación a las altas irradiancias. Sin embargo, *Z. marina* presenta fotoinhibición si se le expone a altas irradiancias después de un periodo de baja irradiancia. Es probable que *Z. marina* se aclimate a bajas irradiancias en periodos en que se encuentre cubierto por la columna de agua durante el día, y sufra fotoinhibición durante mareas vivas, cuando la marea baja coincide con el mediodía.

CONCLUSIONES

La fotoinhibición de la fotosíntesis en *Zostera marina* puede ser estudiada por medio de la fluorescencia de pulsos de amplitud modulada.

Altas irradiancias producen mecanismos adaptativos en *Z. marina*, incluyendo la disipación no fotoquímica de energía.

Zostera marina puede sufrir fotoinhibición de la fotosíntesis si se incrementa el régimen de irradiancia que recibe.

Zostera marina reduce la fotoinhibición de la fotosíntesis mediante procesos de aclimatación.

Zoster marina de la zona submareal tiene una capacidad elevada de aclimatación a las altas irradiancias.

Una respuesta fotoadaptativa de carácter morfológico documentada en este trabajo es que el área superficial de las hojas de *Z. marina* está controlado de manera inversa por el régimen diario de irradiancia, como una respuesta para reducir el área de absorción expuesta a la luz.

REFERENCIAS

Aguirre-von-Wobeser E, Figueroa FL, Cabello-Pasini A. 2000. Effect of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *Journal of Applied Phycology* 12:159-168.

Aguirre-von-Wobeser E, Figueroa FL, Cabello-Pasini A. 2001. Photosynthesis and growth of red and green morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) from the Philippines. *Marine Biology* 138: 679-686.

Andrews TJ, Abel KM. 1979. Photosynthetic Carbon Metabolism in Seagrasses. *Plant Physiology* 63:650-656.

Backman TW, Barilotti DC. 1976. Irradiance reduction: effects on standing crops of the eelgrass *Zostera marina* in a coastal lagoon. *Marine Biology* 34: 33-40.

Beach KS, Smith CM. 1996a. Ecophysiology of tropical rhodophytes. II. Microscale acclimation in photosynthesis. *Journal of Phycology* 32: 710-718.

Beach KS, Smith CM. 1996b. Ecophysiology of tropical rhodophytes. I. Microscale acclimation in pigmentation. *Journal of Phycology* 32: 701-710.

- Beer S, Vilenkin B, Weil A, Veste M, Susel L, Eshel A. 1998. Measuring photosynthetic rates in seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Marine Ecology Progress Series* 174:293-300.
- Beer S, Björk M. 2000. Measuring rates of photosynthesis of two tropical seagrasses by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Aquatic Botany* 66:69-76.
- Biggins J, Bruce D. 1985. Mechanism of the light state transition in photosynthesis. III. Kinetics of the state transition in *Porphyridium cruentum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 806: 230-236.
- Cabello-Pasini A, Aguirre-von-Wobeser E, Figueroa FL. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor culture systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 57:169-178.
- Cabello-Pasini A, Muñiz-Salazar R, Ward DH. En revisión. Annual variation of biomass and photosynthesis in *Zostera marina* L. along the Pacific Coast of Baja California. *Aquatic Botany*.
- Cabello-Pasini A, Lara-Turrent C, Zimmerman RC. En prensa. Effect of storms on photosynthesis, carbohydrate content and survival of eelgrass populations from a coastal lagoon and the adjacent open ocean. *Aquatic Botany*.

- Dawes CJ. 1992. Irradiance acclimation of the cultured Philippine seaweeds *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum*. *Botanica Marina* 35: 189-195.
- Dawson SP, Dennison WC. 1996. Effects of ultraviolet and photosynthetically active radiation on five seagrass species. *Marine Biology* 125:629-638.
- Demmig-Adams B, Adams III WW. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 599-626.
- Dennison WC, Alberte RS. 1985. Role of daily light period in the depth distribution of *Zostera marina* (eelgrass). *Marine Ecology Progress Series* 25: 51-61.
- Dubinsky Z, Matsukawa R, Karube I. 1995. Photobiological aspects of algal mass culture. *Journal of Marine Biotechnology* 2:61-65.
- Edwards GE, Baker NR. 1993. Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted accurately from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynthesis Research* 37:89-102.
- Falkowsky PG, Raven JA. 1987. *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science. 375 pp.

- García Mendoza E. 2000. Photoadaptation in microalgae: xanthophyll cycle and state transitions strategies. Tesis Doctoral. Universidad de Ámsterdam. Ámsterdam. 117 pp.
- Geider JR, Osborne BA. 1992. Algal Photosynthesis. Chapman and Hall. Londres. 256 pp.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990:87-92.
- Hanelt D. 1992. Photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the South China Sea. *Marine Ecology Progress Series* 82:199-206.
- Hanelt D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Marine Biology* 131:361-369.
- Hanelt D, Li J, Nultsch W. 1994. Tidal dependence of photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the China Sea. *Botanica Acta* 107:66-72.

Jiménez C, Niell FX, Algarra P. 1987. Photosynthetic adaptation of *Zostera noltii* Hornem. Aquatic Botany 29: 217-226.

King RJ, Schramm W. 1976. Photosynthetic rates of benthic marine algae in relation to light intensity and seasonal variations. Marine Biology 37: 215-222.

Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42: 313-349.

Leverenz JW, Falk S, Pilström C-M, Samuelson G. 1990. The effects of photoinhibition on the photosynthetic light-response curve of green plant cells (*Chlamydomonas reinhardtii*). Planta 182:161-168.

Moisan TA, Olaizola M, Mitchell BG. 1998. Xanthophyll cycling in *Phaeocystis antarctica*: changes in cellular fluorescence. Marine Ecology Progress Series 169: 113-121.

Osmond CB. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En: Baker, HR, Bowyer, JR (eds.). Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field. BIOS Scientific Publ. Oxford. pp. 1-24.

- Ralph PJ, Gademann R, Dennison WC. 1998. *In situ* seagrass photosynthesis measured using a submersible, pulse-amplitude modulated fluorometer. *Marine Biology* 132:367-373.
- Ramus J, Beale SI, Mauzerall D, Howard KL. 1976a. Changes in Photosynthetic Pigment Concentration in Seaweeds as a Function of Water Depth. *Marine Biology* 37:223-229.
- Ramus J, Beale SI, Mauzerall D. 1976b. Correlation of Changes in Pigment Content with Photosynthetic Capacity of Seaweeds as a Function of Water Depth. *Marine Biology* 37:231-238.
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynthesis Research* 10: 51-62.
- Sokal RR, Rohlf FJ. 1984. *Biometry*. W.H. Freeman and Co. New York. 859 pp.
- Touchette BW, Burkholder JM. 2000. Overview of the physiological ecology of carbon metabolism in seagrasses. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 250:169-205.

Webb WL, Newton M, Starr D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*.

Mathematical model. *Oecologia* 17:281-291.

Zimmerman RC, Cabello-Pasini A, Alberte, RS. 1994. Modeling production of aquatic macrophytes from irradiance measurements: a comparative analysis.

Marine Ecology Progress Series 114:185-196.