

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

POSGRADO EN OCEANOGRAFIA COSTERA



“EFECTO DE LA IRRADIANCIA Y TEMPERATURA SOBRE LA FOTOSÍNTESIS,
TASAS DE CRECIMIENTO Y CALCIFICACIÓN DE ALGAS CORALINAS
GENICULADAS“

TESIS, QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ROMÁN MANUEL VÁSQUEZ ELIZONDO

Ensenada, Baja California, Diciembre de 2008


RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de las irradiancia y temperatura sobre el metabolismo fotosintético de las algas coralinas geniculadas. Como parte de este estudio además, se evaluó la relación entre el transporte de electrones y la fotosíntesis bruta y el efecto de la temperatura sobre esta relación. Por último, se evaluó su crecimiento en condiciones de campo y el efecto de la temperatura sobre su calcificación en condiciones controladas. Los resultados mostraron que las algas coralinas toleran un amplio intervalo térmico (10-35°C) consistente con las variaciones térmicas encontradas en la zona intermareal. Por otro lado, bajo condiciones de luz alta (1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) estas algas muestran un decremento de más del 50% de su eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m), sin embargo, la evolución de oxígeno solo disminuyó un 30%. Esto sugiere que una fotoinactivación reversible de los centros de reacción del fotosistema II y un fotodaño, regulan la maquinaria fotosintética en estas condiciones. Por otro lado, la recuperación del F_v/F_m después de luz alta, es de aproximadamente 7 horas para las algas coralinas, lo cual puede sugerir que un fotodaño y una disipación de calor alta pero sostenida estén presentes en la regulación del aparato fotosintético. La relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones fue lineal en la mayoría de los tratamientos utilizados (10-30°C) sin embargo la mayor variación del modelo lineal se encontró a irradiancias altas, que puede ser explicada por proceso alternos que demandan electrones. En bajas irradiancias, el transporte de electrones puede ser un buen estimador de la fotosíntesis en algas coralinas. El crecimiento de una especie de algas coralinas fue menor de 2 mm mes^{-1} y es consistente con lo reportado para este grupo. La temperatura, al contrario de lo que sucede con la calcificación en oscuridad, regula las tasas de calcificación en condiciones de luz saturante (aproximadamente dos-veces mayor que en oscuridad). Lo anterior puede estar en relación a la síntesis de productos orgánicos en la fotosíntesis y que forman una matriz orgánica, la cual regula la precipitación de CaCO_3 en estas algas. Por último, se detectó la presencia de una anhidrasa carbónica la cual funciona como mecanismo de incorporación de carbono, al facilitar CO_2 al proceso de fotosíntesis y calcificación.

EFECTO DE LA IRRADIANCIA Y TEMPERATURA SOBRE LA FOTOSINTESIS,
TASAS DE CRECIMIENTO Y CALCIFICACION DE ALGAS CORALINAS
GENICULADAS

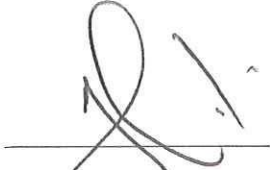
TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

ROMÁN MANUEL VÁSQUEZ ELIZONDO


Aprobada por


Dr. Alejandro Cabello Pasini

Director de tesis


Dr. Isai Pacheco Ruiz

Sinodal


Dr. José María Hernández Ayón

Sinodal

DEDICATORIA

A mis dos abuelos, con los que me hubiera gustado convivir en esta etapa de mi vida

Román Vásquez Beristain

Rafael Elizondo Castillo

...y a sus hijos, los cuales me educaron el poder elegir y sentaron las bases para ser
quien soy

Guadalupe de Jesús Elizondo Hernández

Emilio Fernando Vásquez Rosas

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme apoyado en todo momento antes y desde comenzar este largo camino de la ciencia hace ocho años y a mi hermano Rafael por su apoyo incondicional.

Al Dr. Alejandro Cabello-Pasini, por abrirme la puerta de su laboratorio, haber confiado en mí y haberme sumergido en el mundo de la fotosíntesis.

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de maestría, con número de registro 201345.

Al comité revisor, Dr. Alejandro Cabello-Pasini, Dr. Isaf Pacheco Ruiz y Dr. Martin Hernández Ayón, por sus comentarios y opiniones para mejorar el escrito.

Al M. en C. Juan Manuel López Vivas y la Dra. Raquel Muñiz Salazar, por haberme apoyado durante mis primeras estancias en el Laboratorio y su ayuda durante el desarrollo de esta tesis.

Al laboratorio de Botánica Marina y a todos sus integrantes, en especial al Técnico M en C. Víctor Macías y el M. en C. Enrique Hernández Garibay.

A docentes y técnicos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, en especial a Feliciano y Arturo Siqueiros.

A los siguientes profesores Roberto Millán, Eduardo Santamaría del Ángel, Adriana González, Martín Ayón, Víctor Camacho, Francisco Delgadillo, Francisco Correa.

Al grupo CONGAL de CICESE.

A todos los alumnos y docentes del Curso “Light and Photosynthesis on coral Reefs” (2008), por haber cambiado mi visión sobre la ciencia.

A dos amigas incondicionales, gracias por su apoyo durante estos dos años y más de maestría, Míryam Juárez y Julieta Hernández.

A Karina de la Rosa Meza, por su apoyo incondicional desde siempre.

A la familia Vélez-Bustamante, y a Dany (Rana) por su amistad y por todo.

A los compañeros de generación y no generación, Denisse, Yessica, Fabiola, Idaly, Gabriel, Eduardo, Carlos, Gandhi, Gerardo, Mariana, Candy...etc..

A los que no tuvieron que ver nada con la tesis, pero por alguna u otra razón estuvieron ahí y compartí tiempo con ellos, Kb, Chacho, Ivan, Pam, Laura, Christian.. y olvidados.

ÍNDICE

RESUMEN	I
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
<i>I.1 Antecedentes generales</i>	<i>5</i>
<i>I.2 Hipótesis.....</i>	<i>11</i>
<i>I.3 Objetivo general</i>	<i>12</i>
<i>I.4 Objetivos particulares</i>	<i>12</i>
CAPÍTULO II. EFECTO DE LA IRRADIANCIA Y TEMPERATURA SOBRE LA FOTOSÍNTESIS, TRANSPORTE DE ELECTRONES Y CRECIMIENTO DE ALGAS CORALINAS GENICULADAS ..	13
<i>II.1. Introducción.....</i>	<i>13</i>
<i>II.2. Materiales y métodos</i>	<i>15</i>
<i>II.3 Resultados</i>	<i>22</i>
<i>II.4 Discusión.....</i>	<i>37</i>
CAPÍTULO III. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CALCIFICACIÓN EN LAS ALGAS CORALINAS GENICULADAS	46
<i>III.1. Introducción.....</i>	<i>46</i>
<i>III.2. Materiales y métodos</i>	<i>48</i>
<i>III.3. Resultados.....</i>	<i>53</i>
<i>III.4. Discusión</i>	<i>62</i>
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL	70
LITERATURA CITADA	74
APÉNDICE	86

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.- Curvas fotosíntesis irradiancia con respecto a la temperatura (10-35°C). A, *Bossiella orbigniana*; B, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y C, *Lithothrix aspergillum*. 23
- Figura 2.- Parámetros fotosintéticos obtenidos de las curvas P-E, para las algas corallinas geniculadas *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum*, con respecto a la temperatura. A, Tasa de fotosíntesis máxima (P_{max}); B, Pendiente inicial de la curva (α) y C, Coeficiente de subsaturación (E_k). 24
- Figura 3.- Efecto de los tratamientos oscuridad y 15 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz tenue) y 1000 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz alta) sobre la evolución de oxígeno y F_v/F_m después de 30 minutos, expresado como porcentaje de cambio del inicial. A, *Bossiella orbigniana*; B, *Corallina officinalis* var. *chilensis*. 29
- Figura 4.- Efecto de luz alta (1000 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por una hora sobre la fotosíntesis de las algas coralinas y su recuperación en *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis* var. *chilensis*. A, expresado como F_v/F_m ; B, seguimiento de los parámetros F_o , F_m y F_v del mismo experimento en *Bossiella orbigniana*; C, igual al anterior pero en *Corallina officinalis* var. *chilensis*. 30
- Figura 5.- Efecto y recuperación de los parámetros F_o , F_t , F_m , F_m' y F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ después de 1h a 250, 500, 1000 y 1800 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Bossiella orbigniana*. 31
- Figura 6.- Efecto y recuperación de los parámetros F_o , F_t , F_m , F_m' y F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ después de 1h a 250, 500, 1000 y 1800 μmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Corallina officinalis* var. *chilensis*. 32
- Figura 7.- Efecto de la temperatura (10-35°C) sobre la relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones en *Bossiella orbigniana*. 33
- Figura 8.- Efecto de la temperatura (10-35°C) sobre la relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones en *Corallina officinalis* var. *chilensis*. 34
- Figura 9.- Efecto de la temperatura (10-35°C) sobre la relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones en *Lithothrix aspergillum*. 35

Figura 10.- Cambios de la alcalinidad total en incubaciones de 8h. A, control del método, agua de mar filtrada con aeración contante; B, parte lineal de la disminución de la alcalinidad total acumulada, normalizada por gramos de peso seco en <i>Bossiella orbigniana</i>	56
Figura 11.- Efecto de la temperatura en luz y oscuridad sobre la tasa de calcificación. A, <i>Bossiella orbigniana</i> ; B, <i>Corallina officinalis var. chilensis</i>	57
Figura 12.- Efecto del inhibidor acetazolamida (AZ) sobre la fotosíntesis de de <i>Bossiella orbigniana</i> y <i>Corallina officinalis var. chilensis</i> , expresado como porcentaje de cambio del inicial.....	60
Figura 13.- Efecto del inhibidor acetazolamida (AZ) sobre la calcificación de <i>Bossiella orbigniana</i> y <i>Corallina officinalis var. chilensis</i> , expresada como % del control. .	61

LISTA DE TABLAS

Tabla I Tasas de crecimiento estimadas bajo distintas condiciones en algunas especies de algas coralinas geniculadas.....	8
Tabla II.- Tasas de calcificación para distintas especies de algas coralinas (geniculadas y no geniculadas) utilizando la alcalinidad total para estimar la calcificación. Unidades: $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$	10
Tabla III.- Relación entre los pesos húmedos, pesos secos, contenido de CaCO_3 y materia orgánica seca para las algas coralinas estudiadas.	55
Tabla IV.- Proporción entre la calcificación en luz y oscuridad para las algas coralinas geniculadas.....	58
Tabla V.- Comparación entre las tasa de calcificación entre distintas especies, incluido este trabajo. Todas las tasas de calcificación son en luz. Unidades: $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$	69
Tabla VII.- Proporción entre la fotosíntesis y calcificación a distintas temperaturas para <i>B. orbigniana</i> y <i>C. officinalis var. chilensis</i> . Fotosíntesis expresada como P_{max}	73

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las algas coralinas geniculadas (ACG) son macroalgas rojas que precipitan carbonato de calcio (CaCO_3) en sus paredes celulares en forma de calcita. Estas algas pertenecen al orden Corallinales y a diferencia de las algas coralinas no geniculadas, su talo es parcialmente calcificado (Johansen 1988; Woelkerling 1988). Presentan talos segmentados y forman intergeniculas calcificadas y geniculas no calcificadas. Son ecológicamente importantes debido a la formación de arrecifes coralinos, su abundante producción de CaCO_3 , su distribución mundial y su abundancia (Johansen, 1988; Lee, 1999). Recientemente estas algas han sido estudiadas en mayor detalle pues juegan un papel importante en los flujos de carbono en ecosistemas donde son dominantes (i. e. Benssousan y Gattuso, 2007). En las costas rocosas de México existen al menos ocho géneros de ACG y poco se conoce sobre su metabolismo fotosintético, crecimiento y calcificación. Solo para el caso del alga coralina no geniculada *Lithophyllum margaritae* se conocen sus tasas de fotosíntesis, crecimiento y calcificación y el efecto que la temperatura tiene sobre estas tasas (Steller *et al.*, 2007).

La supervivencia y crecimiento de las algas el medio puede ser el resultado de diversos factores que afecten el metabolismo fotosintético, como la luz, temperatura y nutrientes (Cabello-Pasini *et al.*, 2003). Mientras que la luz limita la eficiencia fotoquímica y la cantidad de energía producida, la temperatura regula el uso de la energía producida para fijar el carbono inorgánico. En ambientes intermareales estos factores son de gran importancia pues varían en escalas de tiempo muy cortas. A pesar

de que para muchas algas se conoce el efecto de la irradiancia y la temperatura sobre el metabolismo fotosintético y la regulación del mismo, para las ACG poco se sabe.

A medida que la luz se incrementa, la tasa de fotosíntesis comúnmente se incrementa de una forma lineal hasta saturarse en valores máximos. En estas condiciones, las algas presentan mecanismos de regulación que les permiten soportar radiación excesiva, pues puede ser dañina. Estas estrategias de disipación de energía son denominadas mecanismos de fotoprotección (Häder y Figueroa, 1997). Sin embargo, una vez que la capacidad de fotoprotección se agota, puede ocurrir un fotodaño, el cual, para su recuperación necesita una síntesis *de novo* de proteínas (Demming-Adams y Adams, 1992; Osmond, 1993; Maxwell y Johnston, 2000; Blankenship, 2002). Aun cuando los mecanismos anteriores y el efecto que tienen sobre la regulación del aparato fotosintético se ha descrito para muchas macroalgas y ayuda a entender como en condiciones naturales las algas regulan su metabolismo, para las ACG existe poca información (i. e. Häder *et al.*, 2003).

Una forma de estudiar el metabolismo de las algas es por medio de estimaciones de la fluorescencia de la clorofila, las cuales han sido utilizadas para evaluar estrés e identificar procesos de fotoprotección y fotoinhibición (Hanelt *et al.*, 1993; Häder *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2004; Schubert, 2008). Además, es posible estimar el transporte de electrones (TE) asociado al fotosistema II (PSII). Estos métodos son no destructivos y las estimaciones son más rápidas en comparación con los métodos tradicionales, sin embargo necesitan validarse. Estas validaciones consisten en evaluaciones simultáneas de la fluorescencia de la clorofila con métodos de intercambio de gas. Una correlación

lineal permitiría estimar la fotosíntesis eficientemente, sobre todo si se requiere estimar las tasas fotosintéticas por medio del TE (Edwards y Baker, 1993; Maxwell y Johnston, 2000; Franklin y Badger, 2001). Estudios recientes demostraron que el TE puede ser un buen estimador de la fotosíntesis solo para algunas macroalgas, mientras que para las ACG no existe ningún estudio que evalúe la relación entre el TE y la evolución de oxígeno, así como el efecto de la temperatura sobre la relación.

Las ACG tienen un crecimiento lento ($< 3 \text{ mm mes}^{-1}$, tabla I) en relación a otras algas no calcificantes. Debido a la afinidad que tiene por el CaCO_3 , la tinción rojo de alizarin permite evaluar bandas de crecimiento en organismos calcificantes de manera efectiva en campo. A pesar de que la efectividad de éste método en organismos calcáreos ha sido demostrada, esto solo fue hecho para el alga coralina geniculada *Corallina officinalis* y se encontró tasas de crecimiento similares en campo y en laboratorio (Andrake y Johansen, 1980).

Las ACG precipitan CaCO_3 en las paredes celulares de sus intergenículas, por medio de un mecanismo mediado por una matriz orgánica (i. e. pared celular) la cual regula la formación y crecimiento de los cristales de CaCO_3 (Borowitzka, 1987). Estas algas coralinas calcifican en luz y oscuridad y se ha demostrado que la fotosíntesis aumenta la calcificación, pues las tasas de calcificación siempre son mayores en condiciones de luz (Borowitzka, 1981). Aunque se han sugerido distintos mecanismos de calcificación en estas algas, el cómo calcifican e incorporan carbono inorgánico (C_i) para este proceso permanece incierto. Por otro lado, dependiendo de la especie y su área de cobertura, estas algas pueden contribuir significativamente en los aportes de

sedimentos calcáreos y ser fuente importante de reducción de C_i disuelto, sin embargo las tasas de calcificación para muchas especies son desconocidas. (El Haikali *et al.*, 2004; Steller *et al.*, 2007)

En la costa de Baja California, existen al menos cinco géneros de ACG que habitan la zona intermareal. Estas se extienden hasta latitudes más templadas y pueden encontrarse en altas densidades (Aguilar-Rosas, 1981; Abbot y Hollenberg, 1978; Lüning, 1990). En el intermareal la irradiancia puede superar los $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y logra ser suficiente para saturar la fotosíntesis (Peña-Manjarrez, *et al.* 2005; Vásquez-Elizondo, observ. pers.). Al igual que la temperatura, cambios significativos de irradiancia pueden registrarse en escalas cortas de tiempo están en función de las mareas, ángulo de incidencia solar y oleaje. Conocer el efecto de las variaciones de irradiancia y temperatura sobre la fotosíntesis, es crítico para identificar y entender los mecanismos con los cuales se regula su maquinaria fotosintética y puede explicar el grado de tolerancia y nivel de competencia con respecto a otras especies.

El TE puede ser un buen y rápido estimador de la fotosíntesis, sin embargo es necesaria una validación con métodos tradicionales. Por tal motivo, la comparación simultánea entre la fluorescencia de la clorofila y la evolución de O_2 es necesaria para correlacionar ambos métodos. La calcificación, al igual que la fotosíntesis, causa una disminución del carbono inorgánico disuelto. No obstante, es necesario cuantificar sus tasas de calcificación así como su crecimiento para inferir su rol en los flujos de carbono. Por lo anterior, es crítico estudiar el metabolismo fotosintético, el crecimiento y calcificación en estas algas.

I.1 ANTECEDENTES GENERALES

La respuesta típica de las algas con respecto a la irradiancia y temperatura, se puede observar en las curvas fotosíntesis-irradiancia (P-E, Geider y Osborne, 1992). Además, los parámetros fotosintéticos que se obtienen de ellas como la fotosíntesis máxima (P_{\max}), eficiencia fotosintética (alfa ó α) y el coeficiente de subsaturación (E_k), pueden ser buenos indicadores de la regulación de la fotosíntesis a corto o largo plazo ó a un cierto grado de aclimatación (i. e. temperatura, Henley, 1993). Por ejemplo, en el alga coralina no geniculada *Lithothamnion corallioides* se encontró una relación directa de los valores de P_{\max} y E_k con la temperatura ($>$ en verano, Martin *et al.*, 2006). Por otro lado en el rodolito *L. margaritae* en incubaciones a distintas temperaturas se encontró que la P_{\max} y el E_k aumentaron desde los 10 hasta los 25°C. Los de valores α en cambio, mostraron poca variación en las incubaciones (Steller *et al.*, 2007).

Existen distintos mecanismos de fotoprotección en las algas, y muchos se relacionan a una disipación de calor o quenching no fotoquímico (NPQ) y generalmente ocurren en la antena del aparato fotosintético. Su principal función es suprimir el daño oxidativo del aparato fotosintético y aunque son rápidamente reversibles, reducen la eficiencia fotoquímica o capacidad de evolucionar O_2 (Krause y Weis, 1991; Deming-Adams y Adams, 1992; Maxwell y Johnston, 2000). El ciclo de las xantofilas es uno de los principales mecanismos fotoprotección en algas (Osmond, 1994; Nyyogi, 1999). Este ciclo consiste en la rápida conversión de las xantofilas violaxantina (Vio) ó diadinoxantina (Ddx), a zeaxantina (Zea) vía anteraxantina (Ant) o diatoxantina (Dx) en condiciones lumínicas altas. Mientras que la Zea y Dx disipan energía en forma de calor,

son transformadas a Vio ó Ddx en condiciones bajas de luz y transfieren energía a la clorofila a. Estos ciclos ocurren en la mayoría de las algas, excepto en las algas rojas. Sin embargo se demostró la presencia de Vio, Ant y Zea en algunas Rhodophyta incluidas las ACG (Schubert *et al.*, 2006). Otro mecanismo de fotoprotección se asocia a una disipación de calor de los centros de reacción del PSII, los cuales dejan de transferir energía momentáneamente (Gorbunov *et al.*, 2001). Los estados de transición, ocurren cuando existe un desbalance en la energía absorbida por los dos fotosistemas (I y II). El resultado es una migración de la antena del PSII al PSI ó viceversa y una reducción en el área de absorción de la antena. Finalmente, hay mecanismos de inducción rápida al NPQ, pero de disipación lenta (Schubert, 2008). Una vez que la capacidad de fotoprotección se agota, puede ocurrir una fotoinactivación que se asocia a un fotodaño (fotoinactivación irreversible) y ocurre en los centros de reacción. En condiciones excesivas de irradiancia existe una acumulación de transportadores reducidos, aumenta la probabilidad de formación y reacción de radicales oxidantes con los centros de reacción, los cuales pueden degradar a la proteína D1. Si la tasa de degradación sobrepasa a la síntesis, existe un fotodaño (Aro *et al.*, 1993; Osmond, 1993; Blankenship, 2002). Al igual que la fotoprotección, la fotoinactivación reduce eficiencia fotoquímica y tasa de fotosíntesis máxima pero su recuperación necesita de un mayor tiempo (horas), pues el mecanismo de reparación implica una síntesis *de novo* de proteínas (Osmond, 1994).

Una forma de estimar lo anterior es mediante la obtención de ciertos parámetros a partir de la fluorescencia de la clorofila del PSII. La proporción de la fluorescencia

variable ($F_m - F_o = F_v$) a la fluorescencia máxima (F_m) denominada eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) en tejidos adaptados a oscuridad y la misma proporción en condiciones de luz denominada eficiencia cuántica efectiva ($\Delta F/F_m$) pueden ser indicadores del estado fisiológico del PSII. Valores bajos del F_v/F_m después de un tratamiento de luz alta, reflejan que la capacidad máxima para realizar fotosíntesis ha sido alterada. Lo anterior es principalmente por un decremento en F_m por un aumento en el NPQ.

Estimando los tiempos de recuperación del F_v/F_m , pueden identificarse los mecanismos de regulación. Tiempos rápidos se asocian a la fotoprotección (minutos) y tiempos lentos de recuperación (horas/días) se asocian a un fotodaño (Maxwell y Johnston, 2000). Por ejemplo, se encontró que en dos morfotipos de *Corallina elongata* (luz y sombra) en experimentos de exposición a luz alta (1h) y recuperación, la reducción y tiempo de recuperación del F_v/F_m fue mayor para el morfotipo de sombra. Ambos morfotipos decrecieron más del 50% de su valor inicial de F_v/F_m . Sin embargo, después de una hora de recuperación el morfotipo de luz alcanzó casi en su totalidad su valor inicial mientras que el morfotipo de sombra solo alcanzó una recuperación del 50% después de 5 horas (Häder *et al.*, 1997). Resultados similares se encontraron para los morfotipos de *C. officinatis* (Häder *et al.*, 2003). En ambos estudios el morfotipo de luz mostró una capacidad mayor para disipar calor. Por otro lado, para otras ACG y algas rojas con composición pigmentaria parecida, en experimentos similares (exposición y recuperación y estimaciones de F_v/F_m y evolución de O_2), se encontró que un mecanismo de disipación de calor rápida (reducción rápida del F_v/F_m) y una recuperación lenta no asociada a un fotodaño regulan la fotosíntesis en irradiancias altas (Schubert, 2008).

Tabla I Tasas de crecimiento reportadas bajo distintas condiciones en algunas especies de algas coralinas geniculadas.

Especie	Crecimiento (mm mes ⁻¹)	Condición	Fuente
<i>Corallina officinalis</i>	2	Coltart y Johansen (1973)	Laboratorio (12-16°C)
<i>Calliarthron tuberculosum</i>	1.7	Johansen y Austin (1970)	Campo
<i>Corallina officinalis</i> var <i>chilensis</i>	0.83	Foster (1975)	Campo
<i>Calliarthron cheilosporoides</i>	1.6	Foster (1975)	Campo
<i>Corallina officinalis</i>	1.2 y 1.4	Andrake y Johansen (1980)	Campo y Laboratorio

El transporte de electrones (TE) comúnmente se ha correlacionado con la evolución de oxígeno. Aunque para las ACG no existe ningún estudio que demuestre lo anterior, se sabe que para algunas macroalgas esta relación es dependiente de la especie, luz y otros factores. De manera general se sabe que para especies como *Ulva lactuca*, y *Ulva fasciata*, *Ulva australis* y *Porphyra columbina* existe una relación lineal a irradiancias debajo de la saturación, sin embargo esta linealidad se pierde a irradiancias altas (Beer *et al.*, 2000; Franklin y Badger, 2001; Longstaff *et al.*, 2002; Cabello-Pasini y Figueroa, 2006).

Con respecto a la calcificación, se ha encontrado en algunas ACG, las tasas de calcificación bajo saturación de luz son de aproximadamente el doble que en oscuridad. Además, estas tasas son proporcionales a las tasas de fotosíntesis (Pentecost, 1978; Smith y Roth, 1979; Borowitzka, 1981). La tabla II muestra las tasas de calcificación reportadas recientemente para algunas especies de algas coralinas.

Aunque existen estudios que demuestran cómo funciona el metabolismo fotosintético, el crecimiento y la calcificación en las ACG, éstos son escasos, dispersos y solo en algunos casos tienen continuidad. En México estudios de esta índole son escasos (Steller *et al.*, 2007; Schubert, 2008). Con la finalidad de entender cómo se regulan los mecanismos de fotosíntesis y calcificación en estas algas, es necesario conocer su capacidad de respuesta bajo condiciones controladas. Esto permitiría tener una visión más amplia para realizar estudios en campo y conocer la regulación del metabolismo en condiciones variables. Además la importancia actual de los organismos calcificantes es crucial para poder entender qué papel juegan en el ciclo del carbono local.

Tabla II.- Tasas de calcificación para distintas especies de algas coralinas (geniculadas y no geniculadas) utilizando la alcalinidad total para estimar la calcificación. Unidades: $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Especie	Calcificación	Condición	Fuente
<i>Corallina ellongata</i>	8.9	<i>In situ</i> , variables	El Haikali <i>et al.</i> (2004)
<i>Lithothamnion coralloides</i>	9.6	<i>In situ</i> , variables (verano)	Martin <i>et al.</i> (2006)
	3.3	<i>In situ</i> , variables (invierno)	
<i>Lithophyllum margariate</i>	1.02	10 °C	Steller <i>et al.</i> (2007)
	3.6	25 °C	

I.2 HIPÓTESIS

- La temperatura e irradiancia aumentaran el metabolismo fotosintético de las ACG. Los parámetros de las curvas fotosíntesis-irradiancia, fotosíntesis máxima (P_{max}) y el coeficiente de subsaturación (E_k) se verán altamente influenciados por la temperatura mientras que la eficiencia fotosintética (alfa, α) mostrara poca variación con respecto a este parámetro.
- Condiciones de luz alta ($>E_k$), causaran un decremento en el eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) y la fotosíntesis máxima (P_{max}) en las ACG.
- La recuperación de la eficiencia cuántica máxima será rápida (horas) en las ACG.
- La relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones estará correlacionada positiva y linealmente en las ACG. Esta relación no se verá alterada significativamente por efecto de la temperatura, sin embargo la mayor variación del modelo lineal se espera irradiancias altas.
- Las tasas de crecimiento en las ACG serán consistentes con lo reportado ($<3\text{mm mes}^{-1}$). Se esperara encontrar mayores tasas de crecimiento en temporadas más cálidas.
- Las tasas de calcificación aumentaran por efecto de la temperatura. Las tasas de calcificación serán mayores en condiciones de luz saturante.

I.3 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la fisiología de la fotosíntesis, el crecimiento y la calcificación en algas coralinas geniculadas.

I.4 OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar el efecto de la temperatura en la fotosíntesis máxima (P_{\max}), la eficiencia fotosintética (alfa, α) y el coeficiente de subsaturación (E_k) en las algas *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix asperigillum*.
- Determinar el efecto de las altas irradiancias sobre la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) y la fotosíntesis máxima (P_{\max}) en las algas *B. orbigniana* y *C. officinalis* var. *chilensis*.
- Estimar el tiempo de recuperación del F_v/F_m después de altas irradiancias en las algas *B. orbigniana* y *C. officinalis* var. *chilensis*.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la relación fotosíntesis bruta vs transporte de electrones en las algas *B. orbigniana*, *C. officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix asperigillum*.
- Determinar las tasas de crecimiento bajo condiciones de campo en el alga *Corallina officinalis* var. *chilensis*.
- Evaluar el efecto de la temperatura en las tasas de calcificación en condiciones de luz y oscuridad en las algas *B. orbigniana* y *C. officinalis* var. *chilensis*.

CAPÍTULO II. EFECTO DE LA IRRADIANCIA Y TEMPERATURA SOBRE LA FOTOSÍNTESIS, TRANSPORTE DE ELECTRONES Y CRECIMIENTO DE ALGAS CORALINAS GENICULADAS

II.1. INTRODUCCIÓN

Las algas coralinas (orden Corallinales), han sido estudiadas recientemente por su importancia dentro de los flujos de carbono entre otras cosas por su habilidad para calcificar (Benssousan y Gattuso, 2007; Martin *et al.*, 2007). A pesar de esto, se conoce poco de su metabolismo fotosintético. La irradiancia y la temperatura son los dos principales factores que regulan la fotosíntesis en plantas. Aunque afectan distintos procesos, un aumento de la irradiancia y la temperatura generalmente resulta en un incremento de la tasa fotosintética (Geider y Osborne, 1992; Falkowsky y Raven, 1997).

Algunas especies de algas coralinas geniculadas (ACG) habitan la zona intermareal, en donde la irradiancia y temperatura pueden variar y aumentar considerablemente hasta saturar la fotosíntesis. En estas condiciones, mecanismos que regulan el metabolismo fotosintético se activan. En un primer plano, existe una capacidad de fotoprotección asociada a una disipación de calor por la antena del aparato fotosintético ó los centros de reacción del fotosistema II. Sin embargo, una vez que esta capacidad se agota, puede existir un fotodaño asociado a una degradación alta de la proteína D1 (Maxwell y Johnson, 2000; Gorbunov *et al.*, 2001; Shubert, 2008).

La proporción de la fluorescencia variable a la fluorescencia máxima (F_v/F_m), ha sido utilizada en algas calcáreas para evaluar estrés e identificación de procesos de fotoprotección y/o fotoinhibición en laboratorio y campo (Häder *et al.*, 1997; Häder *et*

al., 2003; Wilson *et al.*, 2004; Schubert, 2008). A pesar de que después de una exposición a luz alta, existe una reducción del F_v/F_m asociada a una reducción a la evolución de O_2 , en algunos casos no es del todo lineal (Schubert, 2008). Por lo tanto una evaluación simultánea de la fluorescencia de la clorofila y la evolución de O_2 es necesaria, pues dan una imagen completa de la regulación de la fotosíntesis (Maxwell y Johnson, 2000).

La estimación del transporte de electrones (TE) del fotosistema I al fotosistema II en los cloroplastos ha recibido especial atención, ya que una relación lineal con la evolución de O_2 permitiría estimaciones de productividad más rápido de lo que comúnmente se realizan. Para algunas macrofitas marinas, se ha demostrado una relación lineal con la evolución de O_2 principalmente en irradiancias por debajo de la saturación, pero ha resultado ser dependiente de la historia de luz del individuo, metodología utilizada o niveles CO_2 disueltos (Beer *et al.*, 2000; Franklin y Badger, 2001; Longstaff *et al.*, 2002; Figueroa *et al.*, 2003). Para ACG no existe ningún estudio que demuestre el efecto de la temperatura en la relación entre la evolución de oxígeno y el transporte de electrones.

En México, solo para el rodolito *Lithophyllum margaritae* se conocen las tasas fotosintéticas y de crecimiento y ambas son reguladas por la temperatura (Steller *et al.*, 2007). Por otro lado, se han descrito mecanismos de fotoprotección de rápida disipación de calor, pero de lenta recuperación después de condiciones lumínicas altas para algunas de las ACG (Schubert, 2008). Considerando que para entender la abundancia y supervivencia de las ACG es necesario comprender los factores que regulan la fisiología

fotosintética, así como su respuesta a variaciones de irradiancia y temperatura bajo condiciones controladas, en este estudio se evaluó el metabolismo fotosintético en relación a la irradiancia y temperatura utilizando la evolución de O₂ y el F_v/F_m de manera simultánea en las ACG. Por otro lado, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la relación fotosíntesis bruta y el transporte de electrones. Finalmente, se realizó una estimación de su crecimiento en condiciones de campo.

II.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de material

Muestras de *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix asperigillum* se recolectaron en la zona intermareal de Punta Morro, Ensenada, Baja California, México. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Botánica Marina del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Se eliminaron epifitos así como invertebrados asociados de las muestras. Los ejemplares fueron colocados en contenedores de 1L con agua marina filtrada y aeración constante para promover la circulación del agua. Los experimentos se realizaron en un tiempo máximo no más 24h después de la recolecta.

Evolución de oxígeno

La fotosíntesis de las ACG se evaluó con métodos polarimétricos. La evolución de O₂ se evaluó en función de la irradiancia y se utilizaron electrodos tipo Clark (Rank Brothers, Inc., Cambridge, Reino Unido) en segmentos de tejido de aproximadamente 2-

2.5 gr PH. La calibración de los electrodos se realizó al agitar una muestra de agua de mar filtrada para saturarla de oxígeno y registrar su voltaje. Posteriormente, se burbujeo nitrógeno para liberar todo el oxígeno y el voltaje fue registrado. Todas las mediciones se realizaron en cámaras selladas de 5 mL. Se utilizó un termocirculador para mantener la temperatura constante, después de un periodo de preincubación en la oscuridad (0.5-1 h). Como fuente de luz se utilizaron lámparas de halógeno (Quartzline 150 W) en un intervalo de flujo de fotones de 0 a 960 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que fue variado con filtros de densidad neutra (Lee filters, Osram, Reino Unido). La respiración se evaluó en oscuridad. Para obtener el peso seco de las muestras, el tejido fue deshidratado en una estufa a 60 °C, hasta obtener peso constante. La evolución de oxígeno y la respiración se evaluó entre los 10 y 35°C. El resultado se expreso como curvas fotosíntesis irradiancia. A los datos obtenidos de las curvas, se les ajustó el algoritmo no lineal descrito en Webb *et al.* (1974): $P = P_{\text{max}} (1 - e^{(-\alpha I / P_{\text{max}})}) - R$, en donde, P es la fotosíntesis a la irradiancia (I), α es la eficiencia fotosintética, P_{max} es la fotosíntesis máxima y R es la respiración. Además se calculó el coeficiente subsaturación E_k ; medida de la cantidad de luz necesaria para saturar la fotosíntesis, por medio de la razón: P_{max} / α .

Fluorescencia

La fluorescencia *in vivo* del fotosistema II (PSII) se determinó con un fluorómetro sumergible de pulso de amplitud modulada (DIVING PAM, Walz, Alemania / PAM 2000). La fluorescencia basal (F_0) se determinó después de una incubación en oscuridad (aproximadamente 0.5 h). Un pulso saturante de luz actínica (9000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 800 ms) se aplicó para obtener la máxima fluorescencia (F_m)

en los tejidos aclimatados a oscuridad. La fluorescencia variable (F_v) se obtuvo por la diferencia entre F_m y F_o y la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m) es la proporción F_v a F_m (Schreiber *et al.*, 1994). La eficiencia cuántica efectiva del PSII (Φ_{PSII} , $\Delta F/F_m'$) se determinó en el tejido bajo condiciones de luz, de acuerdo a la fórmula descrita por Schreiber y Neubauer (1990): $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t)/F_m'$, en donde F_m' es la fluorescencia máxima del tejido en luz inducida por un pulso saturante de luz actínica y F_t es el estado basal estabilizado intrínseco del tejido.

Crecimiento

Para evaluar el crecimiento en condiciones de campo, se utilizó la tinción rojo de alizarin a una concentración 0.25gL^{-1} en agua de mar filtrada. Muestras de alga fueron sumergidas en la tinción por 24h con aeración constante. Después, los talos fueron adheridos en rocas con goma epoxica y se dejaron en campo para su posterior recuperación. Las algas recapturadas se secaron a la sombra y se llevaron al laboratorio. El crecimiento se determinó como la elongación de los ápices y se evaluó al buscar la marca del colorante en los talos con ayuda de un microscopio estereoscópico. La marca de alizarin representa el punto de crecimiento antes de iniciado el periodo de incubación en campo. La longitud medida se interpretó como el crecimiento nuevo y se normalizó por el tiempo para obtener la tasa de crecimiento.

Diseño experimental

Para determinar el efecto de la irradiancia y temperatura sobre la fotosíntesis en *B. orbigniana*, *C. officinalis* var. *chilensis* y *L. asperigillum*, se evaluó la evolución de

oxígeno a 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C y se utilizó una $n = 4$ para cada especie. Las muestras se colocaron en las cámaras de incubación después de una preincubación de 30-60 minutos en la temperatura experimental. Antes de iniciar los experimentos, se burbujeo nitrógeno para mantener los niveles de oxígeno entre el 20%. Los filtros utilizados para variar la irradiancia se colocaron frente a la fuente de luz. Cada irradiancia experimental duró entre 5-10 minutos. El peso seco de las muestras se estimó como se menciona anteriormente.

Para evaluar el efecto de la luz alta sobre la fotosíntesis de las ACG, se evaluó simultáneamente el F_v/F_m y evolución de O_2 antes y después de una incubación de 30 min. a $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en segmentos de tejido de *B. orbigniana* y *C. officinalis var. chilensis*. Las cámaras de incubación de los electrodos de O_2 se utilizaron para este experimento. Antes de aplicar el tratamiento se midió en oscuridad la respiración, P_{max} (en $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y la respiración de nuevo. Los valores de F_v/F_m se obtuvieron como se mencionó anteriormente con un fluorómetro portátil (PAM 2000) sin embargo, después de la adaptación en oscuridad se aplicó un pulso de rojo lejano (Far red, 5s, para evitar los estados de transición, ver Schubert, 2008) y después de 5 min. en oscuridad se obtuvo el F_v/F_m . Después de aplicado el tratamiento, éstos parámetros fueron estimados de nuevo. En este experimento, se establecieron dos controles, 1) oscuridad y 2) luz tenue ($15 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Estos diseños fueron dependientes, en donde el mismo segmento de tejido fue evaluado antes y después del tratamiento. Los experimentos se realizaron a 20°C y cada tratamiento se replicó 6 veces. El peso seco de las muestras se estimó como se describió anteriormente.

Para evaluar la recuperación de los parámetros F_v/F_m , F_o , F_v y F_m se expusieron por una hora a $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ muestras de *B. orbigniana* y *C. officinalis var. chilensis*. Después del tratamiento, se estimó la recuperación de éste parámetro en luz tenue durante 11h en intervalos de una hora. Los valores de F_v/F_m se estimaron como se menciona anteriormente. Solo antes de obtener el primer valor y después de la exposición se aplicó un pulso de rojo lejano al tejido (5s). La fibra óptica del fluorómetro se colocó entre 1-2 mm del tejido y se utilizaron clips auxiliares que mantenían la fibra óptica fija con respecto al tejido. Los experimentos se realizaron a 20°C , se utilizó una $n = 6$ y fue dependiente.

Para determinar el efecto de distintas intensidades lumínicas sobre los parámetros de la fluorescencia (F_o , F_t , F_m , F_m' , F_v/F_m) y su posterior comportamiento en oscuridad, segmentos de tejido *B. orbigniana* y *C. officinalis var. chilensis* fueron incubados por una hora a 250; 500; 1000 y $1800 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectivamente. Antes de la exposición, durante y por 30 minutos en oscuridad, se aplicó un pulso de saturación cada tres minutos para obtener el $F_v/F_m / \Delta F/F_m'$, con un fluorómetro portátil (Diving PAM). Para el valor inicial y el primero después de aplicado el tratamiento se aplicó un pulso de rojo lejano (5s). Los experimentos se realizaron a 20°C .

Para evaluar la relación entre la evolución de oxígeno y el transporte de electrones (TE) con respecto a la temperatura, se realizaron mediciones simultáneas de la evolución de O_2 y fluorescencia de la clorofila a 10, 15, 20, 25, 30 y 35°C ($n=4$). Los valores de obtenidos de la evolución de O_2 de las curvas fotosíntesis irradiancia (fotosíntesis bruta= fotosíntesis neta + respiración), fueron utilizados para

correlacionarlos con los valores de TE. Las estimaciones simultáneas fueron hechas al introducir la fibra óptica del fluorómetro portátil sumergible (Diving-PAM) en las cámaras de oxígeno a un ángulo de 45° del tejido. Los valores de $\Delta F/F_m$, fueron determinados después de haber obtenido la evolución de O₂ en de cada irradiancia experimental. El TE se estimó a partir de la siguiente fórmula: TTE = ($\mu\text{mol electrones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) = $AQ_\lambda \cdot 0.05 \Phi_{\text{PSII}}$, en donde AQ_λ , es la absorptancia, calculada como el producto del espectro de irradiancia integrada entre 400-700 nm; 0.05 es un factor de corrección el cual asume la misma cantidad de irradiancia que el PSII y PSI y Φ_{PSII} , es la eficiencia cuántica efectiva del PSII.

Para obtener el valor de absorptancia del tejido, se realizó una aproximación por medio de la transmitancia (T, fracción de luz transmitida por el tejido). Para ello, muestras de tejido fueron colocadas encima de un sensor PAR 2 π conectado a un radiómetro portátil (LI-1400, LI-COR, Lincon, Nebraska, E.U.) y fueron expuestas a un 100% de luz incidente. La fracción transmitida resultante, fue corregida por la absorptancia ($A=1-T$). A este valor obtenido, se le hizo una corrección, al realizar el mismo experimento, pero con algas no pigmentadas (CaCO₃)

Para estimar las tasas de crecimiento en el campo, muestras de *C. officinalis var. chilensis* fueron teñidas con rojo de alizarin de acuerdo a lo descrito con anterioridad. Aproximadamente >30 ejemplares fueron teñidos y colocados en la zona intermareal entres los meses de octubre a marzo. Los ejemplares se recuperaron después de 15 días de incubación y el crecimiento se estimó como se describió con anterioridad.

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de la temperatura sobre los parámetros P_{\max} , α y E_k , se utilizaron pruebas *t*-student para muestras independientes pareadas entre temperaturas. Lo anterior se realizó para cada especie. (Zar, 1996). Para determinar el efecto de los tratamientos $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, oscuridad y $15 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sobre la evolución de oxígeno y el F_v/F_m , se aplicó una *t*-student para muestras dependientes (Zar, 1996). Para determinar diferencias significativas después de la exposición de $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sobre el F_v/F_m de las algas coralinas, se aplicó una prueba *t*-student para muestras dependientes después de aplicado el tratamiento así como solo en ciertas horas después de la recuperación contra el valor inicial (Zar, 1996). La relación entre la tasa de fotosíntesis bruta y transporte de electrones con respecto a la temperatura, fue determinada con el método de correlación de Pearson (Zar, 1996). Para determinar diferencias significativas entre las tasas de crecimiento por mes, fueron evaluadas con una *t*-student para muestras independientes (Zar, 1996). En todos los casos se probaron los supuestos de homocedasticidad de los datos para las combinaciones pareadas con una prueba F. En la mayoría de los casos, debido al tamaño de muestra, se realizaron pruebas análogas no paramétricas para corroborar el resultado (Wilcoxon para muestras dependientes ó independientes, dependiendo del caso). Para todas las pruebas α (α) fue establecido en 0.05, y todas las pruebas fueron de dos colas (Zar, 1996).

II.3 RESULTADOS

Se observó una variación de la fotosíntesis en relación a la temperatura e irradiancia para las algas coralinas geniculadas *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum* (Fig. 1). Las curvas fotosíntesis-irradiancia mostraron una tendencia similar a los cambios de temperatura (10-35°C). En general, se observó una saturación de las curvas fotosíntesis-irradiancia para todas las especies a aproximadamente 200-300 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La pendiente inicial de la curva fotosíntesis-irradiancia fue similar para las tres especies en la mayoría de las temperaturas utilizadas. Por otro lado, la fotosíntesis máxima para las tres especies se incrementó en relación a la temperatura, excepto a 35°C, en donde se observó un decremento.

Los parámetros fotosintéticos variaron en relación a las especies estudiadas y a las temperaturas experimentales (Fig. 2). La fotosíntesis máxima (P_{max}), para las tres especies, se incrementó con respecto a la temperatura hasta llegar a un valor máximo en 25°C para *B. orbigniana* y *C. officinalis* var. *chilensis* y a 30°C para *L. aspergillum* (Fig. 2A). Después de este máximo se observó un decremento, hasta alcanzar valores similares a los obtenidos a las temperaturas más bajas. En general, los valores de P_{max} fueron dos-veces más altos en *L. aspergillum*, que en *C. officinalis* var. *chilensis* y cuatro-veces más altos que en *B. orbigniana*. Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) para las tres especies entre cada uno de los valores de P_{max} con respecto a la temperatura (apéndice, Tabla I).

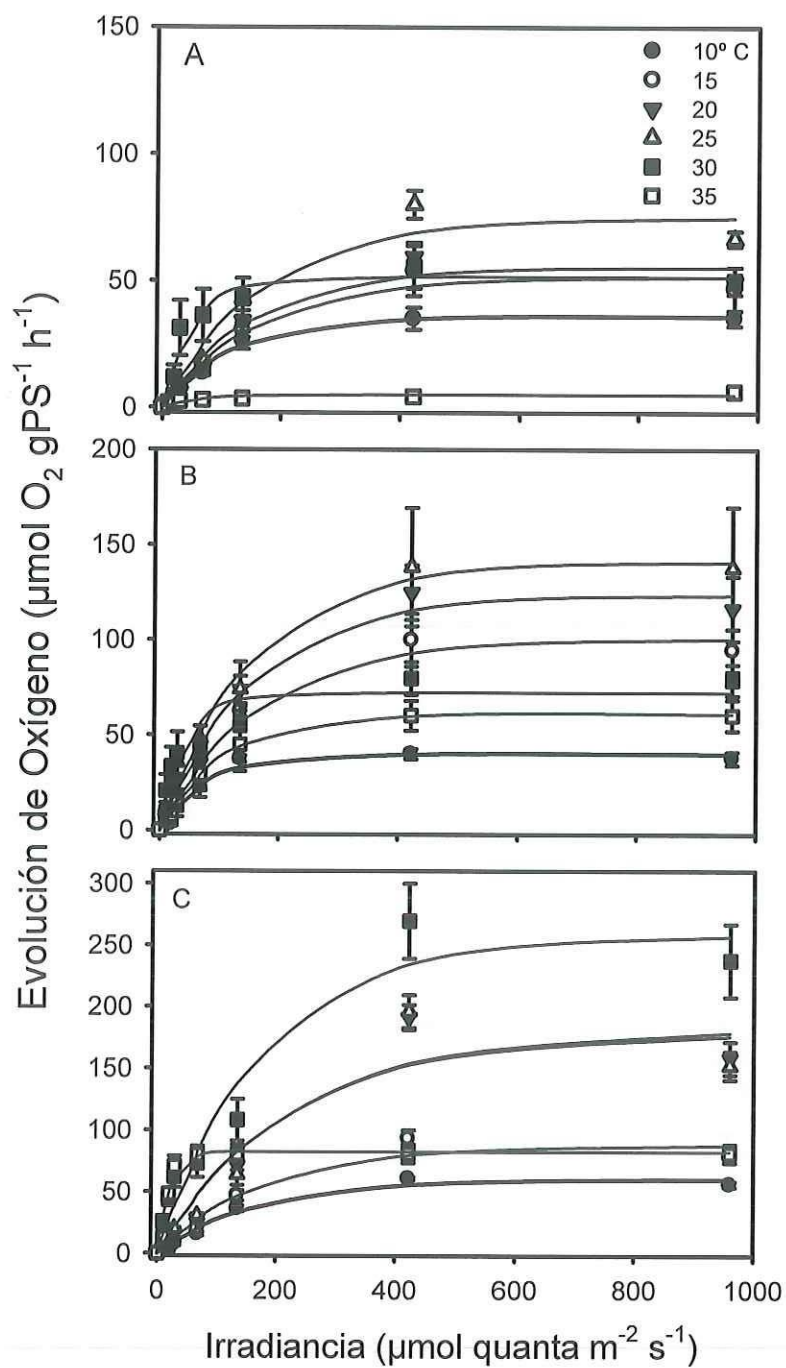


Figura 1.- Curvas fotosíntesis irradiancia con respecto a la temperatura (10-35°C). A, *Bossiella orbigniana*; B, *Corallina officinalis var. chilensis* y C, *Lithothrix aspergillum*.

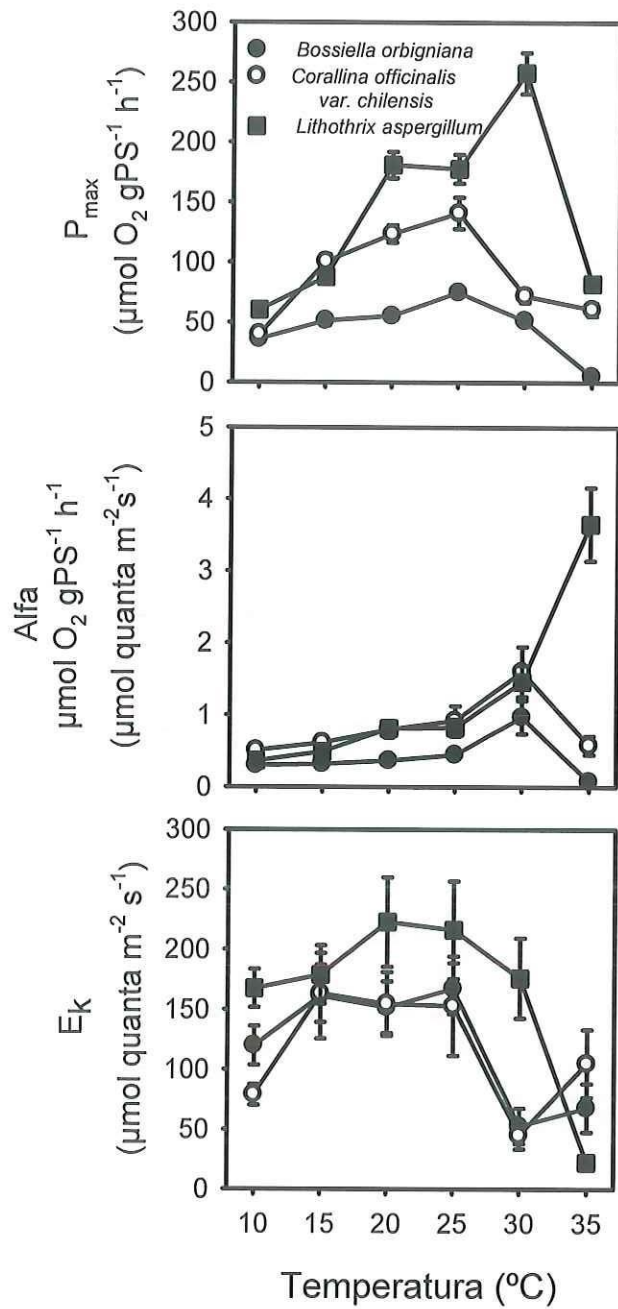


Figura 2.- Parámetros fotosintéticos obtenidos de las curvas P-E, para las algas coralinas geniculadas *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum*, con respecto a la temperatura. A, Tasa de fotosíntesis máxima (P_{max}); B, Pendiente inicial de la curva (α) y C, Coeficiente de subsaturación (E_k).

La pendiente inicial de la curva fotosíntesis irradiancia (α), mostro un ligero aumento a medida que la temperatura se incrementó, sin embargo este no fue pronunciado para ninguna de las tres especies (Fig. 2B). Los valores de α encontrados para las tres especies estudiadas fueron de aproximadamente $1 \mu\text{mol O}_2 \text{ gPS}^{-1} \text{ h}^{-1} (\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1})^{-1}$. El valor máximo de α se registro a los 30°C en Para *C. officinalis var. chilensis* y *B. orbigniana* mientras que en *L. aspergillum* el máximo valor fue a 35°C (incrementándose más de tres-veces en relación las otras dos especies). Con la excepción de los valores α a 30 y 35°C en *B. orbigniana* y *L. aspergillum*, no se observaron diferencias significativas ($P>0.05$) para el resto de las temperaturas y especies (apéndice, tabla II).

De una manera similar al P_{max} , el coeficiente subsaturación (E_k) mostró un incremento con respecto a la temperatura hasta alcanzar un valor máximo entre los 20 y 25°C (Fig 2C). Después de los valores máximos, se observó un decremento del E_k al incrementarse la temperatura. Además, éste parámetro fue el que presento mayor variación entre los valores promedio. Los valores E_k para *B. orbigniana* y *C. officinalis var. chilensis* fueron muy similares entres sí, con la excepción de las temperaturas extremas (10 y 35°C). *Lithothrix aspergillum*, aunque presentó tendencias similar a las otras especies, sus valores siempre fueron mayores (algunas veces del doble) con respecto a las demás especies. Los valores máximos de E_k , variaron para las tres especies y fluctuaron entre 230 - $160 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. De manera general, diferencias significativas fueron encontradas al comparar los valores de temperaturas altas (30 y 35°C) contra los valores de temperaturas más bajas, $<20^\circ\text{C}$ (apéndice, tabla III).

Las comparaciones simultaneas entre la evolución de oxígeno y la eficiencia cuántica máxima del PSII (F_v/F_m) en *C. officinalis var. chilensis* y *B. orbigniana*, mostraron un claro decremento bajo condiciones de luz alta. Mientras que el P_{max} , se redujo significativamente entre un 30% ($P < 0.05$), la reducción significativa del F_v/F_m ($P < 0.05$) fue de aproximadamente 75% aproximadamente de sus valores iniciales. En contraste con lo anterior, las muestras incubadas en oscuridad y luz tenue mostraron un incremento de entre el 10-20% de su valor inicial para P_{max} y F_v/F_m (Fig. 3). Sin embargo, los incrementos de estos valores no fueron estadísticamente significativos ($P > 0.05$, apéndice, tabla IV).

Después de una hora de luz alta ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-1} \text{s}^{-1}$), los valores del F_v/F_m , se redujeron un 80% ($P < 0.05$) de su valor inicial para *B. orbigniana* y *C. officinalis var. chilensis* (Fig. 4A, apéndice, tablas V y VI). Posteriormente, se observó un aumento del F_v/F_m del 25% aproximadamente de los valores iniciales en las primeras dos horas de recuperación. Estos valores fueron distintos significativamente respecto al obtenido después de la exposición, y mostraron una recuperación significativa. Progresivamente, este parámetro aumentó de manera similar en ambas especies. Después de 7 horas de recuperación los valores del F_v/F_m se recuperaron en un 80% del valor inicial para ambas especies. Mientras que en *C. officinalis var. chilensis* el valor del F_v/F_m a las 6 horas de recuperación fue igual a su valor inicial ($P > 0.05$), en *B. orbigniana* después de 11 horas de recuperación esto no fue visible (apéndice, tabla VI). Los parámetros derivados de la fluorescencia del mismo experimento mostraron que en *B. orbigniana* existió un decremento en F_m y solo un ligero aumento de éste a lo largo

de la recuperación. Por otro lado, F_o mostró un incremento después de la exposición y después de dos horas de recuperación alcanzó valores similares a los iniciales.

Finalmente, los valores de F_v se comportaron de manera similar a los de F_m (Fig. 4B).

Para *C. officinalis var. chilensis*, los valores de F_m siguieron el mismo patrón que en *B. orbigniana*, aunque con una recuperación más rápida. Por otro lado, tanto F_o como la F_v , se comportaron similares a *B. orbigniana* (Fig. 4C).

En *B. orbigniana* y *C. officinalis var. chilensis* se observó una variación de los parámetros F_t , F_m' y en la eficiencia cuántica efectiva ($\Delta F/F_m'$) después de aplicar distintas intensidades lumínicas que variaron desde los 250 a los 1800 $\mu\text{mol quanta m}^{-1} \text{s}^{-1}$ (Figs. 5, 6). En ambas especies se observó un comportamiento similar. En todos los casos el valor de F_m' , decreció casi 0.2 unidades inmediatamente después de iniciado el tratamiento lumínico. Progresivamente éste parámetro siguió decreciendo a lo largo del tratamiento (1h), pero su caída fue menos pronunciada. Con excepción del tratamiento de 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, los valores de F_m' en recuperación, no mostraron un aumento claro. Por otro lado los valores de $\Delta F/F_m'$, en las algas incubadas a 250 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ tienden a decrecer poco menos del 50% manteniéndose estables durante la incubación. Solo para *C. officinalis var. chilensis* se observó una tendencia al aumento minutos después de iniciado el tratamiento (Figs. 5A, 6A). Contrariamente en los tratamientos de intensidades mayores, éste parámetro disminuyó casi al 100% los primeros minutos y se mantuvo así durante toda la incubación (Figs. 5B, C, D y 6B, C, D). El parámetro F_v/F_m aumento 0.2 unidades después de terminado el tratamiento pero sin una recuperación posterior con la excepción de las algas incubadas en el tratamiento

de $250 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Finalmente, para ambas especies los valores de Ft se incrementaron poco después de iniciado el tratamiento con valores casi iguales a los de F_m . Lo anterior fue observado en todos los tratamientos con la excepción de los $250 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. En recuperación, éste parámetro decreció, hasta alcanzar valores similares (antes de iniciado el tratamiento).

Los valores obtenidos de absorptancia mostraron que en porcentaje, algas blanqueadas (*B. orbigniana*) transmitían el 15% de luz incidente. El valor final de absorptancia corregido por el de las algas blanqueadas fue de 0.14 ± 0.007 ($n=10$).

Los valores de evolución de oxígeno y el transporte de electrones (TE) variaron en relación a la temperatura e irradiancia para *B. orbigniana*, *C. officinalis var. chilensis* y *L. aspergillum* (Figs. 7, 8, 9). Para las tres especies, existió una correlación significativa ($P < 0.05$) desde los 10°C hasta los 30°C . Por el contrario, a 35°C esta correlación no fue significativa. El grado de correlación para las tres especies vario con respecto a la temperatura desde 0.70 a 0.93, siendo las correlaciones más altas entre los 20 y 30°C (con excepción de *B. orbigniana*, a los 10°C). De manera general para las tres especies se observó poca variación del modelo lineal a irradiancias bajas (por debajo de los $5 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, después de la saturación se observó la mayor variación del modelo en donde existió un aumento del transporte de electrones, pero una saturación del oxígeno. En todas las temperaturas y para las tres especies los valores del TE estuvieron por debajo de los $30 \mu\text{mol e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, mientras que los valores de oxígeno estuvieron por debajo de $0.1 \mu\text{mol O}_2 \text{ gPS}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y se obtuvo como resultado una pendiente de la relación por encima del valor teórico de 4.

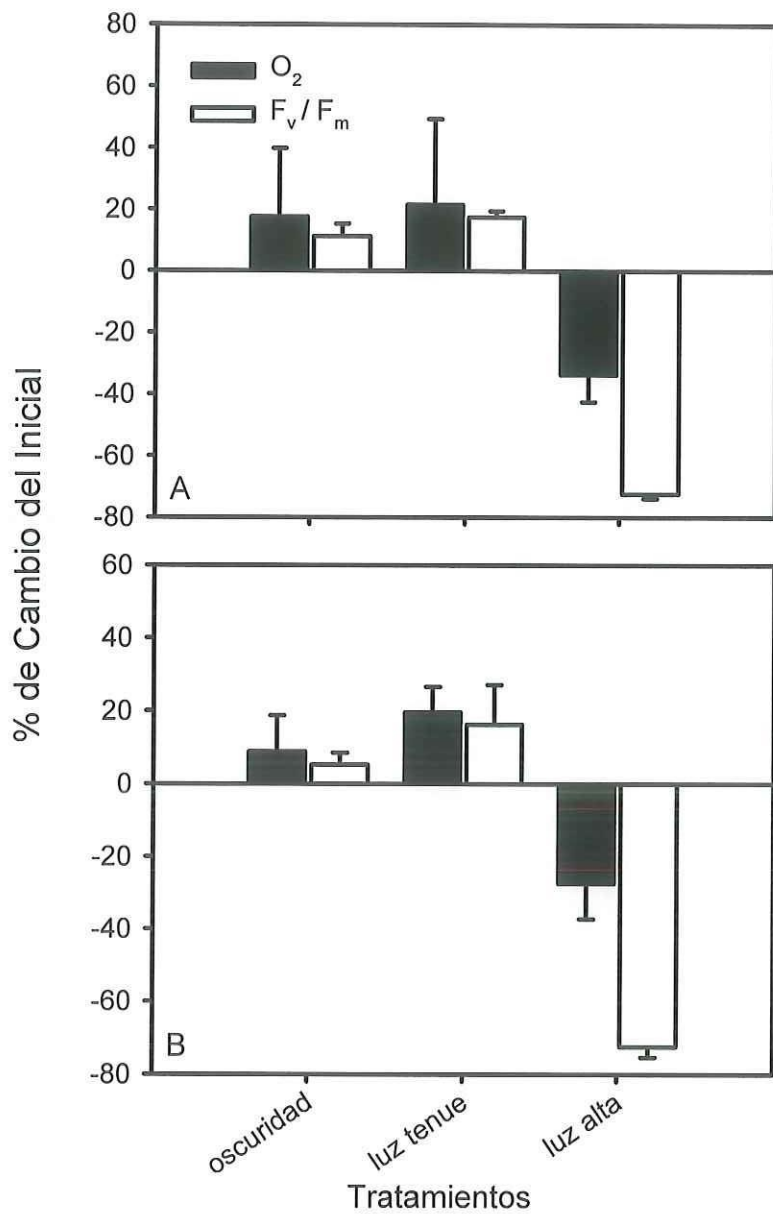


Figura 3.- Efecto de los tratamientos oscuridad, $15 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz tenue) y $1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (luz alta) sobre la evolución de oxígeno y F_v/F_m después de 30 minutos, expresado como porcentaje de cambio del inicial. A, *Bossiella orbigniana*; B, *Corallina officinalis var. chilensis*.

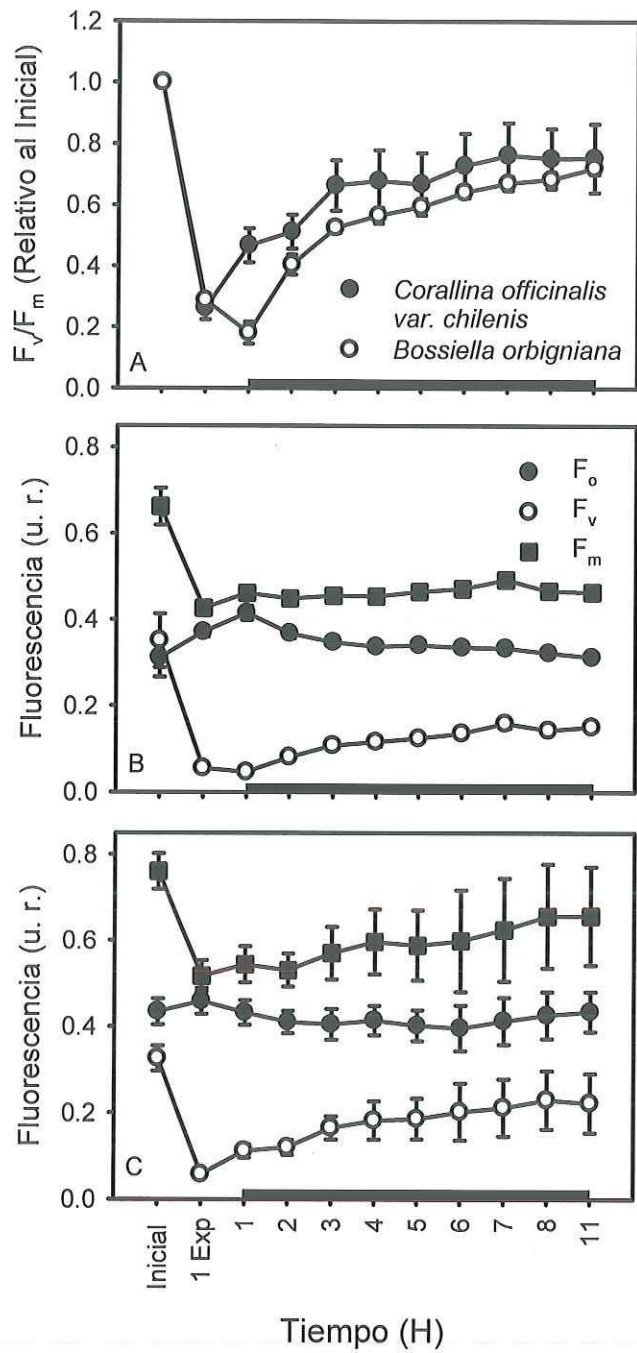


Figura 4.- Efecto de luz alta ($1000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por una hora sobre la fotosíntesis de las algas coralinas y su recuperación en *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis* var. *chilensis*. A, expresado como F_v/F_m ; B, seguimiento de los parámetros F_0 , F_m y F_v del mismo experimento en *Bossiella orbigniana*; C, igual al anterior pero en *Corallina officinalis* var. *chilensis*. Las barras negras horizontales representan el tiempo en recuperación.

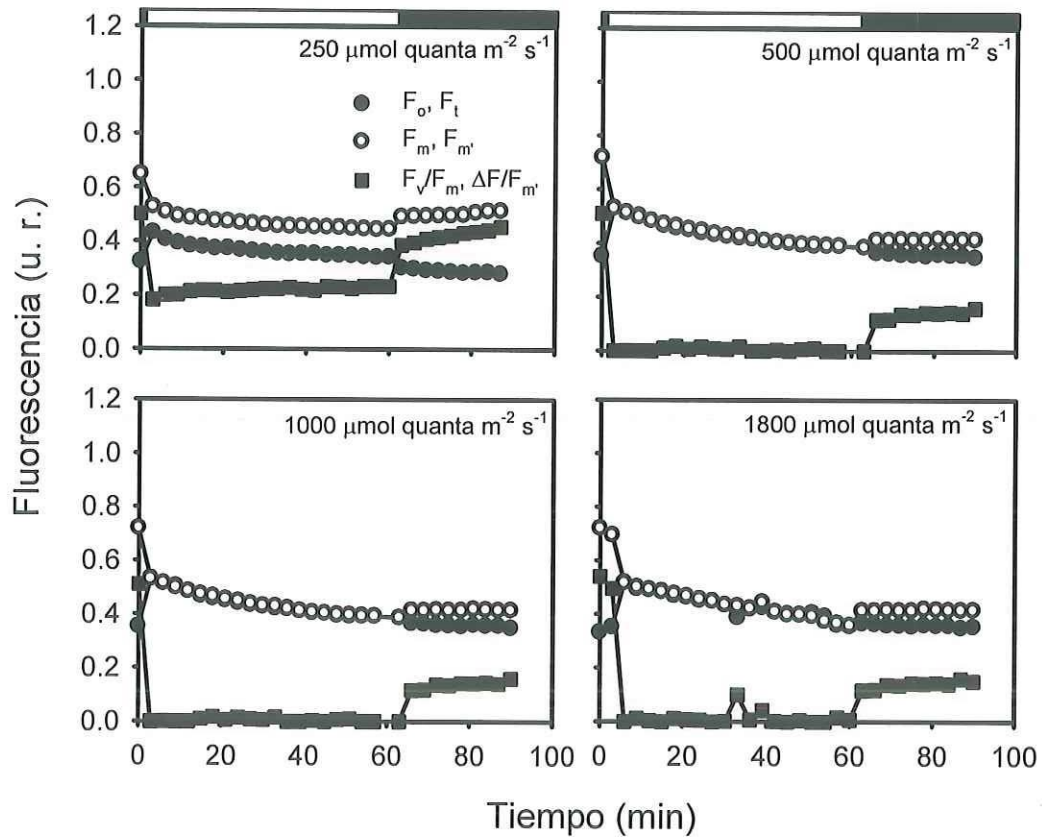


Figura 5.- Efecto y recuperación de los parámetros F_0 , F_t , F_m , F_m' y F_v/F_m , $\Delta F/F_m'$ después de 1h a 250, 500, 1000 y 1800 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Bossiella orbigniana*. Las barras en negro indican oscuridad (recuperación), las barras claras indican el tratamiento lumínico.

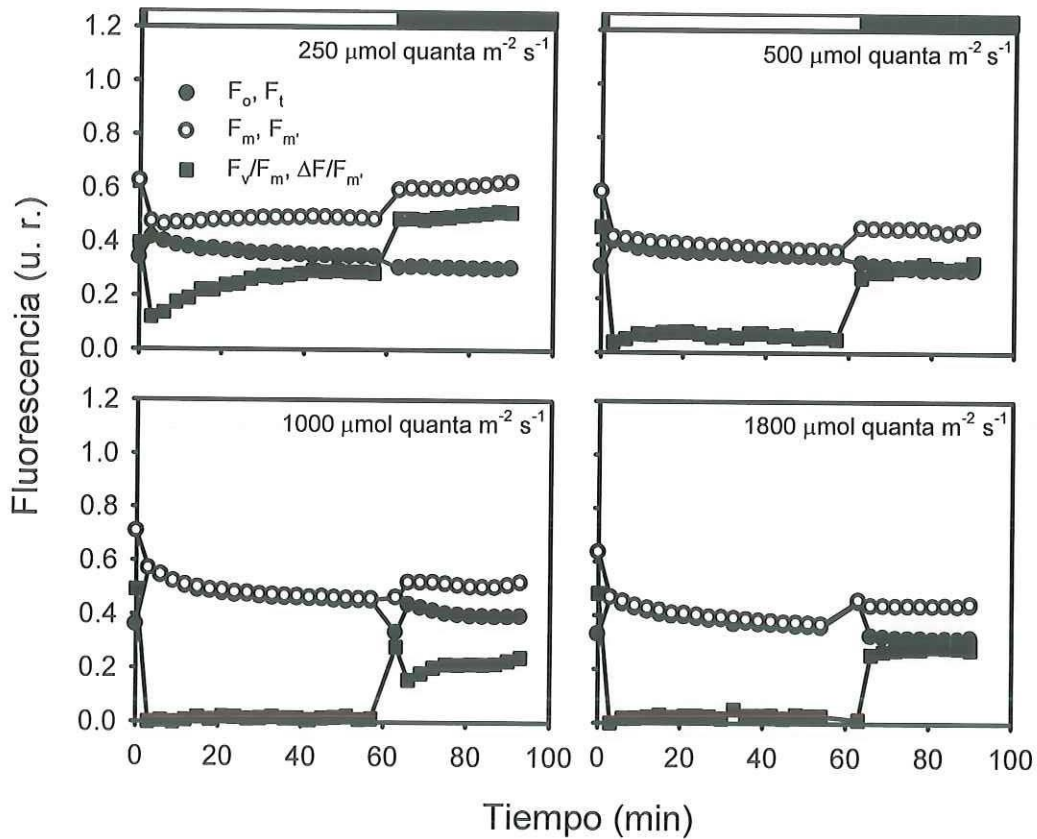


Figura 6.- Efecto y recuperación de los parámetros F_o , F_t , F_m , $F_{m'}$ y F_v/F_m , $\Delta F/F_{m'}$ después de 1h a 250, 500, 1000 y 1800 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *Corallina officinalis var. chilensis*. Las barras en negro indican oscuridad (recuperación), las barras claras indican el tratamiento lumínico.

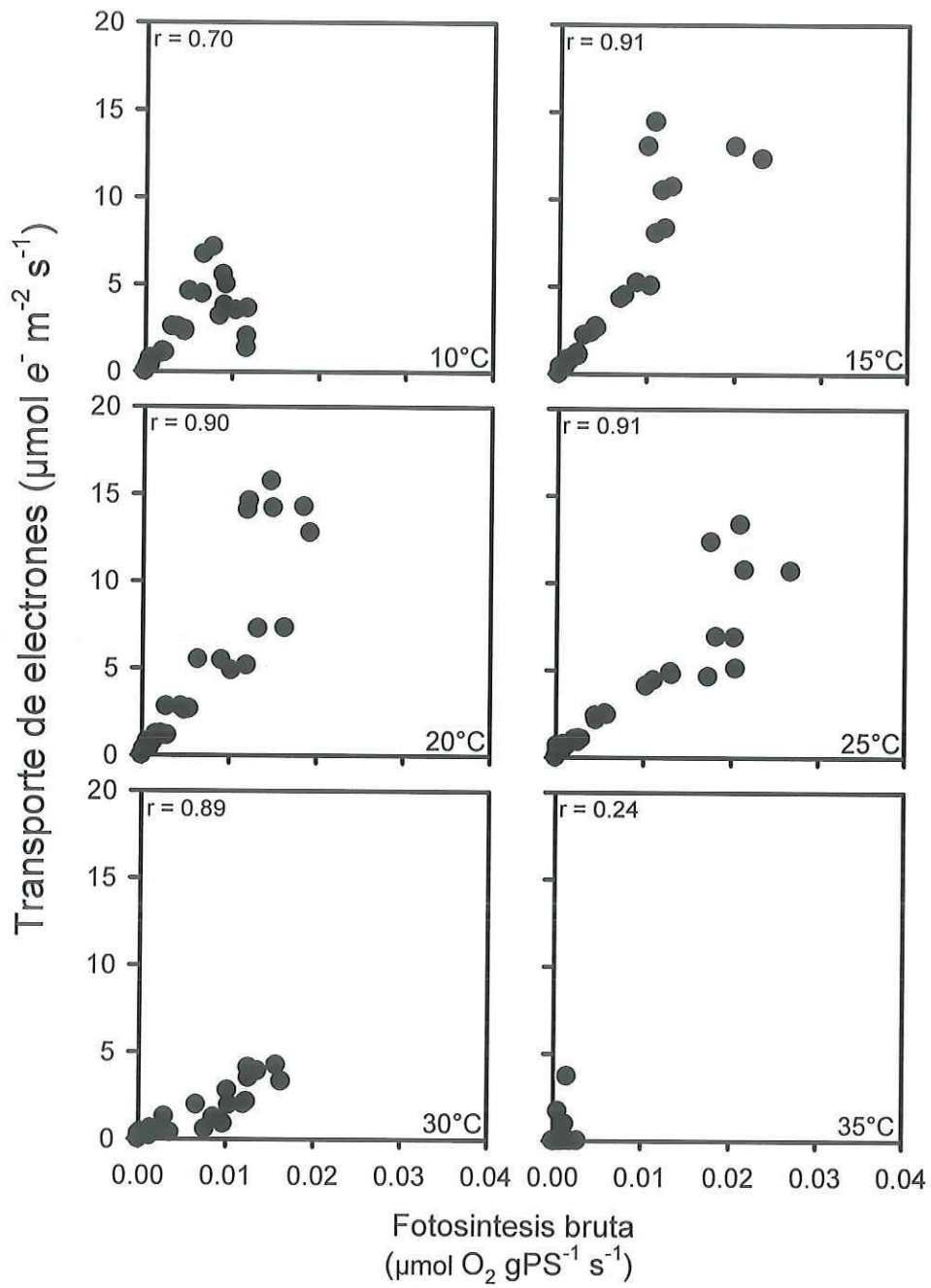


Figura 7.- Efecto de la temperatura (10-35°C) sobre la relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones en *Bossiella orbigniana*.

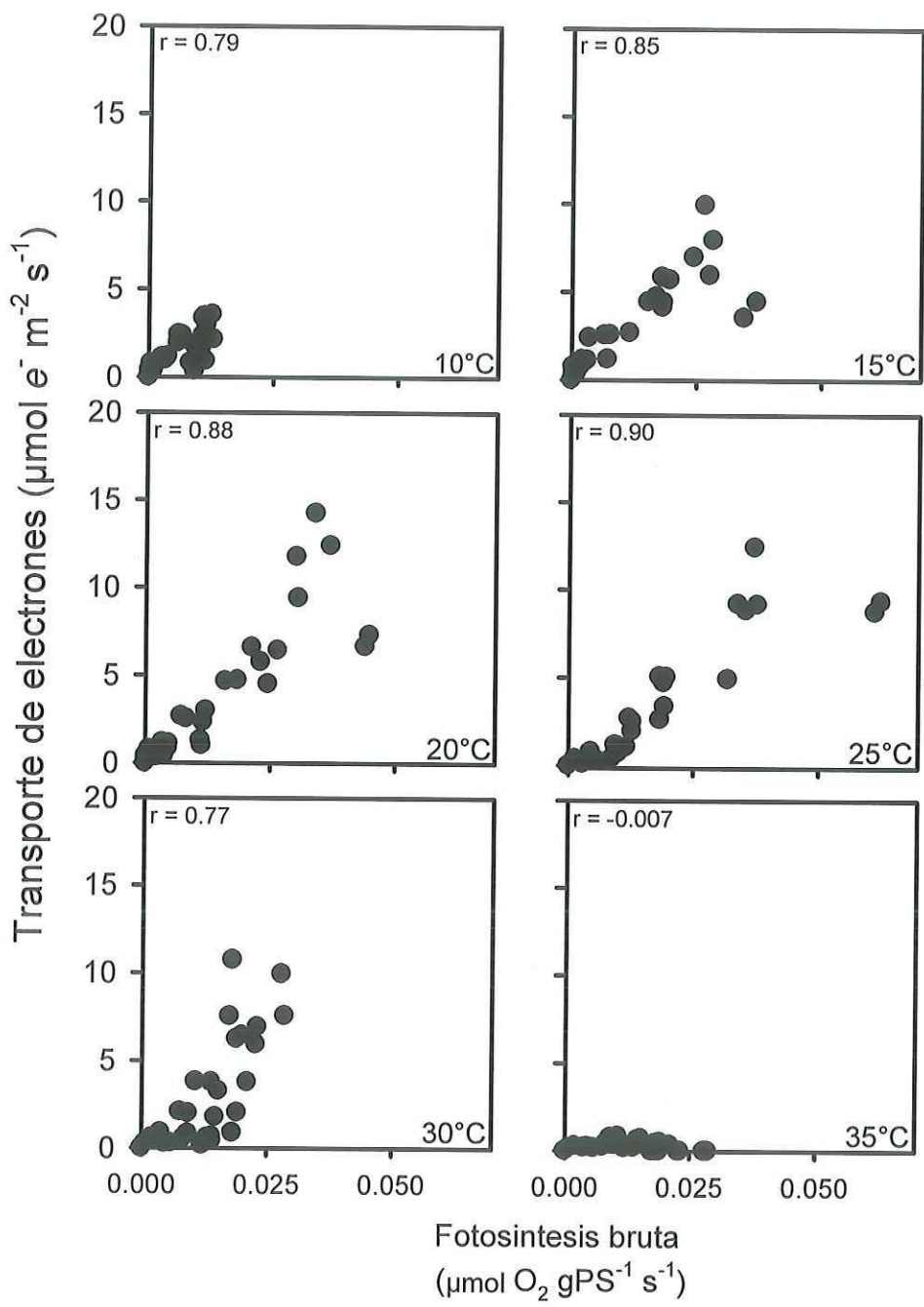


Figura 8.- Efecto de la temperatura (10-35°C) sobre la relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones en *Corallina officinalis var. chilensis*.

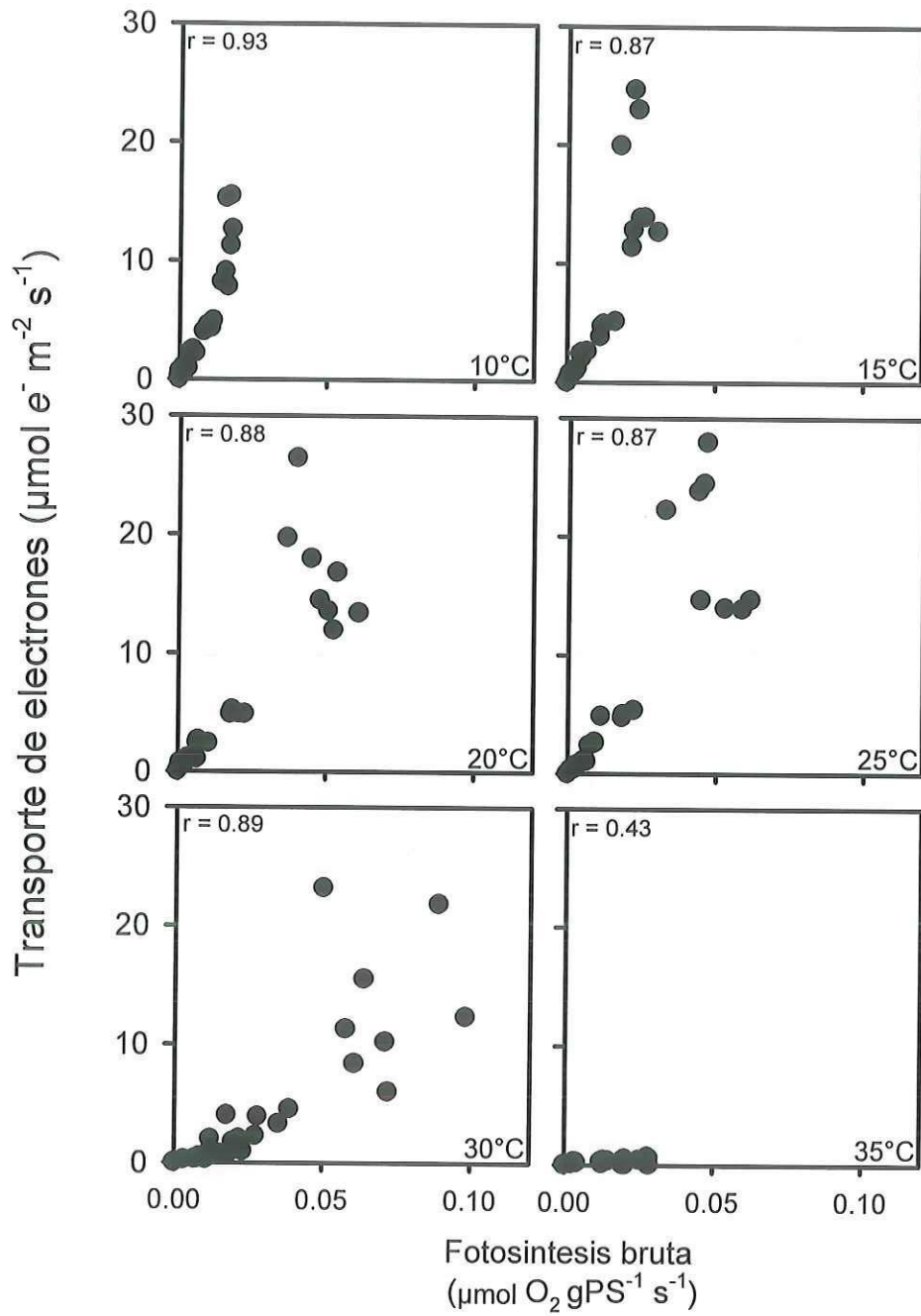


Figura 9.- Efecto de la temperatura (10-35°C) sobre la relación fotosíntesis bruta y transporte de electrones en *Lithothrix aspergillum*.

Se observó una variación en las tasas de crecimiento obtenidas en campo para *Corallina officinalis var. chilensis*. Las tasas de crecimiento observadas en para esta especie noviembre ($1.98 \pm 0.03 \text{ mm mes}^{-1}$) fueron significativamente ($P < 0.05$) más altas con respecto a las de marzo ($1.13 \pm 0.04 \text{ mm mes}^{-1}$, apéndice, Tabla VII).

II.4 DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron que la fotosíntesis en las ACG es regulada por la temperatura. Además, se demostró que los valores de F_v/F_m son buenos estimadores de de estrés lumínico y existe una regulación del aparato fotosintético a irradiancias altas mediante una recuperación lenta, asociada principalmente a una fotoinactivación, una disipación de calor lenta y a un fotodaño, respectivamente.

Las ACG estudiadas mostraron el típico efecto de la irradiancia sobre la fotosíntesis, consistente para otros grupos algales (Cabello-Pasini *et al.*, 2000; Cabello-Pasini *et al.*, 2003; Schubert, 2008). La actividad fotosintética en todas las temperaturas, sugiere una alta tolerancia térmica de estas algas, resultado de una adaptación a la zona tan variante que habitan. Por otro lado, la disminución de la actividad a los 10 y 35°C probablemente indique sus límites de tolerancia térmicos. La influencia de la temperatura en P_{max} refleja que en estas condiciones, existe una limitación de la actividad enzimática que regula la fijación de carbono el cual depende del reservorio de enzimas disponibles y de la velocidad de éstas para procesar más energía. Un aumento en la temperatura, permite que más NADPH y ATP sean utilizados en la fijación de carbono. Los valores más altos (25-30°C), sugieren que estas algas producen más carbono orgánico y crecen más en verano (temperatura superficial del agua de mar para la bahía de 18-22°C, Espinosa-Carreón *et al.*, 2001). Aunque éstos valores se encuentran por arriba de la temperatura más alta para la zona, están en relación con la variación y valores altos de la zona intermareal (i. e. pozas de marea). En comparación a otras algas coralinas (rodolitos), las ACG presentaron tasas de fotosíntesis mayores (más del doble),

más bajas en relación a otras algas verdes no calcificantes y similares a algas rojas y otras ACG (Cabello-Pasini *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2006; Steller *et al.*, 2007; Schubert, 2008). La poca variación de α , es probable que se deba a que este parámetro está influenciado por la eficiencia de las reacciones fotoquímicas. En consecuencia, se vería afectada por una aclimatación a luz (tipo y cantidad), o a la cantidad de clorofila, lo cual no fue explorado. Además provenían de la misma zona (mismo régimen lumínico). Los valores de E_k , están en función del P_{max} y fueron similares a los reportados para ACG intermareales y algas no coralinas (Cabello-Pasini *et al.*, 2003; Schubert, 2008). En general, las ACG estudiadas presentaron un comportamiento fotosintético similar en relación a la irradiancia y temperatura, lo cual sugiere estrategias similares para habitar la zona. Las mayores diferencias encontradas en el P_{max} , fueron probablemente a diferencias morfológicas como el grosor del talo.

La disminución encontrada bajo luz alta en P_{max} puede ser consecuencia de una fotoinactivación reversible en donde los centros de reacción del PSII cesan temporalmente, pero no existe un fotodaño (Gorbunov *et al.*, 2001). En ambos casos, la inactivación continúa reflejaría un decremento en la pendiente inicial de la curva fotosíntesis irradiancia, ya que está en función del número de centros de reacción activos. Si éstos siguen inactivándose, llega un momento en donde la tasa de transferencia de electrones no aumenta, entonces, la saturación de la fotosíntesis se mueve al sistema de reacciones fotoquímicas y como consecuencia una reducción en P_{max} (Falkowsky y Raven, 1997; Behrenfeld *et al.*, 1998). Un fotodaño, es más evidente, pues está en relación un decremento en P_{max} y depende de la tasa de síntesis de D1. A

pesar de que una inhibición fue encontrada, esta solo fue entre el 30-40% del valor inicial, lo cual sugiere, que existió una fotoinactivación reversible y que su capacidad inicial se recuperaría rápido ($< 1H$). Aún cuando la recuperación del P_{max} , no fue estimada, la fotoinactivación reversible ya ha sido reportado para las ACG en condiciones altas de luz (Schubert, 2008). En algunos otros casos reducciones en los valores de P_{max} , se asocian un aumento en la respiración o fotorespiración (Herbert y Waaland, 1988; Henley *et al.*, 1991) pero este no fue el caso para las algas de éste estudio. La disminución drástica y mayor del F_v/F_m , sugiere que los mecanismos de reducción de éste, no se encuentran asociados a la evolución de O_2 (Bose *et al.*, 1988; Schubert, 2008). Esta disminución, representa mecanismos de regulación y protección que decrecen la capacidad fotosintética (eficiencia cuántica) y elevan la disipación de calor. En las ACG, esto se pudo asociar a una disipación de calor alta por medio de carotenoides como la anteraxantina directamente sobre los centros de reacción pero no 100% eficiente y puede funcionar como mecanismo a largo plazo y no a corto (i. e. ciclo de las xantofilas; Schubert, 2008). Es claro que independientemente del mecanismo, la reducción de los parámetros fue el resultado de estrés lumínico como mecanismos regulación del aparato fotosintético. Lo anterior se observa más claro en los controles, los cuales no presentaron reducción de ninguno de los parámetros estudiados. Esta recuperación indica que bajo condiciones no estresantes, hay mecanismos de reparación/disipación que se encuentran activos (i. e. síntesis de D1). Lo anterior también puede ser corroborado al medir la dinámica de recuperación del F_v/F_m , que indica los que han alterado la eficiencia fotoquímica. En experimentos similares, se ha hecho una diferenciación de fases (rápida y larga) en la reducción y recuperación del

F_v/F_m . Ambas representan mecanismos distintos y la contribución de cada una puede ser medida según sus proporciones (Hanelt, 1998; Schubert, 2008). En los experimentos realizados, no se observan las fases del decremento, pero en la recuperación, ambas fases son claras. Aun cuando la fase rápida es evidente (3h) y fue más lenta comparada con otras algas coralinas (aprox. 100 min, Schubert, 2008), la tendencia es similar a lo reportado por el mismo autor, dominando una fase lenta. Ésta usualmente se asocia a un fotodaño, siendo necesaria la síntesis de D1 para la recuperación (Maxwell y Johnson, 2000). No obstante, al utilizar inhibidores de síntesis de D1 (cloranfenicol), Schubert (2008) encontró en ACG, que ésta dinámica no se asocia al fotodaño. Contrariamente, se relacionó a un mecanismo de protección prolongado; una rápida y alta inducción al NPQ con una disipación sostenida (horas). En contraste con lo anterior, Häder *et al.* (1997) y Häder *et al.* (2003), encontraron un mecanismo rápido de recuperación para los morfotipos de luz y lo contrario en los de sombra para *C. elongata* y *C. officinatis*.

Los parámetros de la fluorescencia por otro lado, mostraron un comportamiento típico para la mayoría de los estudios. Una reducción del F_m' debido a un NPQ, el cual fue el mayor causante del decremento en el F_v/F_m . Sin embargo después del tratamiento, parte de la reducción fue debido a un aumento en F_o , y puede ser explicado en términos de fotoinhibición (Williams y Allen, 1987; Maxwell y Johnson, 2000) o contribución a la señal de fluorescencia por parte de los ficobilisomas o estados de transición (Campbell, 1998, ver más adelante). Independientemente del mecanismo de regulación de estas algas (inactivación reversible, disipación de calor sostenida y/o fotodaño) existe un decremento en los valores de F_v/F_m y evolución de O_2 y al menos para el F_v/F_m , éste

es sostenido. Esta recuperación lenta, en su hábitat natural puede ser negativo, pues una perturbación sostenida (i.e. marea viva) puede ocasionar un fotodaño. Sin embargo lo anterior no ha sido del todo demostrado en campo para estas algas (ver Häder *et al.*, 1997 y Häder *et al.*, 2003).

En distintas condiciones de luz, la reducción drástica del $\Delta F/F_m'$, fue en parte por un decremento del F_m' debido a un aumento al NPQ (Maxwell y Johnson, 2000). Con la excepción de los $250 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la reducción de la F_v , se asocia más a un incremento en F_t (que en algunos casos iguala a F_m') y no indica necesariamente que la eficiencia fotoquímica este al mínimo. Lo anterior está relacionado a características particulares de algas rojas, como los estados de transición o la presencia de ficobilisomas (ver más adelante). Bajo irradiancias altas, éste parámetro debe ser utilizado con cautela pues puede sobreestimar.

Los resultados obtenidos en la relación transporte de electrones y fotosíntesis bruta, mostraron un incremento lineal en todo el intervalo de temperaturas utilizadas excepto a 35°C . De manera general, ambos parámetros aumentaron medida que la temperatura se incremento. Lo anterior es consistente con algunos trabajos reportados. Por ejemplo, Silva *et al.*, (1998), encontró un mismo incremento del transporte de electrones y la evolución de oxígeno en *Gelidium sesquipedale* de distintas profundidades (< profundidad, > temperatura y > TE y O_2). Lo anterior está en función de que la maquinaria fotosintética tiene más capacidad de procesar energía, al aumentar la temperatura.

La pendiente inicial de la relación FB y TE (datos no mostrados) está por encima del valor teórico de 4 mol e⁻ por 1 mol O₂ evolucionado (i.e. hasta 20 e⁻ por menos de una molécula de O₂). La normalización hecha para la O₂ pudo haber sido la causante de lo anterior, pues esta fue hecha por peso debido al método y morfología de estas algas como para normalizar por área. La normalización correcta aumentaría la tasa de fotosíntesis y una probablemente una pendiente cercana al valor teórico, no obstante el grado de correlación no variaría mucho. Sin embargo, existen otros factores que puedan influir en una sobrestimación del transporte de electrones. El TE representa el flujo dependiente del PSII de electrones bruto, mientras que la evolución de O₂ representa la fotosíntesis neta (menos las pérdidas), además los electrones pueden ser utilizados en la respiración, sobre todo a irradiancias altas (Masojidek *et al.*, 2001). La obtención correcta del TE requiere del valor de la eficiencia cuántica efectiva ($\Delta F/F_m$). Éste asume que la disipación de calor solo ocurre en la antena, que la señal de la fluorescencia no es afectada significativamente por otros sistemas, y que no hay cambios en el área de absorción (Genty *et al.*, 1989, discutido en Masojidek *et al.*, 2001). Sin embargo en algas rojas y cianobacterias, una antena compuesta por ficobilisomas que puede movilizarse al PSI (estados de transición) y cambiar el área de absorción, la fluorescencia de los ficobilisomas y el PSI (debido a su proporción con respecto al PSII) pueden contribuir a la señal de F₀ y los centros de reacción pueden disipar calor (Campbell, 1998; Masojidek *et al.*, 2001). No obstante, se ha sugerido al menos para cianobacterias, que esta influencia puede ser casi nula en la estimación del TE, aunque para las algas rojas esto no se ha demostrado (Masojidek *et al.*, 2001). Además, Beer y Axelsson (2004), sugieren que el correcto cálculo del TE, está limitado por un valor

crítico del $\Delta F/F_m$ (<0.1) pues en *U. lactuca*, *Palmaria palmata*, *P. umbilicalis*, *Fucus serratus* y *Laminaria saccharina*, existió un decremento del TE en la saturación de O_2 y una pérdida de la correlación. Valores cercanos a este límite, fueron encontrados principalmente en irradiancias altas. Finalmente, la fórmula para obtener el TE requiere de un cálculo correcto de la absorptancia. Los métodos adecuados para el cálculo de este factor no pudieron ser utilizados debido a la complejidad y tamaño de las muestras. Aunque el valor obtenido es muy bajo en relación a otras especies (Franklin y Badger, 2001; Beer y Axelsson, 2004) puede ser razonable con su metabolismo lento. Además, se ha sugerido que puede cambiar en la misma muestra, en talos de más de una capa de células (Franklin y Badger, 2001).

La mayor variación del modelo lineal (saturación) puede explicarse en términos de protección del aparato fotosintético. Bajo saturación, es necesario que vías alternas para el consumo de electrones procesados por el PSII (sumideros de electrones) estén disponibles. Estas vías, pueden representar un 20% del TE neto del PSII al PSI. En especies como *P. lecuosticta*, se explicó por una heterogeneidad en la población de PSII y activación de vías alternas por luz preferencial, debido a distintas irradiancias (cantidad y calidad) existiendo un decremento en la antena y un transporte cíclico vía PSI (Figuroa *et al.*, 2003). El TE cíclico en el PSII, explicó la variabilidad de la correlación en *U. australis*, *P. columbina* y *Zonaria crenata*, en irradiancias altas y limitación de C_i (Franklin y Badger, 2001). Este transporte cíclico sucede cuando el reservorio de plastoquinonas se encuentra reducido y la parte donadora del PSII se encuentra inhibida (i.e. no pueda donar electrones del H_2O), entonces existe un

transporte cíclico de electrones vía Qb / feofitina– Cyt b- P680, que reduce de nuevo a P680, sin ningún efecto sobre la evolución de O₂ (Prasil *et al.*, 1996; Franklin y Bagder, 2001). La reacción de Mehler explica esta pérdida en cianobacterias y algas verdes (Masojidek *et al.*, 2001; Cabello-Pasini y Figueroa, 2006). En esta, el PSI, vía ferredoxina dona electrones al O₂ y forma radicales superóxido, convertidos rápidamente a peróxidos y como resultado un consumo de O₂ (Masojidek *et al.*, 2001). La reducción de nitrato, explica en parte la discrepancia en *U. rigida* y *U. rotundata* (Figueroa *et al.*, 2003; Cabello-Pasini y Figueroa, 2004). La fotorespiración en plantas vasculares y algas que carecen de mecanismos de concentración de carbono (MCC), han explicado lo anterior, en condiciones altas de O₂ (Masojidek *et al.*, 2001; Edwards y Baker, 1993). Debido al tipo de experimentos realizados, es imposible adjudicar a un proceso la pérdida de la correlación, aunque la fotorespiración puede descartarse pues se utilizaron concentraciones bajas de O₂, y una anhidrasa carbónica está presente en las ACG (capítulo III). Los resultados obtenidos muestran que el TE, puede ser un estimador razonable de la fotosíntesis sobre todo en irradiancias bajas, pues aumenta proporcionalmente a la evolución de oxígeno. No obstante, puede estar sobrestimado por una sobrestimación del $\Delta F/F_m$, y de la absorptancia. Por otro lado, si se pretende estimar una tasa fotosintética, la evolución de oxígeno puede ser un mejor indicador. Finalmente, en condiciones lumínicas altas, cuando el oxígeno se encuentra saturado, el TE que no es un buen indicador de la fotosíntesis.

Las tasas de crecimiento en este estudio para *C. officinalis var. chilensis* son consistentes con lo reportado en la literatura para la misma especie y similares, aunque

mayores en relación a algas coralinas no geniculadas (Steller *et al.*, 2007). La técnica utilizada, puede ser buen estimador del crecimiento en estas algas (Andrake y Johansen, 1980; Rivera *et al.*, 2004; Steller *et al.*, 2007). Sin embargo el crecimiento estimado fue elongación apical y refleja además la incorporación de CaCO₃. No obstante, como método rápido y en condiciones de campo es eficiente, sobre todo en sistemas protegidos. Las diferencias encontradas en términos de elongación son pequeñas si se comparan con otras algas coralinas. Por ejemplo para el rodolito *L. margaritae*, se encontró una diferencia tres-veces mayor en dos estaciones (verano e invierno) y se le atribuyo a la temperatura dicha diferencia (Steller *et al.*, 2007). A pesar de que la temperatura no fue medida, pudo haber influido en las distintas tasas de crecimiento. A mayor temperatura, estas algas presentan una mayor tasa fotosintética y las temperaturas promedio para la Bahía de Ensenada son mayores en Noviembre en relación a Marzo (Peña-Manjarrez *et al.*, 2005). Además, tampoco se puede descartar una diferencia por efecto del herbivorismo, desarrollo de partes blandas (geniculas) ó extensión lateral.

CAPÍTULO III. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CALCIFICACIÓN EN LAS ALGAS CORALINAS GENICULADAS

III.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha demostrado que algunos ecosistemas dominados por algas calcáreas rojas (orden Corallinales) influyen en los flujos de carbono, debido a su fotosíntesis, respiración y principalmente sus tasas de calcificación (Benssousan y Gattuso, 2007; Martin *et al.*, 2007). Por ejemplo, el ecosistema mediterráneo dominado por *Corallina elongata*, se consideró un sumidero de CO₂ atmosférico con una autotrofia neta de 15 mmol CO₂ m⁻²d⁻¹. Además, se determinó una tasa de calcificación del ecosistema de 8 mmol CaCO₃ m⁻² d⁻¹ (Benssousan y Gattuso, 2007). No obstante, la importancia de estas algas coralinas en ecosistemas marinos así como las tasas de calcificación para muchas especies se desconocen y resulta difícil inferir cual es el papel que juegan en el ciclo del carbono.

Durante la calcificación, la precipitación de 1 mol de CaCO₃ reduce por dos moles la alcalinidad total (A_T). Por lo tanto, disminuciones de la A_T en presencia de algas calcáreas, han sido utilizadas como estimaciones indirectas de la calcificación (El Haikali *et al.*, 2004; Kangwe, 2006; Benssousan y Gattuso, 2007; Martin *et al.*, 2007; Steller *et al.*, 2007). Además, la determinación de los cambios de alcalinidad se considera como un método no destructivo, con suficiente resolución y practico en experimentos de corto plazo (Chisholm y Gattuso, 1991).

La calcificación en el medio acuático es definido mediante la ecuación $\text{Ca}^{++} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$, pues la mayor parte de carbono inorgánico disponible se

encuentra en forma del HCO_3^- (McConnaughey y Whelan, 1997). Para el caso de las algas coralinas, la ecuación anterior implica la entrada de iones HCO_3^- a la célula, pues su mecanismo de calcificación es regulado por una matriz orgánica (i. e. pared celular), la cual regula la precipitación (calcificación “trans”) a diferencia de otras algas calcificantes que no necesariamente requieren la entrada de estos iones (Borowitzka, 1987; McConnaughey y Whelan, 1997). Sin embargo, para entrar en la célula, el HCO_3^- requiere de su conversión a CO_2 de manera natural (protonación), por transporte activo (proteínas transportadoras) o por medio una anhidrasa carbónica (AC) externa (Granbom y Pedersen, 1999). Los mecanismos anteriores son denominados mecanismos de concentración de carbono (MCC) y se relacionan a la fotosíntesis, pues su principal función es proveer a la enzima Ribulosa 1-5 bifosfato carboxilasa-oxigenasa (RubisCO) un ambiente rico en CO_2 . Sin embargo, en algas calcificantes el CO_2 también es sustrato para la calcificación. Probablemente el MCC más común sea la AC, cuya función es acelerar enzimáticamente la conversión de HCO_3^- a CO_2 más rápido de lo que comúnmente sucede en condiciones normales. La AC, ha sido reportada para muchas especies de macroalgas incluidas algas rojas y verdes (Haglund *et al.*, 1992; Granbom y Pedersen, 1999; Björk *et al.*, 1992; Axelsson *et al.*, 1995). Aunque se ha sugerido que las algas coralinas son utilizadoras de HCO_3^- , no se conoce el mecanismo de incorporación de éste ion (Borowitzka, 1987).

En México solo se conocen las tasas de calcificación del rodolito *Lithophyllum margaritae* y se demostró que estas tasas están reguladas por la temperatura (Steller *et al.*, 2007). En las costas mexicanas del Pacífico, las ACG se encuentran bien

representadas en la zona intermareal, sin embargo, sus tasas de calcificación se desconocen. Además, se ha sugerido que presentan un componente metabólico (luz) y uno independiente del mismo (oscuridad). Por lo anterior, el objetivo de este capítulo fue estimar las tasas de calcificación en las ACG en función de la temperatura en luz y oscuridad, pues una fuerte influencia de este parámetro indicaría que la calcificación es un proceso regulado metabólicamente. Además, se investigó si existe una AC externa que sea utilizada por las algas coralinas geniculadas como un mecanismo de concentración de carbono.

III.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de material

Muestras de *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum* se recolectaron en la zona intermareal de Punta Morro, Ensenada, Baja California, México. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Botánica Marina del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC). Se eliminaron epifitos así como a invertebrados asociados de las muestras. Posteriormente las muestras, fueron colocadas en contenedores de 1L con agua marina con aeración constante para promover la circulación del agua. Todos los experimentos fueron realizados después de aclimatar el tejido a la temperatura experimental por una noche.

Relación entre peso seco y peso húmedo

Muestras de *B. orbigniana*, *C. officinalis var. chilensis* y *L. aspergillum* ($n \geq 50$) fueron secadas con una toalla absorbente para remover el exceso de agua y fueron pesadas en una balanza electrónica para obtener el peso húmedo. Posteriormente las muestras se secaron en una estufa a 60°C hasta obtener peso constante. La materia orgánica seca del tejido se obtuvo al agregar HCl al 10% a las muestras en vasos de precipitados previamente pesados para descalcificarlas. El ácido fue agregado varias veces hasta que el CaCO_3 fue eliminado totalmente. El exceso de ácido fue removido por decantación y el material orgánico enjuagado con agua destilada. De manera similar al peso seco, la materia orgánica seca se obtuvo al secar las muestras hasta obtener peso constante (>24H). La cantidad de CaCO_3 seco se estimó de la diferencia entre el peso seco y el peso de la materia orgánica seca

Calcificación

La calcificación de las algas coralinas se estimó por medio de la técnica de alcalinidad total (Chisolm y Gattuso, 1991). El fundamento del método asume que la alcalinidad total (A_T) disminuye en dos equivalentes por cada mol de CaCO_3 precipitado. Las determinaciones de alcalinidad fueron realizadas titulando agua de mar filtrada incubada en una cámara sellada de 30 mL con HCl 0.1M. La titulación se utilizó para protonar las especies de carbono inorgánico ($\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$) y convertir las bases disueltas en ácido carbónico (H_2CO_3). Una computadora conectada a un potenciómetro el cual se encontraba en la cámara, registró los cambios de pH y el volumen de ácido

agregado. Por medio de la primer derivada se calcularon los valores de la A_T , en relación a los valores de pH, en donde se registraron los puntos de inflexión de cambio de las especies de carbono inorgánico (HCO_3^- y H_2CO_3). Los cálculos se realizaron en el software MATLAB. La cámara, el potenciómetro y la integral, son descritas en Hernández-Ayón *et al.* (1999).

Inhibidor de anhidrasa carbónica externa

Se utilizó el inhibidor acetazolamida (AZ) para inhibir la presencia de una anhidrasa carbónica externa (AC). El inhibidor se agregó al medio de incubación en dos concentraciones finales $100\mu\text{M}$ y $700\mu\text{M}$ en agua de mar filtrada. Una vez en el medio de incubación, la muestra era incubada y se esperó por lo menos 10 minutos antes de empezar las mediciones.

Diseño experimental

Para determinar el efecto de la temperatura en la calcificación se realizaron incubaciones de tejido de *C. officinalis var. chilensis* y *B. orbigniana* en agua de mar filtrada en a 10, 15, 20 y 25°C . Además, estas incubaciones se realizaron en condiciones de luz saturante ($300 \mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y en oscuridad. En las incubaciones se utilizó aproximadamente 8gr PH de tejido en frascos sellados de 1L con aeración constante para promover la circulación del agua. Para mantener la temperatura constante a lo largo de los experimentos, los frascos fueron colocados en incubadores a las temperaturas experimentales. De un stock de agua de mar filtrada se tomaba una muestra inicial y los frascos de 1L fueron llenados. Después de 8h de incubación, se tomaron muestras de 50

ml. Tanto a la muestra inicial como a la final se les determinaba la A_T como se describió anteriormente. El cambio en alcalinidad total en el agua de mar fue convertido a μg de CaCO_3 fijado mediante la siguiente fórmula: calcificación ($\mu\text{mol gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$) = $\Delta A_T \cdot v \cdot (2 \cdot \text{PS} \cdot \Delta t)^{-1}$ en donde ΔA_T es el cambio de alcalinidad total entre la muestra inicial y final, v es el volumen de incubación, PS es el peso seco de la muestra y Δt es el tiempo de incubación. Los pesos secos de las muestras se estimaron de acuerdo a la metodología descrita anteriormente. Todas las incubaciones fueron replicadas seis veces.

Para determinar el efecto del inhibidor acetazolamida sobre la fotosíntesis y calcificación se realizaron tres distintos experimentos. Muestras de tejido de *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis var. chilensis* fueron incubadas en las cámaras para medir la evolución de oxígeno (cap II). Las mediciones se efectuaron estimando la tasa de fotosíntesis máxima (P_{max} a $500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) antes y después de agregar el inhibidor. En estos experimentos, se utilizó una concentración final de AZ a $100 \mu\text{M}$. Un control fue establecido sin inhibidor y se realizaron seis replicas por tratamiento (inhibidor y control).

Para demostrar el efecto de la AZ en la calcificación, se realizaron las mismas incubaciones para determinar la A_T como se describió anteriormente en muestras *B. orbigniana* y *C. officinalis var. chilensis*. A diferencia de los experimentos anteriores, este diseño fue independiente en donde solo se comparó el efecto final del inhibidor sobre la tasa de calcificación en relación a un control (sin inhibidor). Se realizaron dos experimentos iguales en donde solo cambio la concentración del inhibidor $100 \mu\text{M}$ y

700 μ M). Estos experimentos fueron replicados tres veces y realizados en condiciones de saturación de luz.

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de la temperatura sobre las tasa de calcificación se realizaron pruebas *t*-student pareadas para muestras independientes, para ambas especies. La misma prueba fue realizadas para los valores de calcificación en oscuridad (Zar, 1996). Para determinar el efecto del inhibidor AZ en la fotosíntesis de las algas coralinas se realizó un estadístico *t*-student para muestreas dependientes para probar el efecto después del tratamiento (Zar, 1996). Finalmente para determinar el efecto inhibidor AZ en la calcificación de algas coralinas, se probaron diferencias entre el control y el experimento con una prueba *t*-student para muestras independientes (Zar, 1996). En todos los casos se probaron los supuestos de homocedasticidad de los datos para las combinaciones pareadas con una prueba F. Para la mayoría de los casos debido al tamaño de muestra, se realizaron pruebas análogas no paramétricas para corroborar el resultado (Wilcoxon para muestras dependientes ó independientes, dependiendo del caso). Para todas las pruebas alfa (α) se estableció en 0.05 y todas las pruebas fueron de dos colas (Zar, 1996).

III.3. RESULTADOS

La proporción entre peso húmedo a peso seco varió en promedio entre 1.45-1.72, para *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum*, y fue mayor para ésta última. Por otro lado, el contenido promedio de CaCO₃ de estas especies varió entre 81-83% en talos secos. Además la proporción entre el peso seco y la materia orgánica seca varió entre 5.52-6.08 aproximadamente para las tres especies, y fue mayor para *C. officinalis* var. *chilensis* y menor para *B. orbigniana* (Tabla III)

Los resultados mostraron en ausencia de algas coralinas que no existieron fluctuaciones en la alcalinidad del agua de mar al utilizar aeración constante durante 8 h (Fig. 10A). Además, se observó una disminución de la alcalinidad del agua de mar lineal cuando muestras de *B. orbigniana* y *C. officinalis* var. *chilensis* fueron incubadas hasta por 8h (Fig. 2B). Una vez establecida esta disminución lineal durante las primeras 8 h de incubación, éste tiempo fue utilizado para todos los experimentos.

Se observó una variación en las tasa de calcificación con respecto a la temperatura en luz para *B. orbigniana* y *C. officinalis* var. *chilensis* (Figs. 11A, B). En *B. orbigniana* se observó un incremento en la tasa de calcificación a medida que la temperatura se incrementó, con una tasa máxima a los 25 °C (casi tres-veces mayor que lo observado a 10°C). De manera similar, para *C. officinalis* var. *chilensis*, se observó un incremento con la temperatura, sin embargo éste no fue tan pronunciado y el valor máximo se registró a los 20°C con un decremento posterior a los 25°C. Bajo estas condiciones, las tasas de *C. officinalis* var. *chilensis* la mayoría de las veces fueron dos-

veces mayor que para *B. orbigniana* (excepto a 25 °C). De manera general, las tasas de calcificación fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las temperaturas para ambas especies, con algunas excepciones (apéndice, tabla VIII).

En contraste con lo observado en las incubaciones de luz, en general las tasas de calcificación de ambas especies, no mostraron cambios significativos en las temperaturas ($P > 0.05$, apéndice, tabla IX). La mayoría de las veces, las tasas de calcificación en oscuridad fueron dos-veces menores que las observadas en luz. Mientras que para *B. orbigniana* los valores oscilaron entre 1-2 $\mu\text{mol de CaCO}_3 \text{ gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$, los valores de *C. officinalis var. chilensis*, se mantuvieron relativamente constantes en 2 $\mu\text{mol de CaCO}_3 \text{ gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$ a lo largo de las temperaturas experimentales. La proporción de la calcificación luz:oscuridad, para ambas especies, en donde no mostró ningún patrón con respecto a la temperatura, con valores oscilando entre 1.7 y 3.3 para ambas especies (tabla IV).

Tabla III.- Relación entre los pesos húmedos, pesos secos, contenido de CaCO₃ y materia orgánica seca para las algas coralinas estudiadas.

Especie	PH : PS	CaCO ₃ PS (%)	MOS (%)	PS : MOS	n
<i>Bossiella orbigniana</i>	1.59 ± 0.031	82.46 ± 1.16	17.53 ± 1.16	5.52 ± 0.29	50
<i>Corallina officinalis</i> <i>var. chilensis</i>	1.45 ± 0.07	83.07 ± 3.08	16.07 ± 3.08	6.08 ± 1.01	62
<i>Lithotrix aspergillum</i>	1.72 ± 0.25	81.5 ± 3.9	18.45 ± 3.9	5.62 ± 1.07	62

MOS, materia orgánica seca.

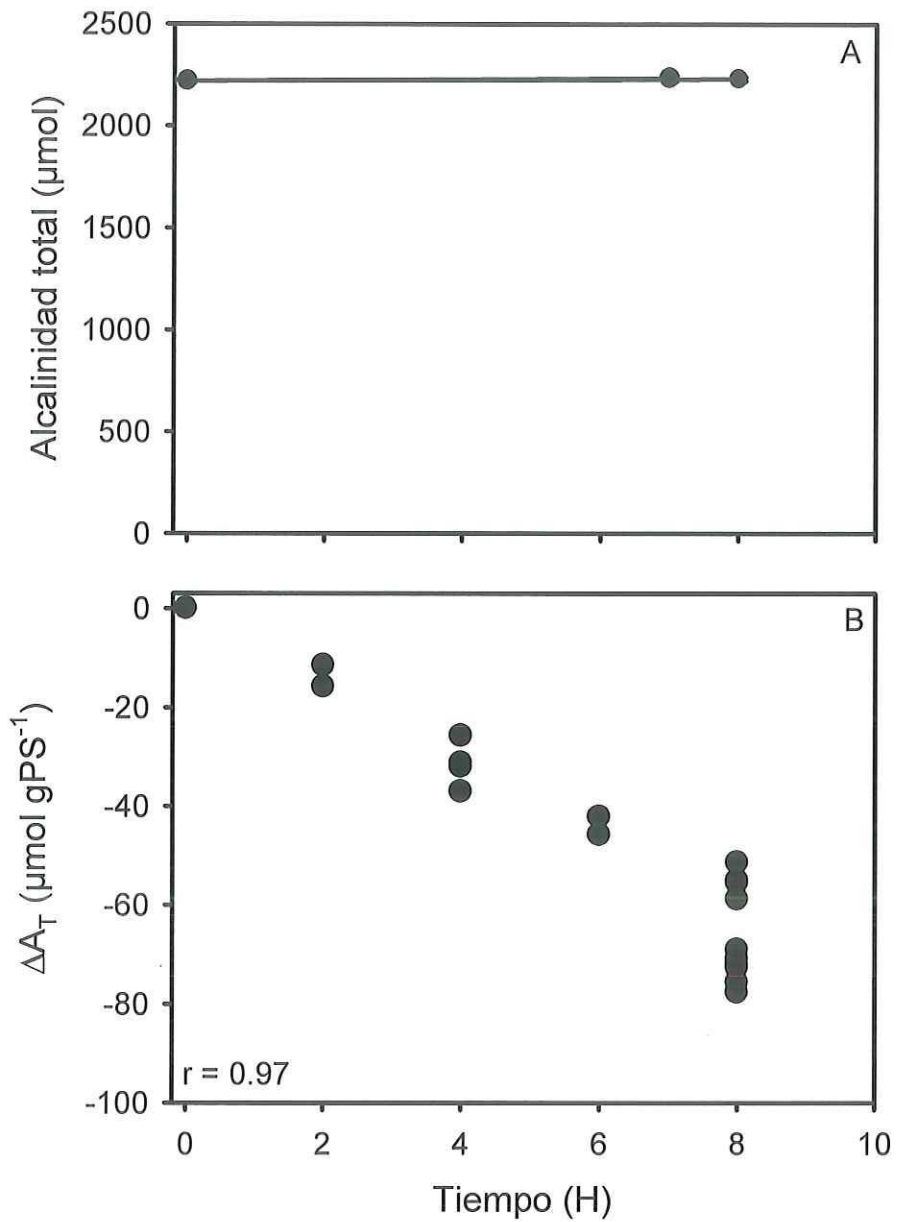


Figura 10.- Cambios de la alcalinidad total en incubaciones de 8h. A, control del método, agua de mar filtrada con aeración contante; B, parte lineal de la disminución de la alcalinidad total acumulada, normalizada por gramos de peso seco en *Bossiella orbigniana*.

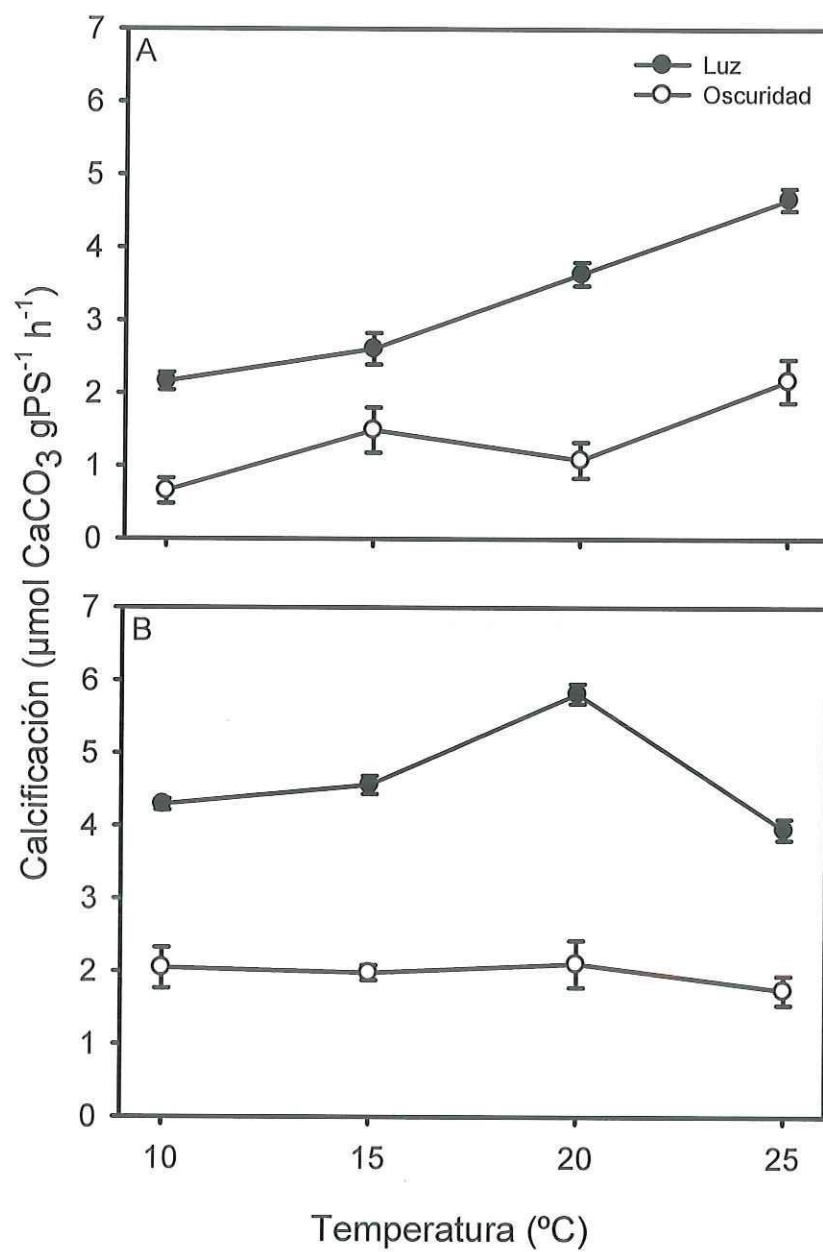


Figura 11.- Efecto de la temperatura en luz y oscuridad sobre la tasa de calcificación. A, *Bossiella orbigniana*; B, *Corallina officinalis var. chilensis*.

Tabla IV.- Proporción entre la calcificación en luz y oscuridad para las algas coralinas geniculadas

Temperatura (°C) / Especie	<i>C. officinalis var. chilensis</i>	<i>B. orbigniana</i>
10	3.29	2.10
15	1.75	2.30
20	3.35	2.77
25	2.19	2.27

Al aplicar el inhibidor acetazolamida se encontró que las tasas de fotosíntesis máxima disminuyeron significativamente un 60% aproximadamente de su valor inicial para ambas especies ($P < 0.05$). De manera contraria, se observó un aumento del P_{max} , en los controles del 20-30% (Fig 12, apéndice, tabla X). Por otro lado, se encontró una disminución de las tasas de calcificación por efecto del mismo inhibidor al utilizar las concentraciones de 100 y 700 μM . Al utilizar una concentración de 100 μM , la calcificación de *C. officinalis var. chilensis* disminuyó un 30% con respecto al control ($P < 0.05$), mientras que la tasa de calcificación de *B. orbigniana* solo disminuyó un 10% ($P > 0.05$) con respecto al control. Al aumentar la concentración del inhibidor (700 μM) las tasas de calcificación se inhibieron más del doble con respecto a los experimentos anteriores. Para ambas especies estos decrementos fueron significativos ($P < 0.05$), mientras que en *B. orbigniana* fue del 70% del control, en *C. officinalis var. chilensis* fue del 50% (Fig. 13, apéndice, tabla XI)

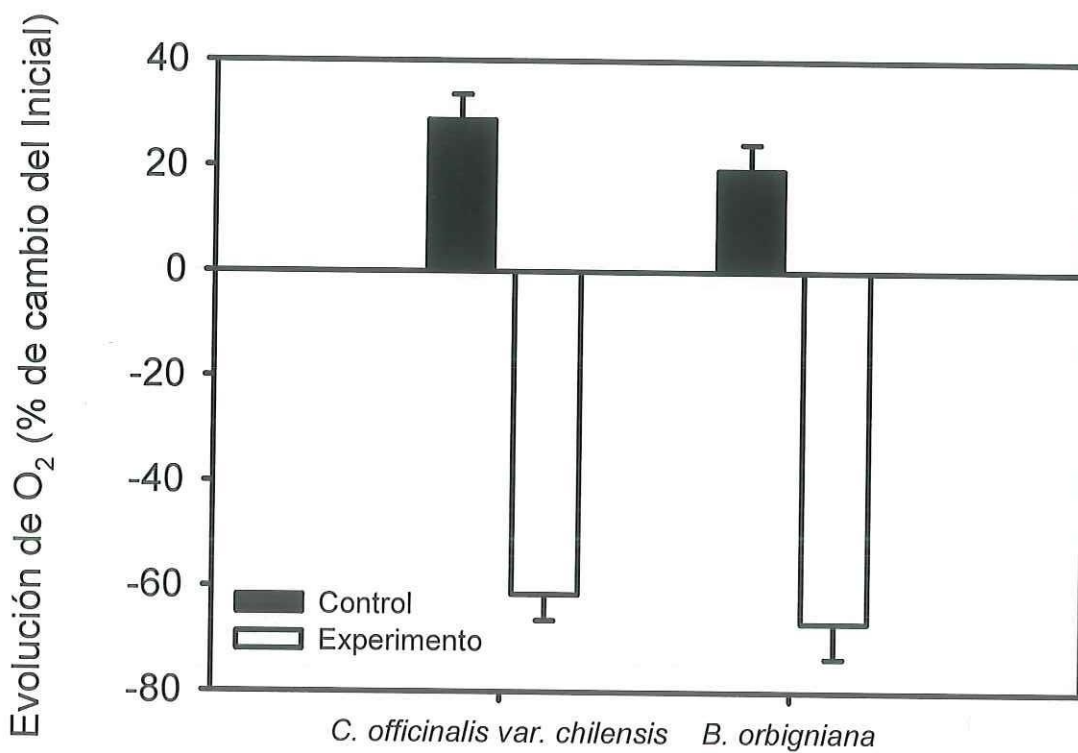


Figura 12.- Efecto del inhibidor acetazolamida (AZ) sobre la fotosíntesis de de *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis var. chilensis*, expresado como porcentaje de cambio del inicial. El inhibidor fue utilizado a una concentración final de 100 μ M.

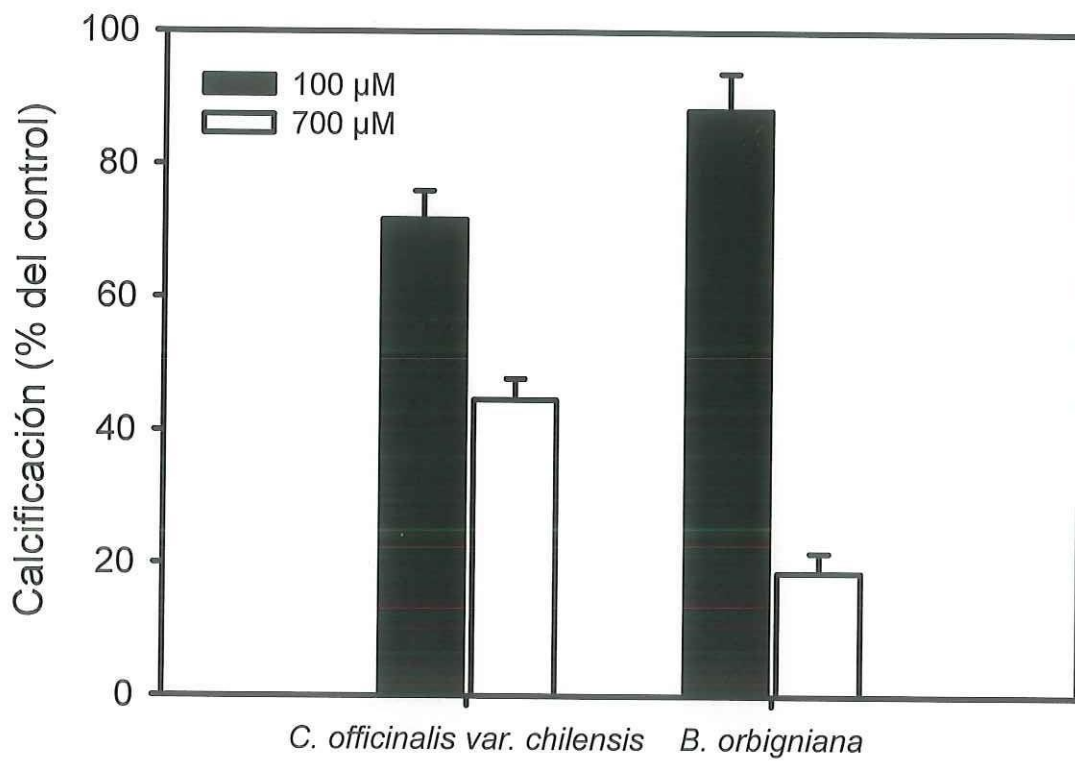


Figura 13.- Efecto del inhibidor acetazolamida (AZ) sobre la calcificación de *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis var. chilensis*, expresada como % del control.

III.4. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio mostraron que la influencia de la temperatura fue de poca magnitud sobre la calcificación en luz y no evidente en oscuridad. Las altas tasas de calcificación en luz con respecto a la oscuridad, sugieren un aumento de la calcificación por la fotosíntesis. En oscuridad, la respiración y la ausencia de fotosíntesis, puede limitar la calcificación. Finalmente, se demostró la presencia de una anhidrasa carbónica externa, que al inhibirla, las tasas de fotosíntesis y de calcificación disminuyeron de manera significativa.

Las ACG presentan un talo conformado casi en un 85% de CaCO_3 similar a lo reportado para estas algas. Lo anterior indica que aproximadamente el 15% de estas algas está constituido de materia orgánica, y su producción puede ser mayor a lo normalmente estimado, si se utiliza otro tipo de normalización (i.e. g mat. org.).

En condiciones de luz se mostró que la calcificación es un proceso influenciado por la temperatura y aumenta la calcificación hasta cierto punto. Los resultados obtenidos, son consistentes con lo reportado para el alga coralina *Phymatolithon calcareum* en donde también se encontró un efecto similar de la temperatura (King y Schramm, 1982). La actividad de una ATPasa puede que esté presente en éste proceso. Esta enzima facilita la incorporación de Ca^{++} mediante un intercambio de H^+ , el cual promueve la conversión de HCO_3^- a CO_2 (McConnaughey y Whelan, 1997). Por lo tanto, esta actividad puede ser regulada por la temperatura. La magnitud de las diferencias no fueron tan grandes, esto pudiera indicar que existió alguna limitación no

contemplada (i. e. $[Ca^{++}]$), o los experimentos pudieron haber requerido mayor tiempo de aclimatación a la temperatura.

La mayor calcificación en luz en relación a oscuridad es consistentes con trabajos previos, así como la proporción de estos (L:O, Tabla II) la cual variaba de 1-3 (Pentecost, 1978; LaVelle, 1979; Borowitzka, 1981; El Haikali *et al.*, 2004; Benssousan y Gattuso, 2007; Martin *et al.*, 2007; Steller *et al.*, 2007). Este aumento de calcificación en luz ha sido explicado de distintas formas. LaVelle (1979), propuso que parte de este aumento era debido a una translocación de compuestos orgánicos, Ca^{++} y CO_3^{-2} , en *Calliathron tuberosum*, de intergeniculas adyacentes a los ápices (no pigmentados). Esto fue evidente cuando iluminaba las intergeniculas adyacentes, y la calcificación en los ápices (no iluminados) era estimulada. Lo anterior se explicó por una unión de iones Ca^{++} a compuestos orgánicos, los cuales eran translocados, sin embargo se dio más énfasis a un transporte de OH^- , el cual estimulaba la alcalinización. Esto puede ser de poca influencia en este trabajo pues no se hizo una separación de ápices, aunque en menor magnitud los productos translocados pudieran permitir que se sintetizaran más en las partes no apicales. Por lado Borowitzka (1987), propone una alcalinización en espacios celulares debido a la incorporación del CO_2 durante la fotosíntesis que favorece la formación de CO_3^{-2} . Además, explica que la matriz orgánica (pared celular), y su composición (productos derivados de la fotosíntesis), actúan como sitios de nucleación, atracción y unión de iones Ca^{++} , similar a lo explicado por LaVelle (1978). Con respecto a esto último, Bilan y Usov (2001), sugieren que la presencia de xilogalactanos sulfatados y alginatos (polisacáridos únicos del grupo Corallinales, pero inusuales en las

algas rojas y características únicas de éstos compuestos) tienen un papel muy importante en el proceso de calcificación, y tienen gran influencia en la formación de calcita y no aragonita como la mayoría de las algas calcificantes, así como la atracción de iones Ca^{++} . La medida en que esto puede ser observado en los resultados debido a los tiempos de incubación permanece incierta. A corto plazo se ha propuesto que los productos e la fotosíntesis, juegan un papel importante de manera energética en la calcificación (LaVelle, 1978). Con base a lo anterior, cualquier mecanismo de concentración de carbono en la célula, promovería una tasa de fotosíntesis, una mayor producción (bajo saturación de luz) y finalmente una mayor calcificación. Los resultados obtenidos pueden ser un efecto mediano plazo de una producción y translocación de polisacáridos que actúan como componentes de la matriz orgánica. Además, el CO_2 fijado en la fotosíntesis, puede ser utilizado en la calcificación (Borowitzka, 1987).

Las bajas tasas de calcificación en oscuridad, también son consistentes con los trabajos citados previamente, aunque de magnitudes distintas. En otros casos, también se ha visto una disolución del CaCO_3 para algas coralinas incrustantes (Gattuso *et al.*, 1997) o bien calcificación nula para de *L. maragaritae*. (Steller *et al.*, 2007). La calcificación en oscuridad, ha sido explicado como una actividad metabólica residual de la luz, pero con una reducción significativa (El Haikali *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha mencionado de una calcificación independiente del metabolismo (Pentecost, 1978; LaVelle, 1979; Borowitzka, 1987). No obstante, lo anterior sería poco probable, pues como se demostró, una ATPasa puede estar funciona como acarreadora de iones Ca^{++} . Además, la fuente de carbono inorgánico disponible (HCO_3^-), necesitaría su conversión

a CO_2 para entrar a la célula o bien por medio de un transporte activo, implicando actividad metabólica. También es posible que el CO_2 disponible pueda entrar por difusión y ser utilizado para la calcificación, en ausencia de la fotosíntesis, aunque, el medio ácido creado por la respiración (ver más adelante) puede promover la disolución.

La respiración, puede jugar un papel importante en las bajas tasas de calcificación en oscuridad. Éste proceso implica una disminución del pH (datos no mostrados), y crea un ambiente ácido que promueve la disolución del CaCO_3 . Aunque lo anterior no puede demostrarse de manera clara, puede que tenga un papel importante en los tiempos de incubación largos (ver adelante). Por ejemplo en *L. margaritae*, no se encontró una calcificación en oscuridad después de 60h de incubación. Puede entonces que si exista una calcificación, sin embargo a largo plazo, la respiración disuelva el CaCO_3 nuevo. Finalmente una limitación de O_2 , la cual limita respiración y eventualmente la calcificación, puede ser descartada pues los experimentos se encontraban con aeración constante durante las incubaciones. No obstante, la ausencia de fotosíntesis es el principal factor de disminución en las tasas de calcificación.

El efecto de la temperatura a diferencia de lo encontrado en la calcificación en condiciones de luz saturante, no fue muy claro. Probablemente las diferencias encontradas, se deban a un remanente grande en la calcificación aumentada por la luz (ya que las muestras fueron las mismas durante las incubaciones luz-oscuridad). En general, aun cuando las diferencias entre las temperaturas no son tan amplias (i.e. luz), la temperatura podría regular la calcificación, pues si la fotosíntesis aumenta la calcificación y es regulada por la temperatura, regularía indirectamente la calcificación.

Al igual que las tasas de fotosíntesis, los mayores valores encontrados para ambas especies, sugieren que este grupo calcifica más en verano.

Con la excepción del alga coralina no geniculada *L. margaritae*, las tasas de calcificación reportadas en la literatura para algunas especies de algas coralinas (estimadas por A_T) las tasas encontradas en este estudio son menores (Tabla V). Lo anterior, puede estar influenciado por las distintas condiciones utilizadas pues las estimaciones fueron hechas *in situ*. Al contrario que en *L. margaritae*, en donde las condiciones y equipo utilizado fueron similares a éste estudio (Steller *et al.*, 2007). A pesar de lo anterior, las tasas de calcificación obtenidas en este estudio se encuentran dentro del mismo orden de magnitud, y las diferencias máximas fueron de poco más del doble. De las especies comparadas, la más importante es *C. ellongata*, pues debido a sus tasas de calcificación, fotosíntesis y respiración se le atribuye una contribución importante en los flujos de carbono (ecosistema sumidero de CO_2). La diferencia encontrada en relación a las especies estudiadas, no fue mayor de cinco unidades (El Haikali *et al.*, 2004; Benssousan y Gattuso, 2007). Esto sugiere que las ACG estudiadas, pueden influir significativamente en el ciclo del C local. Sin embargo, para confirmarlo es necesario evaluar su área de cobertura y estudiar su calcificación y fotosíntesis en campo para poder incluirlas en modelos de flujos de carbono.

Este es el primer estudio en donde se reporta una AC externa en estas algas. La incompleta inhibición de la fotosíntesis, es debido a que bajo condiciones normales existe una poca proporción de CO_2 que puede ser difundirse por la célula. Por otro lado, la parcial inhibición de la calcificación indica que también esta enzima está involucrada

en este proceso. En ausencia de una incorporación directa de HCO_3^- (beneficiando preferencialmente a la calcificación), el CO_2 facilitado por la AC, puede ser utilizado en la calcificación o en la fotosíntesis, lo que sugiere una competencia de ambos procesos por este ion. En qué medida sea beneficiado un proceso u otro todavía permanece desconocido ya que en luz ambos procesos son inhibidos. Por otro lado si la AC, se actúa únicamente para proveer CO_2 a RubisCO, también reduciría significativamente la calcificación, pues está ligada a la fotosíntesis. De igual forma, el remanente de calcificación indica, que de alguna u otra forma, parte del CO_2 restante, también pueda utilizarse en la calcificación. La consistencia en la disminución de igual magnitud después de la inhibición puede sugerir, que la CA puede actuar preferencialmente hacia la fotosíntesis (¿transporte activo de CO_2 ?), y su parcial inhibición, disminuye la calcificación. Como se menciono anteriormente, el mecanismo de calcificación en las algas coralinas implica una entrada de CO_2 a la célula, y su posterior conversión a HCO_3^- . Con respecto a lo anterior, Borowitzka (1981), encontró un aumento proporcional de la calcificación con respecto a la concentración de CO_3^{2-} en *A. foliácea*, lo cual sugiere que la calcificación de este grupo esta facilitada por una alcalinización del agua. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que lo anterior puede ser poco probable, pues al suprimir la actividad de una AC la calcificación disminuyó más del 50%, lo cual sugiere que la calcificación depende de la entrada de CO_2 . Probablemente lo encontrado por este autor sea un mecanismo de acidificación por medio de protones para una conversión de CO_3^{2-} a HCO_3^- . Por otro lado, el mismo autor encontró una calcificación en tejido muerto (= independiente o con poca influencia del mismo). Lo anterior puede ser explicado en parte, a que estas algas coralinas precipitan CaCO_3 en forma de aragonita en

células cercanas a la parte basal y puede existir una disolución y segunda precipitación en células viejas igualmente, de aragonita, la cual para precipitarse no requieren la presencia de una matriz orgánica (Borowitzka, 1987). Lo anterior pudiera ser observado como calcificación neta, pues los métodos utilizados no distinguen entre precipitación de calcita o aragonita. Más experimentos son necesarios para poder entender el mecanismo de calcificación en estas algas.

Tabla V.- Comparación entre las tasa de calcificación entre distintas especies, incluido este trabajo. Todas las tasas de calcificación son en luz. Unidades: $\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ gPS}^{-1} \text{ h}^{-1}$

Especie	Calcificación	Condición
<i>B. orbigniana</i> *	2.1	10°C
	2.6	15 °C
	3.6	20 °C
	4.4	25 °C
<i>C. officinalis var. chilensis</i> *	4.2	10 °C
	4.5	15 °C
	5.8	20 °C
<i>C. ellongata</i> **	3.9	25 °C
	8.9	<i>In situ</i> , variables
<i>L. coralloides</i> ***	9.6	<i>In situ</i> , variables (verano)
	3.3	<i>In situ</i> , variables (invierno)
<i>L. margariate</i> ****	1.02	10 °C
	3.6	25 °C

Fuente: *Este estudio; ** El Haikali *et al.* (2004); *** Martin *et al.* (2006); **** Steller *et al.* (2007)

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en ese estudio muestran como la temperatura regula la fotosíntesis y calcificación en las ACG. Al igual que para muchas especies de macroalgas la temperatura puede que sea de gran importancia en la abundancia y supervivencia de estas algas en condiciones naturales (Cabello-Pasini *et al.*, 2003 Steller *et al.*, 2007). A pesar de ello, las ACG toleran un intervalo amplio de temperatura, necesario para habitar el intermareal, pero su tasa fotosintética disminuye en temperaturas extremas, pues su capacidad de aclimatación fue superada. La eficiencia fotoquímica no fue afectada por este factor, lo que indica que este patrón depende únicamente de la aclimatación lumínica del alga. En comparación con otras ACG, su metabolismo fue similar (Schubert, 2008), mientras que en relación a las algas coralinas no geniculadas su producción fue mucho mayor, probablemente por las diferencias morfológicas y composición inorgánica (cantidad de CaCO_3).

Las ACG presentan un mecanismo de fotoprotección de disipación rápida de calor, pero de recuperación lenta, que puede estar asociado a una fotoinactivación reversible. Esto juega un papel importante en campo, pues un evento prolongado de luz puede limitar su producción. A diferencia de un fotodaño, que en parte también regula la fotosíntesis, representa una ventaja, pues el gasto de energía para sintetizar a la proteína D1 de nuevo es mayor. Esta recuperación puede ser contradictoria, pues se esperaría una rápida recuperación por la zona que habitan. Häder *et al.* (1997) y Häder *et al.* (2003) demostraron lo anterior para algas similares (morfortipos de luz). Una posible razón para explicar esta discrepancia es examinar a detalle el hábitat de estas algas. La zona rocosa

del intermareal no es uniforme y puede crear sombreado en estas algas. Las ACG tienden a formar grandes agrupaciones para evitar la desecación pero a su vez, pueden hacer un autosombreado, además la parte apical la cual recibe probablemente más luz no es pigmentada. Finalmente, se ha demostrado que puede existir una relación en la adaptación/aclimatación lumínica de algas rojas y los carotenoides presentes. Mientras que existe una mayor proporción de anteraxantina en algas aclimatadas a la sombra, la zeaxantina está presente en mayor proporción en tejido aclimatado a la luz y aunque esto no fue demostrado para las ACG, éstas presentan anteraxantina como su carotenoide principal. En relación a su hábitat natural, aunque las algas que presentan zeaxantina y anteraxantina pueden regular su fotosíntesis similar, las primeras aún cuando se presentan en verano, en condiciones lumínicas bajas (invierno) están ausentes (Schubert, 2008). Estos mecanismos necesitan ser evaluados en campo, pues en los estudios citados al explorarlo, no se observó un patrón claro de disminución y recuperación del F_v/F_m .

El transporte de electrones (TE) en las ACG puede ser un buen indicador de la fotosíntesis sobre todo en irradiancias bajas. No obstante si se pretende estimar una tasa fotosintética se sugiere utilizar la evolución de oxígeno. Por otro lado, existen ciertas limitaciones en el uso del TE, principalmente en irradiancias altas. Además, el valor $\Delta F/F_m$ y la absorptancia son críticos para una buena estimación del TE. Mientras que el primero es influenciado por características únicas de algas rojas y cianobacterias, el segundo no ha sido estudiado en las ACG.

La calcificación es un proceso dependiente de la fotosíntesis y de la temperatura. La mejor teoría para explicarlo esta en relación a la producción de compuestos orgánicos

y su afinidad por el Ca^{++} así como su influencia en el tipo de cristal (calcita), y a la presencia de una ATPasa involucrada en la incorporación de Ca^{++} . En este trabajo se sugiere una fotosíntesis alta para soportar la calcificación. Las proporciones fotosíntesis:calcificación (F:C) muestran valores de 10-30, soportando lo anterior. Sin embargo, estas proporciones son mucho mayores a lo reportado para *L. margaritae* (Steller *et al.*, 2008). Las diferencias fisiológicas mas grandes entre estos dos grupos radica en sus tasas de crecimiento (más lento en las algas coralinas no geniculadas, mm año^{-1}). Por lo tanto, las tasas de fotosíntesis mayores en las ACG, soportan su rápido crecimiento (mm mes^{-1}) en relación a las algas no geniculadas. Las proporciones encontradas por otro lado, pueden estas sobrestimadas pues se utilizaron distintos métodos y puede existir un efecto de aclimatación estacional ya que los experimentos fueron hechos en distintas estaciones (Tabla VI).

Las tasas de calcificación de las ACG estudiadas son similares a las tasas reportadas para otras especies en estudios recientes, incluso, similares a las de algas coralinas no geniculadas. Esto sugiere que para que exista una influencia de este proceso en los flujos de carbono, es necesaria un área de cobertura grande, lo cual para las ACG en México no ha sido estudiado.

Finalmente la presencia de una anhidrasa carbónica que actúa como mecanismo de incorporación de carbono en estas algas sugiere una ventaja de estas algas sobre todo cuando existe una limitación por CO_2 , ya que facilita carbono orgánico para la fotosíntesis y para la calcificación. Esto además puede sugerir una competencia entre estos dos procesos por el carbono inorgánico.

Tabla VII.- Proporción entre la fotosíntesis y calcificación a distintas temperaturas para *B. orbigniana* y *C. officinalis* var. *chilensis*. Fotosíntesis expresada como P_{\max} .

Especie/Temperatura	10	15	20	25
<i>B. orbigniana</i>	9.33	22.05	21.25	35.66
<i>C. officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	16.62	19.74	15.20	16.95

LITERATURA CITADA

- Abbot I. A. y G. J. Hollenberg. 1978. **Marine algae of California**. Stanford University Press. E. U. 847 pp.
- Aguilar-Rosas L. E. 1981. Algas rojas (Rhodophyta) de la Bahía de Todos Santos, Baja California, México durante el ciclo 1978-1979. *Cienc. Mar.* **7**: 85-101
- Andrake W. y H. W. Johansen. 1980. Alizarin red dye as a marker for measuring growth in *Corallina officinalis* var. *chilensis* (Corallinaceae, Rhodophyta). *J Phycol.* **16**: 620–622
- Aro E. M., Virgin I., y B. Andersson. 1993. Photoinhibition of photosystem II: inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta.* **143**:113–134
- Axelsson L, Usitalo J y H. Ryberg. 1991. Mechanisms for concentrating and storage of inorganic carbon in marine macroalgae En: Garcia-Reina G, Pedersen M (eds) **Seaweed cellular biotechnology**. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 185-198pp.
- Beer S. y L. Axelsson. 2004. Limitations in the use of PAM fluorometry for measuring photosynthetic rates of macroalgae at high irradiances. *Eur. J. Phycol.* **39**: 1-7
- Beer, S., Larsson C., Poryan O. y L. Axelsson. 2000. Photosynthetic rates of *Ulva* (Chlorophyta) measured by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Eur. J. Phycol.* **35**: 69–74

- Behrenfeld M. J., Prasil O., Kolber Z. S., Babin M. y P. G. Falkowsky. 1998.
Compensatory changes in photosystem II electron turnover rates protect
photosynthesis from photoinhibition. *Photosynthesis Res.* **58**: 259-268
- Benssousan N. y J. P. Gattuso. 2007. Community primary production and calcification
in a NW Mediterranean ecosystem dominated by calcareous macroalgae. *Mar.
Ecol. Prog. Ser.* **334**: 37-45
- Bilan M. I. e I. A. Usov. 2001. Polysaccharides of calcareous algae and their effect on
the calcification process. *Russ. J. Bioorg. Chem.* **27**: 2-16
- Björk, M. Haglund, K. Ramazanov, Z. Garcia-Reina, G. y M Pedersén. 1992. Inorganic-
carbon assimilation in the green seaweed *Ulva rigida* C. Aghard. (Chlorophyta).
Planta. **187**: 152–156
- Blankenship R. E. 2002. Molecular mechanisms of photosynthesis. Blackwell Science.
E.U. 321pp.
- Borowitzka M. A. 1981. Photosynthesis and calcification in the articulated coralline
algae *Amphiroa foliacea* and *A. anceps*. *Mar. Biol.* **63**: 17-23
- Borowitzka M. A. 1987. Calcification in algae: mechanisms and the role of metabolism.
Crit. Rev. Plant Sci. **6**: 1-45
- Bose S., Herbert, S. K. y D. C. Fork. 1988. Fluorescence characteristics of
photoinhibition and recovery in a sun and a shade species of the red algal genus
Porphyra. *Plant Physiol.* **86**: 946-950

- Cabello-Pasini A., Zertuche J. A. e I. Pacheco-Ruiz. 2003. Photosynthesis, growth and nitrogen uptake of competing marine macrophytes if the Gulf of California. *Bot. Mar.* **46**: 503-512
- Cabello-Pasini A. Aguirre-von Wobeser E. y F. L. Figueroa. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrosystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor cultures systems. *Photo. Photobiol. B. Biol.* **57**: 169-178
- Cabello-Pasini A. y F. L. Figueroa. 2006. Effect of nitrate concentration on the relationship between photosynthetic oxygen evolution and electron transport rate in *Ulva rigida* (Cholorophyta). *J. Phycol.* **41**: 1169-1177
- Campbell D., Hurry V., Clarke, A. K., Gustafsson, P. y G Oquist. 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 667-683
- Coltart B. J. y H. W. Johansen. 1973. Growth rates of *Corallina officinalis var. chilensis* (Rhodophyta) at different temperatures. *Mar. Biol.* **18**: 46-49
- Crisholm J. R. M. y J. P. Gattuso. 1991. Validation of the alkalinity anomaly technique for investigating calcification and photosynthesis in coral reef communities. *Limnol. Ocean.* **36**: 1232-1239
- Demming-Addams B. y W. W. III Adams. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **43**: 599-626

- Edwards G. E. y N. R. 1993. Can CO₂ assimilation in maize leaves be predicted from chlorophyll fluorescence analysis? *Photosynthesis Res.* **37**: 89-102
- El Haïkali B., Bennisoussan N., Romano J. C. y V. Bousquet. 2004. Estimation of photosynthesis and calcification rates of *Corallina elongata* Ellis and Solander, 1786, by measurements of dissolved oxygen, pH and total alkalinity. *Sci. Mar.* **68**: 45-56
- Espinosa-Carreón T. L., Gaxiola-Castro G., Robles-Pacheco J. M. y S. Nájera-Martínez. 2001. Temperatura, salinidad, nutrientes y clorofila *a* en aguas costeras de la ensenada del sur de California. *Cienc. Mar.* **27**: 397-422
- Falkosky P. G. y J. A. Raven. 1997. **Aquatic photosynthesis**. Blackell Science. E.U. 375 pp.
- Figueroa F. L., Conde-Alvarez R. e I. Gomez. 2003. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynthesis Res.* **75**: 259-275
- Foster M. S. 1975. Algal sucesion in a *Macrocystis pyrifera* forest. *Mar. Biol.* **32**: 313-329
- Franklin A. L. y M. R. Badger. 2001. A comparison of photosynthetic electron transport rates in macroalgae measured by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and mass spectrometry. *J. Phycol.* **37**: 756-767

- Gattuso J. P., Payri C. E., Pichon M. Delesale B. y M. Frankignouelle. 1997. Primary production, calcification, and air-sea CO₂ fluxes of a macroalgal-dominated coral reef community (Moorea French Polynesia). *J. Phycol.* **33**: 729-738
- Geider R. J. y B. A. Osborne. 1992. **Algal photosynthesis, the measurement of algal gas exchange**. Chapman & Hall Inc. USA. 256 pp.
- Genty B., Briantais J. M. y N. R. Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport yield and quenching of chlorophyll fluorescence. *Bioch. Biophys. Acta* . **990**: 87-92
- Gorbunov M. Y., Kolber Z. S., Lesser M. P. y P. G. Falkowsky. 2001. Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals. *Limnol. Oceanogr.* **46**: 75-85
- Granbom M. y M. Pedersen. 1999. Carbon acquisition strategies of the red alga *Eucheuma denticulate*. *Hydrobiologia* **398/399** 349-354
- Häder D. P., Lenert M., Flores-Moya A., Jiménez C., Mercado J., Salles S., Aguilera J., y F. L. Figueroa. 1997. Effects of solar radiation on the photosynthetic activity of the red alga *Corallina elongata* Ellis et Solana. *Photochem. Photobiol.* **37**: 196-202
- Häder D. P. y F. L. Figueroa. 1997. Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochem. Photobiol.* **66**: 1-14
- Häder D. P., Leber M., Mercado J., Aguilera J., Salles S., Flores-Moya A. Jiménez C. y F. L. Figueroa. 1996. Photosynthetic oxygen production and PAM fluorescence

- in the brown alga *Padina Pavonica* measured in the field under solar radiation.
Mar. Biol. **127**: 61-66
- Häder D. P., Lebert M. y W. E. Helbling. 2003. Effects of Solar radiation on the Patagonian rhodophyte *Corallina officinatis* L. *Photosynthesis Res.* **78**: 119-132
- Haglund K, Bjork M, Ramazanov Z, Garcia-Reina G, Pedersen M. 1992. Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. *Planta* **187**: 275-281
- Hanelt D. 1992. Photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the South China Sea. *Mar Ecol Prog. Ser.* **82**: 199-206
- Hanelt D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar. Biol.* **131**: 361-369
- Hanelt D. y W. Nultsch. 2003. Photoinhibition in seaweeds. En: Heldmer G. y D. Werner (eds) **Environmental signal processing and adaptation**. 141-167 pp.
- Hanelt D., Huppertz K. y W. Nultsch. 1993. Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **97**: 31-37
- Hanelt D., K. Huppertz y W. Nultsch. 1992. Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in red algae. *Bot. Acta* **105**: 278-284

- Henley W.J. 1993. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J. Phycol.* 29: 729-739
- Herbert S.K. y J. R. Waaland. 1988. Photoinhibition of photosynthesis in a sun and a shade species of the red algal genus *Porphyra*. *Mar. Biol.* 97: 1-7
- Hernández-Ayón J. M., Belli S. L. y A. Zirino. 1999. pH, alkalinity and total CO₂ in coastal seawater by potentiometric titration with a difference derivative readout. *Analy. Chem. Acta.* 394: 101-108
- Huppertz K., Hanelt D. y W. Nultsch. 1990. Photoinhibition of photosynthesis in the marine brown alga *Fucus Serratus* as studied in field experiments. *Mar. ecol. Prog. Ser.* 66: 175-182
- Jiménez C., Figueroa F. L., Salles S., Aguilera J., Mercado J., Viñegla B., Flores Moya A., Lebert M. y D. P. Häder. 1997. Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of southern Spain. *Bot. Mar.* 41: 329-338
- Johansen H. W. 1981. **Coralline algae: a first synthesis**. CRC press. E. U. 239 pp.
- Johansen H.W. y L. F. Austin. 1970. Growth rates in the articulated coralline *Calliarthron* (Rhodophyta). *Can. J. Bot.* 48: 125-132

- Kangwe J. W. 2006. Calcareous algae of a tropical lagoon, primary productivity, calcification and carbonate production. **Tesis doctoral**. Stockholm University. Suecia 48 pp.
- King R. J. y W. Scramm. 1982. Calcification in the Maerl Coralline alga *Phymatolithon calcareum*: effects of salinity and temperature. *Mar. Biol.* **70**: 197-204.
- Krause G. H. y E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Ann. Rev. Plant. Phys.* **42**: 313-349
- LaVelle J. M. 1979. Translocation in *Calliarthron tuberculosum* and its role in the light-enhancement of calcification. *Mar. Bio.* **55**: 37-44
- Lee R. E. 1999. **Phycology**. Cambridge University Press. Reino Unido. 614pp.
- Longstaff B. J., T. W. Kildea, J. W. Runcie, A. Cheshire, W. C. Dennison, C. Hurd, T. Kana, J. A. Raven y A. W. D. Larkum. 2002. An in situ study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynthesis Res.* **74**: 281-293
- Lüning K. 1990. **Seaweeds, their environment, biogeography and ecophysiology**. Wiley, E. U. 527 pp.
- Martin S., Castets M. D. y J. Clavier 2006. Primary production, respiration and calcification of the temperate free-living coralline alga *Lithothamnion corallioides*. *Aquat. Bot.* **85**: 121-128

- Masojidek J., Grobbelaar J. U., Pechar L. y M. Koblížek, 2001. Photosystem II electron transport rates and oxygen production in natural waterblooms of freshwater cyanobacteria during a diel cycle. *J Plank Res.* **23**: 57-66
- Maxwell K. y G. N. Johnston. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* **345**: 659-668
- McConnaughey T.A. y J. F. Whelan. 1997. Calcification generates protons for nutrients and bicarbonate uptake. *Earth Sci. Rev.* **42**: 95-117
- Niyogi, K. K. 1999. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 333-359
- Niyogi, K.K., Björkman, O. & Grossman, A.R. 1997. The role of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 14162-14167 1997
- Osmond C. B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. En Baker H.R., Bowyer J.R. (eds). **Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field**. Bios Scientific publication. Oxford, E. U. 1-24.
- Osmond C. B., J. Ramus, G. Levavasseur, L. A. Franklin and W. J. Henley. 1993. Fluorescence quenching during photosynthesis and photoinhibition of *Ulva rotundata*. *Planta* **190**: 97-106
- Pearse V. B. 1972. Radioisotopic study of calcification in the articulated coralline alga *Bossiella orbigniana*. *J. Phycol.* **8**: 88-97

- Peña-Manjarrez J. L., Helenes J., Gaxiola-Castro G. y E. Orellana-Cepeda. 2005
Dinoflagellate cysts and bloom events at Todos Santos Bay, Baja California,
México, 1999–2000. *Cont. Shelf Res.* **25**: 1375-1393
- Pentecost A. 1978. Calcification and photosynthesis in *Corallina offinalis* L. using the
 $^{14}\text{CO}_2$ method. *Br. Phycol.* **13**: 383-390
- Prasil O., Klober Z., Berry J. A. y P. G. Falkoswky. 1996. Cyclic electron flow around
photosystem II *in vivo*. *Photosynthesis Res.* **48**: 395-410
- Rivera M. G., Riosmena-Rodríguez R. y M. S. Foster. Edad y crecimiento de
Lithothamnion mullerii (Corallinales, Rhodophyta) en el suroeste del Golfo de
California, México. *Cienc. Mar.* **30**: 235-249
- Schreiber U. y C. Neubauer. 1990. O_2 dependent electron flow, membrane energization
and mechanism of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence.
Photosynthesis Res. **25**: 279-293
- Schreiber U., Hornmann H., Asada K. y C. Neubauer. 1995. O_2 dependent electron flow
in intact spinach chloroplast: properties and possible regulation of Mehler
ascorbate peroxidase cycle. En: Mathis P. (ed). **Photosynthesis: from light to
biosphere**. Kluwer, Berlin, 813-818 pp.
- Schubert N. 2008. Mecanismos de fotoprotección en algas rojas. Tesis de doctorado.
CICESE. México. 160 pp.

- Schubert N., García-Mendoza E. e I. Pacheco Ruiz. 2006. Carotenoid composition of marine red algae. *J. Phycol.* **42**: 1208-1216
- Silva, J., R. Santos, J. Serôdio and M. A. Melo. 1998. Light response curves for *Gelidium sesquipedale* from different depths determined by two methods: O₂ evolution and chlorophyll fluorescence. *J. Appl. Phycol.* **10**: 295-301
- Smith A.D. y A. A. Roth. 1979. Effect of carbon dioxide concentration on calcification in the red coralline alga *Bossiella orbigniana*. *Mar. Biol.* **52**: 217-225
- Steller D. L., Hernández-Ayón J. M., Riosmena-Rodríguez R., y A. Cabello-Pasini. 2007. Efecto de la temperatura sobre las tasa de fotosíntesis, crecimiento y calcificación del alga coralina de vida libre *Lithophyllum maragaritae*. *Cienc. Mar.* **33**: 441-456
- Webb W .L., Newton, M. y D. Starr. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnuf rubra*. Mathematical model. *Oecol.* **17**: 281-291
- Williams W. P. y J. F. Allen. 1987. State 1/State 2 transitions in higher plants and algae. *Photosynthesis Res.* **13**: 19-45
- Wilson. S., Blake C., Berges J. A. y C. A. Maggs. 2004. Environmental tolerances of free-living coralline algae (maerl): implications for European marine conservation. *Biol. Cons.* **120**: 279-289

Woelkerling 1988. **The Corallinae red Algae: an analysis of genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae.** British Museum (Natural History). Oxford University press. Inc. E.U.

Zar J. H. 1996. **Biostatistical Analysis.** 4^a ed. Prentice-Hall. E. U. 663 pp.

APÉNDICE

Tabla I.- Comparaciones pareadas *t*-student para muestras independientes, para los valores de P_{\max} por temperatura, para *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. Para todos los tratamientos n=4. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Especie	Resultado estadístico	Comparación por tratamiento (°C)														
		10			15			20			25			30		
		15	20	25	30	35	20	25	30	35	25	30	35	30	35	35
<i>Bossiella orbigniana</i>	T_{calc}	-3.6	-6.1	-10.6	-2.8*	15.4*	-0.8	-4.5	0.01	10.1*	-4.6	0.7	15.7*	3.6*	18.2*	8.9*
	T_{crit}	2.4	2.4	2.4	2.7	3.1	2.4	2.4	2.4	3.1	2.4	2.4	3.1	2.5	3.1	3.1
	Diferencia	S	S	S	S	S	NS	S	NS	S	S	NS	S	S	S	S
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	T_{calc}	-8.5*	-9.7*	-6.6*	-4.8*	-3.17*	-2.45	-2.8	3.5	4.8	-1.1	5.6	6.8	4.8	5.6	1.4
	T_{crit}	3.1	3.1	3.1	3.1	3.18	2.44	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
	Diferencia	S	S	S	S	NS	S	S	S	S	NS	S	S	S	S	NS
<i>Lithothrix aspergillum</i>	T_{calc}	-5.9	-9.3*	-8.3*	-9.9*	-5.4	-6.8*	-6.1*	-8.3*	1.0	0.2	-3.7	12.1*	-3.8*	6.5*	8.7*
	T_{crit}	2.4	3.1	3.18	3.1	2.4	2.7	2.7	3.1	2.4	2.4	2.4	2.7	2.4	2.7	3.1
	Diferencia	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	S	S	S	S	S

*pruebas t para muestras con varianzas diferentes

Tabla II.- Comparaciones pareadas *t*-student para muestras independientes, para los valores de Alfa por temperatura, para *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. Para todos los tratamientos n=4. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Especie	Resultado estadístico	Comparación por tratamiento														
		10					15					20				
		15	20	25	30	35	20	25	30	35	25	30	35	30	35	35
<i>Bossiella orbigniana</i>	T_{calc}	-0.3	-1.1	-2.6	-2.5*	5.7	-0.6	-1.7	-2.3*	4.0	-1.3	-2.2*	6.2	-1.9*	7.5	3.3*
	T_{crit}	2.4	2.4	2.4	3.1	2.4	2.4	2.4	3.1	2.4	2.4	3.1	2.4	3.1	2.4	3.1
	Diferencia	NS	NS	S	NS	S	NS	NS	NS	S	NS	S	S	NS	S	S
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	T_{calc}	-0.6	-1.4	-1.7*	-2.7*	-0.4*	-0.8	-1.1	-2.4*	0.1	-0.4	-1.9*	0.8	-1.8	1.1	2.4*
	T_{crit}	2.4	2.4	3.1	3.1	2.7	2.4	2.4	2.7	2.4	2.4	2.7	2.4	2.4	2.4	2.7
	Diferencia	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>Lithothrix aspergillum</i>	T_{calc}	-0.9	-3.6*	-3.2*	-4.2*	-5.5*	-1.6	-1.5	-3.6*	-5.3*	-0.04	-2.2	-4.7*	-2.1	-4.6*	-5.1
	T_{crit}	2.4	3.1	3.1	3.1	3.1	2.4	2.4	3.1	3.1	2.4	2.4	3.1	2.4	3.1	2.4
	Diferencia	NS	S	S	S	S	NS	NS	S	S	NS	NS	S	NS	S	S

*pruebas t para muestras con varianzas diferentes

Tabla III.- Comparaciones pareadas *t*-student para muestras independientes, para los valores de E_k por temperatura, para *Bossiella orbigniana*, *Corallina officinalis* var. *chilensis* y *Lithothrix aspergillum*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. Para todos los tratamientos n=4. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Especie	Resultado estadístico	Comparación por tratamiento														
		10			15			20			25			30		
		15	20	25	30	35	20	25	30	35	25	30	35	30	35	35
<i>Bossiella orbigniana</i>	T_{calc}	-1.0	-1.1	-1.7	3.0	1.9	0.2	-0.1	2.8	2.2	-0.5	3.7	2.8	4.4	3.3	-0.6
	T_{crit}	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
	Diferencia	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	S	NS	NS	S	S	S	S	NS
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	T_{calc}	-2.8*	-2.3*	-1.5*	2.5	-0.7*	0.2	0.2	4.4	1.5	0.04	3.8	1.2	2.1*	0.9	-1.9
	T_{crit}	2.7	2.7	2.7	2.4	2.7	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.7	2.4	2.4
	Diferencia	S	NS	NS	S	NS	NS	NS	S	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS
<i>Lithothrix aspergillum</i>	T_{calc}	-0.3	-1.3	-0.9*	-0.2	7.7*	-0.9	-0.7	0.07	5.5*	0.1	0.9	5.3	0.76	4.1*	3.9*
	T_{crit}	2.4	2.4	2.7	2.4	3.1	2.4	2.4	2.4	3.1	2.4	2.4	2.4	2.44	3.1	3.1
	Diferencia	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	S	S	NS	NS	S	NS	S	S

*pruebas t para muestras con varianzas diferentes

Tabla IV.-Resultados de las pruebas pareadas *t*-student para muestras dependientes, para los distintos tratamientos de luz y para los parámetros evolución de oxígeno y F_v/F_m en *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis* var. *chilensis*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. Para todos los tratamientos n=6. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Especie	Parámetro	Tratamiento	T _{calc}	T _{crit}	Diferencia
<i>Bossiella orbigniana</i>	Evolución de oxígeno	1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	2.93	2.57	S
		Oscuridad	-0.034	2.57	NS
	F_v/F_m	15 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-3.00	2.57	S*
		1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	12.51	2.57	S
		Oscuridad	-1.82	2.57	NS
		15 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-0.87	2.57	NS
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	Evolución de oxígeno	1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	2.72	2.57	S
		Oscuridad	0.32	2.57	NS
	F_v/F_m	15 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	0.32	2.57	NS
		1000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	20.30	2.57	S
		Oscuridad	-3.01	2.57	S*
		15 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$	-9.06	2.57	S

* Pruebas en las cuales el estadístico no paramétrico arrojó un resultado distinto. Prueba utilizada, Wilcoxon para muestras dependientes.

Tabla V.-Resultados de las pruebas pareadas *t*-student para muestras dependientes, para los valores iniciales, exposición y tiempos de recuperación del parámetro F_v/F_m para *Bossiella orbigniana*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. Para todos los tratamientos n=6. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Resultado estadístico	Comparación		
	Inicial / 1h exposición	1H exposición / 2h rec	11h rec / inicial
T_{calc}	31.52	4.09	-11.57
T_{crit}	2.57	2.57	2.57
g. l.	5	5	5
Diferencia	S	S	S

Tabla VI.-Resultados de las pruebas pareadas *t*-student para muestras dependientes, para los valores iniciales, exposición y tiempos de recuperación del parámetro F_v/F_m para *Corallina officinalis var. chilensis*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. Para todos los tratamientos n=6. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Resultado estadístico	Comparación		
	Inicial / 1h exposición	1h exposición / 2h rec	6h rec / inicial
T_{calc}	8.20	-6.40	-2.29
T_{crit}	2.57	2.57	2.57
g. l.	5	5	5
Diferencia	S	S	NS

Tabla VII.-Resultado de la prueba *t*-student para muestras independientes para las tasas de crecimiento en campo para *Corallina officinalis var. chilensis*. Alfa = 0.05, dos colas. Para los tratamientos noviembre, n= 103; marzo, n= 33.

Resultado estadístico	Noviembre / Marzo
Tcalc	5.67
Tcrit	1.97
g. l.	133
diferencia	significativa

Tabla VIII.-Resultados de las pruebas pareadas *t*-student para pruebas independientes con varianzas iguales, para las tasas de calcificación bajo condiciones de luz con respecto a la temperatura en *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis* var. *chilensis*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. S, diferencia significativa; NS, no significativo. Para todos los casos n=6, excepto en *Corallina officinalis* var. *chilensis* a 20 °C, n= 5.

Especie	Resultado estadístico	Comparación entre tratamientos					
		10	15	20	25	15	20
<i>Bossiella orbigniana</i>	T_{calc}	1.81	7.75	10.92	3.94	6.62	3.48
	T_{crit}	2.22	2.22	2.22	2.22	2.22	2.22
	g. l.	10	10	10	10	10	10
	Diferencia	NS	S	S	S	S	S
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	T_{calc}	1.85	10.17	-2.08	2.78	-3.19	-9.21
	T_{crit}	2.22	2.26	2.22	2.26	2.22	2.26
	g. l.	10	9	10	9	10	9
	Diferencia	NS	S	NS	S	S	S

Tabla IX.-Resultados de las pruebas pareadas *t*-student para pruebas independientes para las tasas de calcificación en oscuridad, con respecto a la temperatura en *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis* var. *chilensis*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. S, diferencia significativa; NS, no significativo. Para la mayoría de los casos n = 6.

Especie	Resultado estadístico	Comparación entre tratamientos					
		10	15	20	25	15	20
<i>Bossiella orbigniana</i>	T_{calc}	2.25	1.46	3.8	-1.05	1.11	2.38
	T_{crit}	2.3	2.26	2.22	2.36	2.3	2.26
	g. l.	8	9	10	7	8	9
	Diferencia	NS	NS	S	NS	NS**	S
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	T_{calc}	-0.22*	0.12	-0.86	0.35*	-1.13	-0.95
	T_{crit}	2.44	2.26	2.26	2.77	2.26	2.3
	g. l.	6.35	9	9	4.8	9	8
	Diferencia	NS	NS	NS	NS	NS	NS

• Prueba t para muestras con varianzas distintas

• ** Pruebas en las cuales el estadístico no paramétrico arrojó un resultado distinto. Prueba utilizada, Wilcoxon para muestras independientes.

Tabla X.-Resultados de las pruebas *t*-student para muestras dependientes, comparando el efecto del inhibidor AZ sobre la tasa de fotosíntesis antes y después del inhibidor y prueba *t* para muestras independientes comparando la magnitud de cambio entre el control y el tratamiento en *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis* var. *chilensis*. Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas. Para todos los tratamientos n=6. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Especie	Tratamiento/ comparación	T _{calc}	T _{crit}	Diferencia
<i>Bossiella orbigniana</i>	Inhibidor	7.85	2.57	S
	Control	-4.29	2.57	S
	Control x inhibidor*	-8.94	2.22	S
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	Inhibidor	12.32	2.57	S
	Control	-7.61	2.57	S
	Control x inhibidor*	-14.32	2.22	S

* Prueba para muestras con varianzas iguales

Tabla XI.-Resultados de las pruebas *t*-student para muestras independientes con varianzas iguales, para comparar el efecto del inhibidor AZ (100 y 700 μ M) en la calcificación de *Bossiella orbigniana* y *Corallina officinalis* var. *chilensis* . Alfa = 0.05, todas las pruebas de dos colas.. S, diferencia significativa; NS, no significativo.

Especie	Concentración	Comparación	T _{calc}	T _{crit}	Diferencia
<i>Bossiella orbigniana</i>	100 μ M	Control x inhibidor*	2.38	3.1	NS
	700 μ M	Control x inhibidor*	41.8	2.77	S
<i>Corallina officinalis</i> var. <i>chilensis</i>	100 μ M	Control x inhibidor*	5.8	2.77	S
	700 μ M	Control x inhibidor*	6.69	3.1	S

* Prueba para muestras con varianzas iguales