



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

Efecto de la Pigmentación Diferencial Sobre
la Fisiología Fotosintética de Dos
Morfortipos de *Kappaphycus alvarezii*
(Rhodophyta)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA
ENEAS AGUIRRE VON WOBESER

Ensenada, Baja California, Junio de 2000

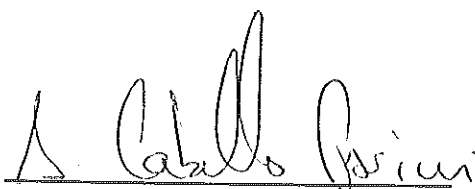
Resumen

En algunas especies de algas, existen grupos de individuos con diferencias fenotípicas que se conservan durante años de propagación vegetativa, y son probablemente el resultado de diferencias genéticas. Algunos de estos morfotipos presentan variaciones en las concentraciones de algunos pigmentos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar las diferencias en los pigmentos antena en dos morfotipos de la Rhodophyta *K. alvarezii*, y evaluar la contribución de dichos pigmentos a la fisiología fotosintética. El morfotipo verde de *K. alvarezii* presentó niveles excesivos de ficocianina y aloficocianina. Las altas concentraciones de ficocianina y aloficocianina le dieron una coloración verde a este morfotipo. Los niveles de ficoeritrina no fueron significativamente diferentes entre ambos morfotipos. A pesar de las diferencias en la pigmentación, el crecimiento en cultivo en tanques externos no fue significativamente diferente entre los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii*. La fotosíntesis máxima (P_{max}), la eficiencia fotosintética (α) y la respiración en luz blanca no fueron significativamente diferentes entre los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii*, en un intervalo de temperaturas de 8°C a 37°C. Sin embargo, en luz roja, los valores de P_{max} fueron significativamente menores en el morfotipo rojo, y α fue significativamente mayor en el morfotipo verde. La reducción de P_{max} de la cepa roja en luz roja indica que la capacidad de captura de fotones de la ficocianina y la aloficocianina se puede saturar. Sin embargo, no se encontraron evidencias de una saturación de la ficocianina y la aloficocianina en cuanto al transporte de fotones absorbidos por la ficoeritrina. Por lo tanto, se concluye que la capacidad de transporte de fotones de la ficocianina y de la aloficocianina es superior a su capacidad de absorción. La exposición a intensidades altas de luz fotosintéticamente activa produjo una reducción del rendimiento fotosintético por cuanto absorbido, de igual magnitud en los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii*, que fue reversible en aproximadamente 6 horas. La luz ultravioleta (UV) no causó un decremento adicional en el rendimiento cuántico. Sin embargo, la recuperación de la cepa verde se redujo por la luz UV-B.

EFECTO DE LA PIGMENTACION DIFERENCIAL
SOBRE LA FISIOLOGIA FOTOSINTETICA DE DOS
MORFOTIPOS DE *Kappaphycus alvarezii*
(RHODOPHYTA)

TESIS
QUE PRESENTA:
ENEAS AGUIRRE VON WOBESER

Aprobada por:



Dr. Alejandro Cabello Pasini
Presidente del Jurado



Dr. Isai Pacheco Ruiz
Sinodal Propietario



Dr. Jorge de la Rosa Velez
Sinodal Propietario

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas por su ayuda invaluable para la realización de mi tesis:

A mi director de tesis Alejandro Cabello Pasini por su dedicación y su amistad.

A mis padres por haberme apoyado en todos los sentidos durante mis estudios.

Al Dr. José Zertuche por haberme suministrado de material algal para el trabajo, y por sus acertados comentarios.

A todas las personas que aportaron ideas y sugerencias para mejorar el trabajo.

A Miriam por su compañía durante gran parte de la realización de este trabajo.

Indice	
Resumen	ii
Página de aprobación	iii
Agradecimientos	iv
Abreviaturas	vii
Lista de figuras	ix
Introducción	1
Antecedentes	7
Hipótesis	11
Material y Métodos	13
Material algal	13
Análisis pigmentario	13
Proteínas totales	14
Crecimiento	15
Fotosíntesis en función de la irradiancia	16
Efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis	17
Efecto de la calidad de luz sobre la fotosíntesis	17
Rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II	18
Efecto de la luz ultravioleta sobre el rendimiento cuántico efectivo	20
Análisis estadístico	22

Resultados	23
Pigmentación y proteínas totales	23
Crecimiento	27
Respuesta de la fotosíntesis a la irradiancia	27
Efecto de la temperatura en la fotosíntesis	30
Efecto de la calidad de luz sobre la fotosíntesis	34
Efecto de la luz ultravioleta sobre el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II	38
Discusiones	41
Conclusiones	52
Literatura citada	54

Abreviaturas

- A - Absorbancia
- α - Eficiencia fotosintética
- AFC - Aloficocianina
- ANCOVA - Análisis de covariancia
- ANOVA - Análisis de variancia
- ATP - Adenosina trifosfato
- DE - Desviación estándar
- $\Delta F/F_m'$ - Rendimiento cuántico efectivo
- DTT - Dithiotreitol
- EDTA - Ácido etilendiaminatetraacético
- FC - Ficocianina
- FE - Ficoeritrina
- I_K - Coeficiente de subsaturación
- λ - Longitud de onda
- LFA - Luz fotosintéticamente activa
- NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- PH - Peso húmedo
- P_{max} - Fotosíntesis máxima
- PSII - Fotosistema II
- PVP - Polivinilpirrolidona
- R - Respiración

RUBISCO - Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa

UV - Luz ultravioleta

UV-A - Luz ultravioleta A

UV-B - Luz ultravioleta B

Lista de Figuras

Figura 1. Transmitancia del filtro utilizado para obtener luz roja. _____	19
Figura 2. Transmitancia de los filtros utilizados para obtener tratamientos LFA + UV-A + UV-B, LFA + UV-A y LFA. _____	21
Figura 3. Espectro de absorción de un extracto de acetona (clorofila) y un extracto acuoso (biliproteínas) de los morfotipos rojo y verde de <i>K. alvarezii</i> . _____	24
Figura 4. Concentraciones de clorofila a, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina y proteínas totales en los morfotipos rojo y verde de <i>K. alvarezii</i> . _____	26
Figura 5. Tasas de crecimiento específico de los morfotipos rojo y verde de <i>K. alvarezii</i> . _____	28
Figura 6. Ejemplo de la respuesta de la fotosíntesis en función de la irradiancia en los experimentos realizados con electrodo de oxígeno tipo Clark, con los morfotipos rojo y verde de <i>Kappaphycus alvarezii</i> . _____	29
Figura 7. Fotosíntesis máxima (P_{max}) de los morfotipos rojo y verde de <i>K. alvarezii</i> en función de la temperatura. _____	31
Figura 8. Eficiencia fotosintética (α) de los morfotipos rojo y verde de <i>K. alvarezii</i> en función de la temperatura. _____	32
Figura 9. Coeficiente de subsaturación (I_K) de los morfotipos rojo y verde de <i>K. alvarezii</i> en función de la temperatura. _____	33
Figura 10. Respiración de los morfotipos rojo y verde de <i>K. alvarezii</i> en función de la temperatura. _____	35

- Figura 11. Fotosíntesis máxima (P_{max}) de los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* a 25°C en luz roja ($\lambda > 600$ nm) y luz blanca ($400 \text{ nm} < \lambda < 700$ nm). _____ 36
- Figura 12. Eficiencia fotosintética (α) de los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* a 25°C en luz roja y blanca. _____ 37
- Figura 13. Rendimiento cuántico efectivo de los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* antes y después de exposición a tres tratamientos de luz natural filtrada, y recuperación en el laboratorio. a) LFA + UV-A + UV-B b) LFA + UV-A c) LFA. _____ 39
- Figura 14. Pendiente de recuperación del rendimiento cuántico efectivo de los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* con irradiancia de $5 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y sin luz ultravioleta, después de exponerlos a tres tratamientos de luz natural filtrada. _____ 40

Introducción

La fotosíntesis es el principal mecanismo de fijación de carbono inorgánico que realizan los organismos autótrofos. En general, el proceso se puede separar en dos partes principales: los procesos fotoquímicos y los procesos enzimáticos. Durante los procesos fotoquímicos se sintetizan compuestos con alta energía química, como adenosina trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). La fijación del CO_2 se lleva a cabo mediante procesos enzimáticos (Ciclo de Calvin), que utilizan la energía almacenada en los productos de los procesos fotoquímicos, y son dependientes de la temperatura (Stryer 1995).

La energía utilizada durante la fotosíntesis para producir el ATP y el NADPH proviene de la luz solar. La energía de la luz es utilizada para producir una separación de cargas entre una molécula de clorofila *a*, llamada centro de reacción, y un aceptor de electrones. La separación de cargas incrementa el potencial eléctrico del electrón donado, permitiendo, por medio de una cadena de transporte de electrones, la reducción del NADP^+ y la formación de un gradiente transmembranal de protones, que se utiliza para la fosforilación de la adenosina difosfato (Stryer 1995).

El ciclo de Calvin consta de una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente, que consisten en formar dos moléculas de tres carbonos a partir de una molécula de CO_2 y una molécula de cinco carbonos, llamada ribulosa-1,5-bisfosfato. Las enzimas involucradas en este ciclo son dependientes de la temperatura, tanto en sus velocidades máximas como en las concentraciones que requieren para alcanzarlas (Davison 1991). En general, la temperatura incrementa la probabilidad de que una enzima y sus sustratos se encuentren, incrementando la velocidad de catálisis.

Las reacciones fotoquímicas primarias son independientes de la temperatura. Una parte de la cadena de transporte de electrones que se puede ver afectada por la temperatura es la difusión de la plastoquinona en la membrana, para enlazar al fotosistema II (PSII) con el complejo citocromo b/f, que se encarga de crear el gradiente de protones a ambos lados de la membrana (Davison 1991). Una membrana se vuelve menos viscosa con incrementos de temperatura, permitiendo una mayor difusión de los metabolitos dentro de ella. La temperatura también afecta al transporte no cíclico de electrones, que es más eficiente con mayor temperatura (Raven y Geider 1988).

La separación de cargas fotosintética se realiza en dos estructuras macromoleculares con características estructurales y funcionales diferentes, llamadas fotosistema I y fotosistema II. En cada fotosistema, existen muchas moléculas de clorofila a además del centro de reacción. La función de estos pigmentos es absorber fotones y transferir su energía al centro de reacción (Gantt 1996).

Los diferentes pigmentos absorben luz únicamente a determinadas longitudes de onda. La clorofila a, por ejemplo, presenta dos picos de absorción con una "ventana" en longitudes de onda intermedias, que corresponden al color verde. Los pigmentos accesorios generalmente cubren parte de esta "ventana" (Stryer 1995).

Toda la energía que se utiliza para la fotosíntesis es canalizada a la clorofila a (Stryer 1995). Algunos pigmentos no pueden transmitir la energía que captan directamente a ella, por lo que necesitan de uno o más "intermediarios". En las algas rojas, así como en las cianobacterias, el PSII está acoplado a unas estructuras compuestas de varias moléculas, llamadas ficobilisomas

(Gantt 1996). En algas rojas, estas estructuras incluyen los pigmentos ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) y aloficocianina (AFC), y varias proteínas estructurales (Gantt 1996). Estos pigmentos tienen capacidad de absorber luz en diferentes partes de la ventana verde de la clorofila *a*, con un ligero traslape en sus picos de absorción. Se ha determinado que la energía es transmitida de la FE a la FC y de ésta a la AFC, de donde se transmite a la clorofila *a* (Talarico 1996). De esta manera, se acumula la energía absorbida por los cuatro pigmentos. Espacialmente, la AFC se encuentra en el centro (o núcleo) de los ficobilisomas, y la FC y la FE forman cilindros alrededor de ella (Talarico 1996).

Diferencias en las concentraciones de clorofila *a* o de biliproteínas pueden causar diferencias fisiológicas en las algas (Kursar et al. 1983). La energía disponible para el centro de reacción puede variar debido a un cambio en la absorción de cada tipo de pigmento, según su concentración, así como debido a cambios en la transmisión de energía hasta el centro de reacción.

Las diferencias en la concentración de pigmentos accesorios también podrían causar diferencias en la

fotoinhibición de la fotosíntesis a altas irradiancias. Un exceso de luz puede afectar el aparato fotosintético de un organismo, disminuyendo la capacidad de canalizar electrones a la fotosíntesis (Häder et al. 1998). La reducción de la fotosíntesis observada a altas irradiancias puede ser el resultado de un fotodaño o de una estrategia de protección, llamada fotoinhibición dinámica, en la que la energía se canaliza hacia diferentes mecanismos de disipación. El fotodaño se distingue de la fotoinhibición porque su recuperación es más lenta. Los pigmentos accesorios podrían ayudar a disipar la energía antes de que llegue a los centros de reacción (Figueroa et al. 1997). Por lo tanto, es posible que existan diferencias en el fotodaño o en la activación de la fotoinhibición dinámica en las algas con diferente pigmentación.

En algunas especies de algas, existen grupos de individuos con diferencias fenotípicas que se conservan durante años de propagación vegetativa, y son probablemente el resultado de diferencias genéticas. Algunos de estos morfotipos presentan variaciones en las concentraciones de algunos pigmentos. En la Rhodophyta *Kappaphycus alvarezii* existen diferentes morfotipos en la naturaleza y en cultivos, con diferencias marcadas en su color. El objetivo

de este trabajo es caracterizar las diferencias en los pigmentos antena de un morfotipo rojo y un morfotipo verde de *K. alvarezii* y analizar el efecto de las diferencias pigmentarias en la fisiología fotosintética del alga.

Antecedentes

Kappaphycus alvarezii es un alga roja que se cultiva en Asia y Oceanía para la extracción de carragenanos (Doty 1987, Trono 1992, Trono y Lluisma 1992). Los acuacultores siembran propágulos seleccionados de la cosecha anterior en cuerdas sumergidas (Doty 1987, Trono 1992, Azanza-Corrales et al. 1992). De esta manera, cada generación se compone de clones de la generación anterior.

A pesar de que las condiciones de cultivo se han mantenido similares a lo largo de los años, se han encontrado de manera simultánea individuos con diferencias morfológicas notables (Doty y Norris 1985, Trono 1992), incluyendo diferencias en su coloración (Azanza Corrales 1990, Azanza Corrales y Sa-a 1990), que varía desde el verde-amarillo hasta el rojo intenso (Dawes 1992). La persistencia de estas diferencias sugiere que se deben a mutaciones genéticas, y que ninguno de los morfotipos ha sido seleccionado en contra, ya sea natural o artificialmente.

La coloración de un alga varía de acuerdo a su composición pigmentaria (Kursar et al. 1983b). Dawes (1992) determinó que un morfotipo verde de *K. alvarezii* tiene

menos FE que un morfotipo café. La FC y la AFC varían menos que la FE en respuesta a cambios en el medio ambiente (Talarico 1996). Sin embargo, no existen estudios comparativos del contenido de FC y AFC en los diferentes morfotipos de *K. alvarezii*.

Los pigmentos forman parte esencial del aparato fotosintético de un alga (Gantt 1996). Por lo tanto, las diferencias en la pigmentación pueden verse reflejadas en la respuesta fotosintética de los diferentes morfotipos de *K. alvarezii*. Dawes (1992) encontró diferencias en la eficiencia fotosintética (α), de algunos morfotipos, presentándose un mayor valor de α en un morfotipo café, con mayor contenido de FE. Este autor encontró que un morfotipo con valores significativamente menores de clorofila *a*, presenta un valor de α reducido. La fotosíntesis máxima (P_{max}), bajo saturación de luz, no fue significativamente diferente entre los morfotipos analizados por este autor. La temperatura en centros acuaculturales donde se cultiva *K. alvarezii* varía hasta de 15 a 30°C anualmente (Ohno et al. 1994). Sin embargo, se desconoce el efecto de la temperatura sobre la fisiología fotosintética de los

diferentes morfotipos de *K. alvarezii* a diferentes temperaturas.

La fotosíntesis de un alga puede verse disminuida por altas irradiancias, tanto de luz fotosintéticamente activa (LFA; 400-700 nm) como de luz ultravioleta (UV; Jiménez et al. 1998, Hanelt 1998). Wood (1989) reporta que *Eucheuma striatum* produce compuestos que absorben luz UV en respuesta a altas intensidades de luz UV. La producción de aminoácidos tipo micosporina, que tienen una absorción elevada de luz UV, es común en algas rojas que habitan en áreas expuestas a altas irradiancias, especialmente en latitudes bajas (Karsten et al. 1998, Franklin et al. 1999). Sin embargo, a intensidades muy elevadas de luz UV, los compuestos producidos por *E. striatum* no son suficientes para prevenir el fotodaño (Wood 1989). En el laboratorio, se han observado diferencias en la presencia de fotoinhibición a irradiancias de hasta $800 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de diferentes morfotipos de *K. alvarezii* (Dawes 1992). Este autor reporta una reducción de los valores de P_{max} a irradiancias del orden de $800 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ en dos morfotipos con coloración verde, mientras que en otros morfotipos no encontró fotoinhibición de la fotosíntesis. Sin embargo, se

desconoce el efecto de la LFA y luz UV a irradiancias naturales sobre la fotosíntesis de los diferentes morfotipos de *K. alvarezii*.

El crecimiento de un alga está íntimamente relacionado con la fotosíntesis y, por lo tanto, con su composición pigmentaria. Sin embargo, existen pocos trabajos que comparan el crecimiento de diferentes morfotipos de *K. alvarezii*. Dawes et al. (1994) encontraron un crecimiento mayor de un morfotipo café en relación a uno verde en el laboratorio, pero la diferencia no se presentó en el campo. Ohno et al. (1994) tampoco encontraron diferencias en el crecimiento de diferentes morfotipos de *K. alvarezii* en el campo. En un estudio realizado por Hurtado-Ponce (1995), se encontraron diferencias en el crecimiento de un morfotipo verde y uno rojo. Sin embargo, las diferencias se presentaron únicamente en otoño a 50 cm de profundidad.

Hipótesis de trabajo

Pigmentos

Existen diferencias en las concentraciones de ficoeritrina, ficocianina, y aloficocianina en los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii*.

Crecimiento

El morfotipo de *Kappaphycus alvarezii* que tiene las concentraciones mayores de pigmentos tiene un crecimiento mayor, debido a que su aparato fotosintético está más completo.

Fotosíntesis

El morfotipo de *Kappaphycus alvarezii* que tiene las concentraciones mayores de pigmentos tiene una fotosíntesis máxima mayor en un intervalo amplio de temperatura, debido a que su aparato fotosintético está más completo.

El morfotipo de *Kappaphycus alvarezii* que tiene las concentraciones mayores de pigmentos tiene una eficiencia fotosintética mayor en un intervalo amplio de temperatura, debido a que su aparato fotosintético está más completo.

Fotoinhibición

El morfotipo de *Kappaphycus alvarezii* que tiene las concentraciones mayores de pigmentos presenta una fotoinhibición de la fotosíntesis menor, tanto por luz fotosintéticamente activa como por luz ultravioleta, debido a que su aparato fotosintético está protegido de la luz por más pigmentos.

Material y Métodos

Material algal

Individuos con coloración roja y verde del alga roja *Kappaphycus alvarezii*, procedentes de Filipinas, se mantuvieron en el laboratorio en un recipiente de 30 L por aproximadamente dos años. Las algas se mantuvieron con aireación continua a aproximadamente 25°C y una concentración de 250 μM NaNO_3 . Los organismos fueron provistos de aproximadamente 100 μmol $\text{quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz fotosintéticamente activa con una lámpara fluorescente blanca (cool white light). Se realizaron recambios de agua y fertilización una vez a la semana.

Análisis pigmentario

La extracción de clorofila a se realizó homogeneizando aproximadamente 0.1 g de tejido en acetona al 90% (v/v), en un homogenizador de tejido de vidrio. El homogeneizado se centrifugó a 2000 g por 15 minutos y se determinó su absorbancia a 664 nm y 647 nm con un espectrofotómetro. Los niveles de clorofila a se calcularon utilizando la ecuación derivada por Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/ml}) = 11.93 A_{664} - 19.3 A_{647}$$

donde A_λ es la absorbancia a la longitud de onda λ . Se determinó el espectro de absorción de los extractos de 400 nm a 750 nm.

Las biliproteínas FE, FC y AFC se extrajeron con un homogeneizador de vidrio y una solución 0.1 M NaHPO_4 (pH 6.9), 1 mM EDTA y 1 mM DTT. La absorbancia del homogenado se determinó en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 565 nm, 620 nm y 650 nm. Las concentraciones de AFC y FC se calcularon utilizando las ecuaciones descritas en Lobban *et al.* (1988):

$$\text{AFC (mg gPH}^{-1}\text{)} = A_{620}/6.29 - 0.72 A_{650}/6.29$$

$$\text{FC (mg gPH}^{-1}\text{)} = A_{650}/5.79 - 0.191 A_{620}/5.79$$

donde A_λ es la absorbancia a la longitud de onda λ . La concentración de FE se calculó con la ecuación propuesta por Dawes (1981):

$$\text{FE} = 12.4 A_{565}$$

Además se determinó el espectro de absorción de las biliproteínas de 550 a 750 nm.

Proteínas totales

La concentración de proteínas totales en el tejido de los morfotipos verde y rojo de *K. alvarezii* se determinó

mediante colorimetría de acuerdo al método propuesto por Bradford (1976). Las proteínas de aproximadamente 0.1 g de tejido del morfotipo rojo y verde se extrajeron con una solución amortiguadora (0.1 M Na_2HPO_4 (pH 6.9), 1 mM EDTA, 1% PVP y 1 mM DTT). La concentración de proteínas del extracto se determinó mediante una curva de calibración, utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Crecimiento

El crecimiento de ambos morfotipos de *K. alvarezii* se evaluó durante 120 días bajo condiciones de cultivo en un tanque exterior de 100 L, con niveles naturales de luz y temperatura. El agua del tanque se cambió dos veces a la semana, utilizando agua de mar filtrada (0.2 μm) enriquecida con 250 μM NaNO_3 . Cinco individuos del morfotipo rojo, y cinco del morfotipo verde se marcaron con etiquetas de plástico, y se determinó su incremento en peso dos veces a la semana. El crecimiento diario se determinó utilizando la ecuación:

$C(\% \text{ d}^{-1}) = [(W_t / W_0)^{1/t} - 1] 100$, donde W_t es el peso después de t días de incubación y W_0 es el peso inicial.

Fotosíntesis en función de la irradiancia

La producción de oxígeno en función de la irradiancia se evaluó polarográficamente en segmentos de tejido de ambos morfotipos de *K. alvarezii* bajo diferentes condiciones experimentales. Las mediciones se realizaron en cámaras de borosilicato refrigeradas de 5 mL. Los cambios en la concentración de oxígeno en las cámaras se evaluaron con electrodos tipo Clark (Rank Brothers, Inglaterra) y con agitación continua. La luz con la que se activó la fotosíntesis se obtuvo de lámparas de 500 W (GE, quartzline) con bulbos incandescentes. Los niveles de irradiancia de 0 a 700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ se obtuvieron colocando filtros de densidad neutra entre la muestra y la fuente de luz. Los resultados se ajustaron al modelo exponencial descrito por Webb et al. (1974) utilizando un algoritmo no lineal de ajuste directo (Sigma Plot, Jandel Scientific). El modelo relaciona la fotosíntesis y la irradiancia de la siguiente manera:

$$P = P_{\max} (1 - e^{(-\alpha I / P_{\max})}) - R$$

donde P es la fotosíntesis a la irradiancia I, P_{\max} es la fotosíntesis máxima, α es la eficiencia fotosintética y R es la respiración. Los parámetros P_{\max} y α se utilizaron para comparar la fisiología fotosintética de los dos

morfotipos. Adicionalmente, se calculó el coeficiente de subsaturación I_K , que es la razón P_{max}/α . El coeficiente de subsaturación es una medida de la cantidad de luz necesaria para saturar la fotosíntesis.

Efecto de la temperatura sobre la fotosíntesis

Las respuestas fotosintéticas de ambos morfotipos de *K. alvarezii* a la irradiancia se evaluaron en función de la temperatura. Las mediciones se realizaron a 8, 15, 20, 25, 30 y 37°C, con seis réplicas para cada temperatura y para cada morfotipo. La temperatura de las cámaras se controló con un baño circulatorio a temperatura constante, estableciendo un flujo por un compartimento externo a las cámaras.

Efecto de la calidad de luz sobre la fotosíntesis

La fotosíntesis con luz roja del morfotipo rojo y verde de *K. alvarezii* se evaluó para determinar la contribución de la FE a la fotosíntesis. La producción de oxígeno en luz roja se evaluó en ambos morfotipos en función de la irradiancia a 25°C. Un filtro rojo ($\lambda > 600$ nm) se colocó entre la fuente de luz y la cámara de incubación (Fig. 1). La irradiancia se varió entre 0 y 700

$\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ utilizando filtros neutros. Las curvas fotosintéticas se hicieron cuatro veces por cada morfotipo y se realizaron controles con luz blanca.

Rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II

El rendimiento cuántico del PSII se evaluó con un fluorímetro de pulsos de amplitud modulada (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Alemania). El rendimiento cuántico se determinó como $\Delta F/F_m'$, donde ΔF es la diferencia entre la fluorescencia máxima en el tejido expuesto a la luz (F_m') y la fluorescencia basal (F_t) en las condiciones en que se encuentra el tejido (Genty et al. 1989). Los valores de F_m' y F_t se obtienen utilizando una luz muy tenue (650 nm , $0.3 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), que no activa la fotosíntesis de forma significativa, pero sí produce fluorescencia. Esta luz se distingue de la luz exterior porque tiene amplitud modulada. Las mediciones de F_m' se realizan después de aplicar un pulso de saturación de luz (0.4 s , aprox. $9000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), que reduce todos los centros de reacción y suprime la actividad del PSII. La disminución de $\Delta F/F_m'$ se utilizó como parámetro de la fotoinhibición.

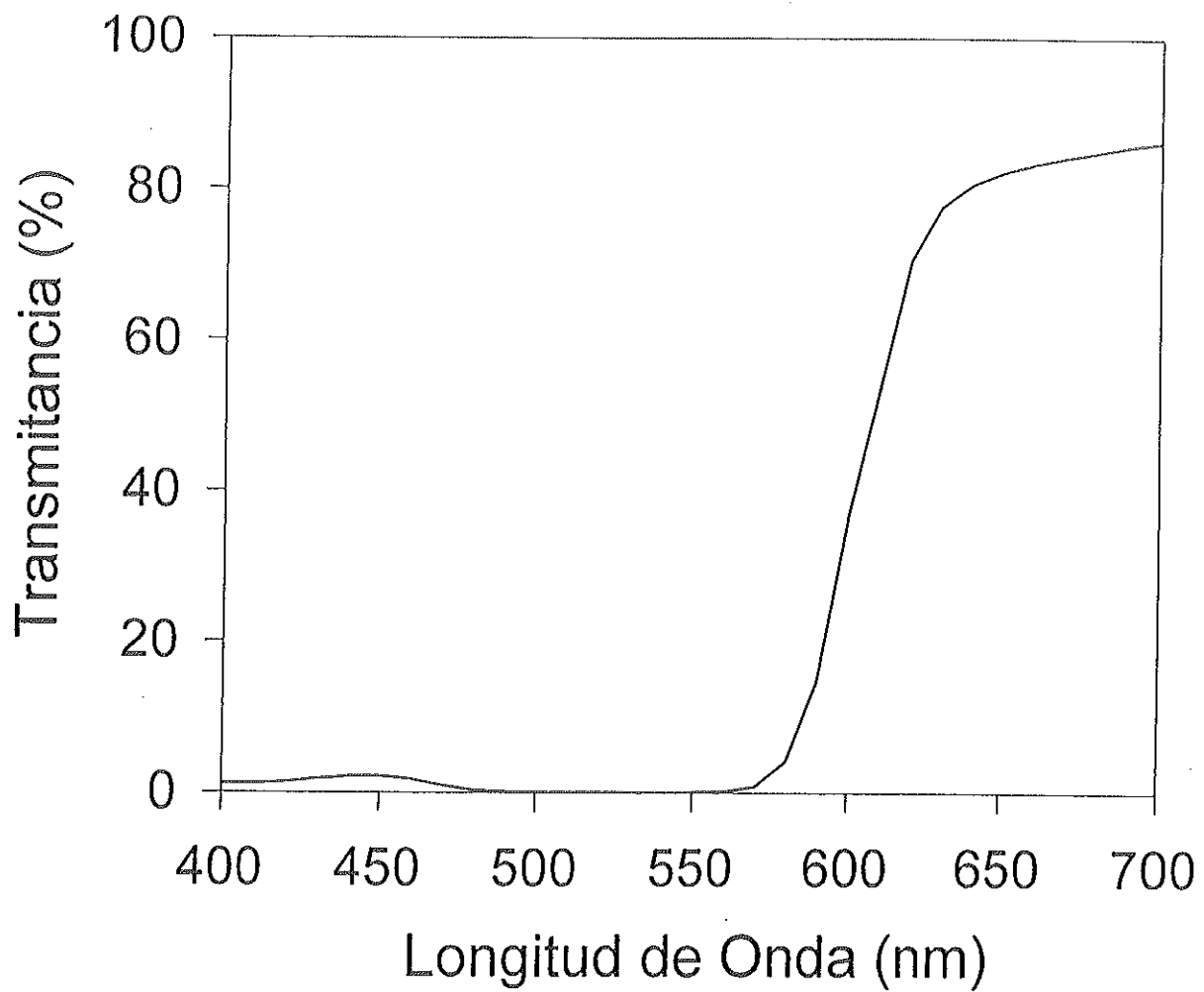


Figura 1. Transmitancia del filtro rojo utilizado para obtener luz roja.

Efecto de la luz ultravioleta sobre el rendimiento cuántico efectivo

Individuos del morfotipo rojo y verde de *K. alvarezii* fueron expuestos a tres tratamientos de luz solar filtrada durante una hora al mediodía, y se determinó $\Delta F/F_m'$ antes y después de cada uno de los tratamientos. Los tratamientos consistieron en filtrar parte de la luz incidente, para obtener sólo luz fotosintéticamente activa (LFA) (Ultraphan, Digrefa GmbH, Alemania, $\lambda > 395$ nm), LFA + UV-A (Folex GmbH, Alemania, $\lambda > 320$ nm), y LFA + UV-A + UV-B (Ultraphan, Digrefa GmbH, Alemania, $\lambda > 295$ nm) (Fig. 2). Los experimentos se realizaron al mediodía, con una irradiancia de aproximadamente 450 W m^{-2} ($1890 \text{ } \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de LFA, 55 W m^{-2} (aprox. $231 \text{ } \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de UV-A y 1.5 W m^{-2} (aprox. $6.3 \text{ } \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de UV-B (Aguirre-von-Wobeser et al. 2000). Posteriormente, se monitoreó la recuperación de $\Delta F/F_m'$ en el laboratorio incubando los ejemplares a 17°C , una irradiancia de $10 \text{ } \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y sin luz ultravioleta.

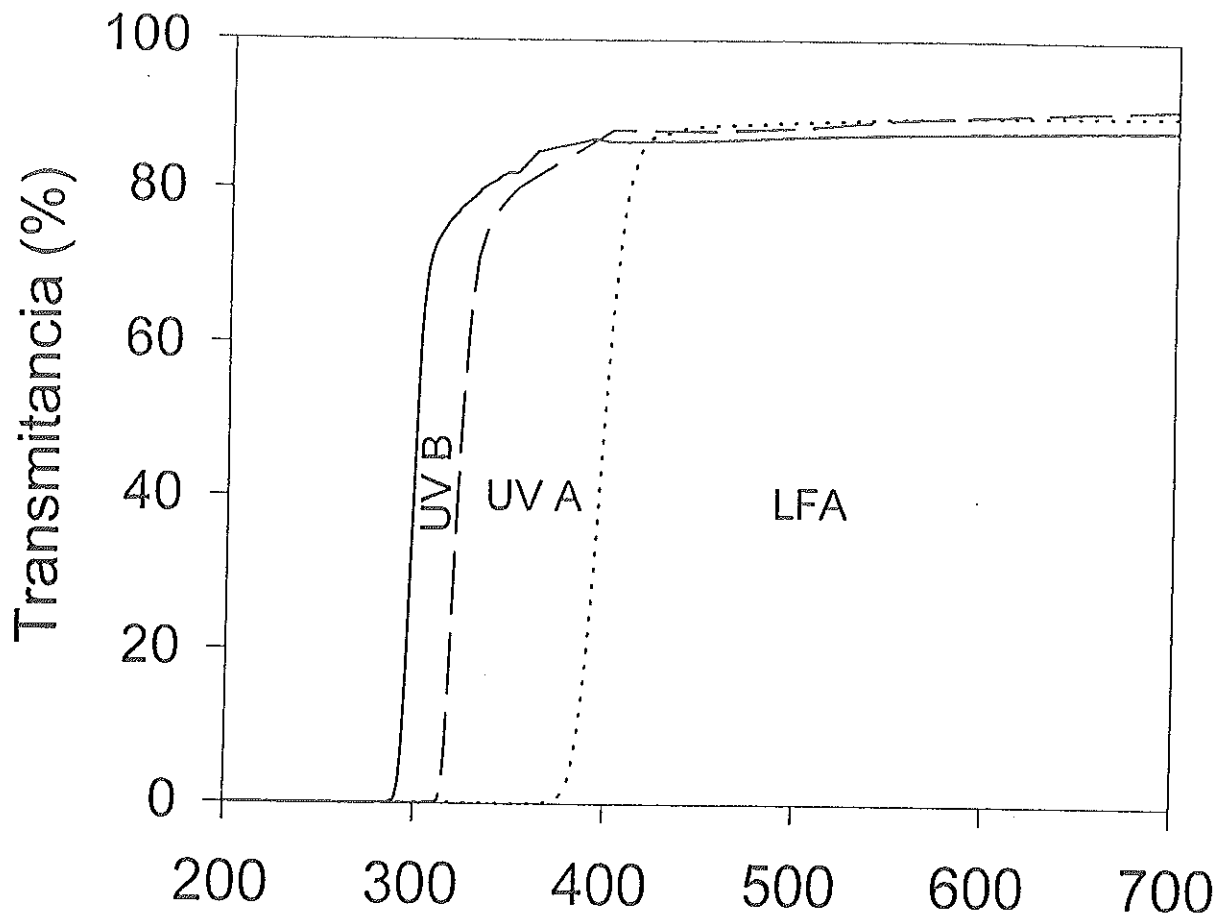


Figura 2. Transmittancia de los filtros utilizados para obtener tratamientos de UV-A + UV-B + LFA, UV-A + LFA y LFA

Análisis estadístico

Las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento y en las concentraciones de pigmentos de *K. alvarezii* se evaluaron utilizando pruebas t de student (Sokal y Rohlf 1981). La significancia de las diferencias en P_{max} , α , R e I_k entre los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* a diferentes temperaturas, y en luz roja, fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) simple, después de verificar normalidad y homocedasticidad de los datos. Así mismo, las disminuciones en $\Delta F/F_m'$ durante los tratamientos con diferentes calidades de luz, tanto de LFA como de luz UV, fueron sujetas a un ANOVA simple, para evaluar su significancia estadística. La pendiente de recuperación de los valores de $\Delta F/F_m'$ fue comparada con un análisis de covarianza (ANCOVA). Para detectar valores estadísticamente significativos se utilizó la prueba a *posteriori* de Tukey.

Resultados

Pigmentación y proteínas totales

Los espectros de absorción de los extractos de pigmentos de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* presentaron diferencias, bajo las mismas condiciones de cultivo (Fig. 3). El espectro de absorción del extracto de acetona fue muy similar en los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii*, y presentó los máximos de absorción característicos de la clorofila *a*, en 440 y 665 nm. A diferencia del extracto de clorofila *a*, el espectro de absorción de las biliproteínas, presentó diferencias entre los dos morfotipos. En el caso del morfotipo rojo, se presentaron máximos de absorción a los 565, 615 y 680 nm, correspondientes a la FE, FC y AFC respectivamente. Los máximos de absorción de la FC y AFC fueron del 37 y 50% de la magnitud del máximo de absorción de la FE en el morfotipo rojo. El extracto de biliproteínas del morfotipo verde presentó los máximos de absorción correspondientes a la FE, FC y AFC. Sin embargo, los máximos de absorción de la FC y la AFC son de aproximadamente 85% de la magnitud del máximo de absorción de la FE en el morfotipo verde.

Las concentraciones de algunos pigmentos fotosintéticos fueron diferentes en los dos morfotipos de

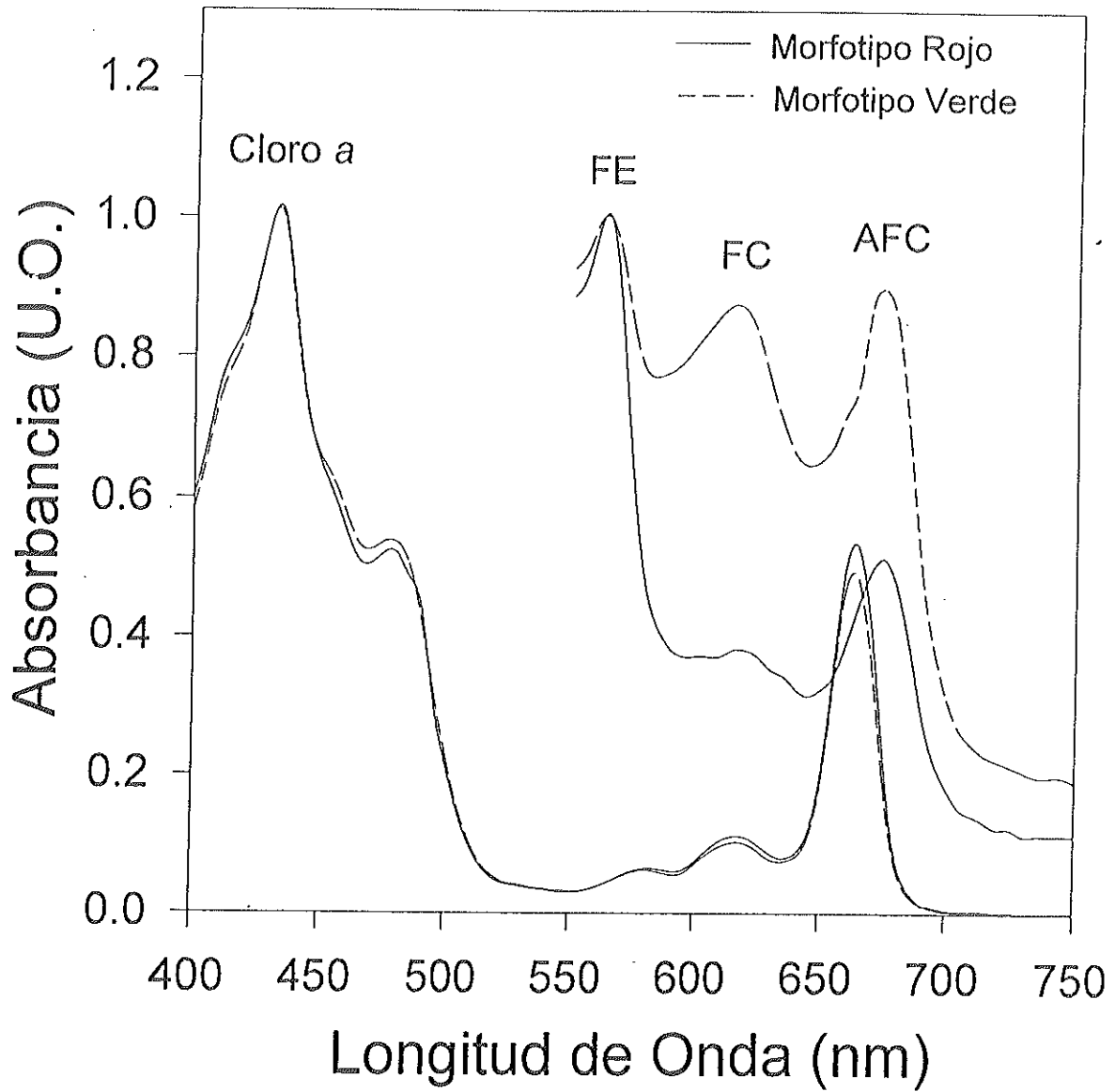


Figura 3. Espectro de absorción de la clorofila a y biliproteínas de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii*

K. alvarezii estudiados, bajo las mismas condiciones de cultivo (Fig. 4). La concentración de clorofila *a* en el tejido de los dos morfotipos fue de aproximadamente 0.06 mg por gramo en peso húmedo (PH) en ambos morfotipos. La concentración de FE fue ligeramente mayor en el morfotipo rojo (aprox. 0.24 mg gPH⁻¹) que en el verde (aprox. 0.20 mg gPH⁻¹), sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Las concentraciones de FC y AFC fueron significativamente ($p < 0.01$) mayores en el morfotipo verde que en el morfotipo rojo de *K. alvarezii*. Los niveles de FC y AFC fueron aproximadamente dos veces mayores en el morfotipo verde que en el rojo, y son la principal diferencia en la pigmentación de ambos morfotipos. La concentración de FC en el morfotipo verde fue de aproximadamente 0.2 mg gPH⁻¹, mientras que en el morfotipo rojo fue de aproximadamente 0.08 mg gPH⁻¹. La concentración de AFC en el morfotipo verde fue de aproximadamente 0.2 mg gPH⁻¹, mientras que en el morfotipo rojo fue de aproximadamente 0.1 mg gPH⁻¹.

La concentración de proteínas totales fue significativamente ($p < 0.05$) diferente entre los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* (Fig. 4). El contenido de proteínas totales en el morfotipo verde fue de

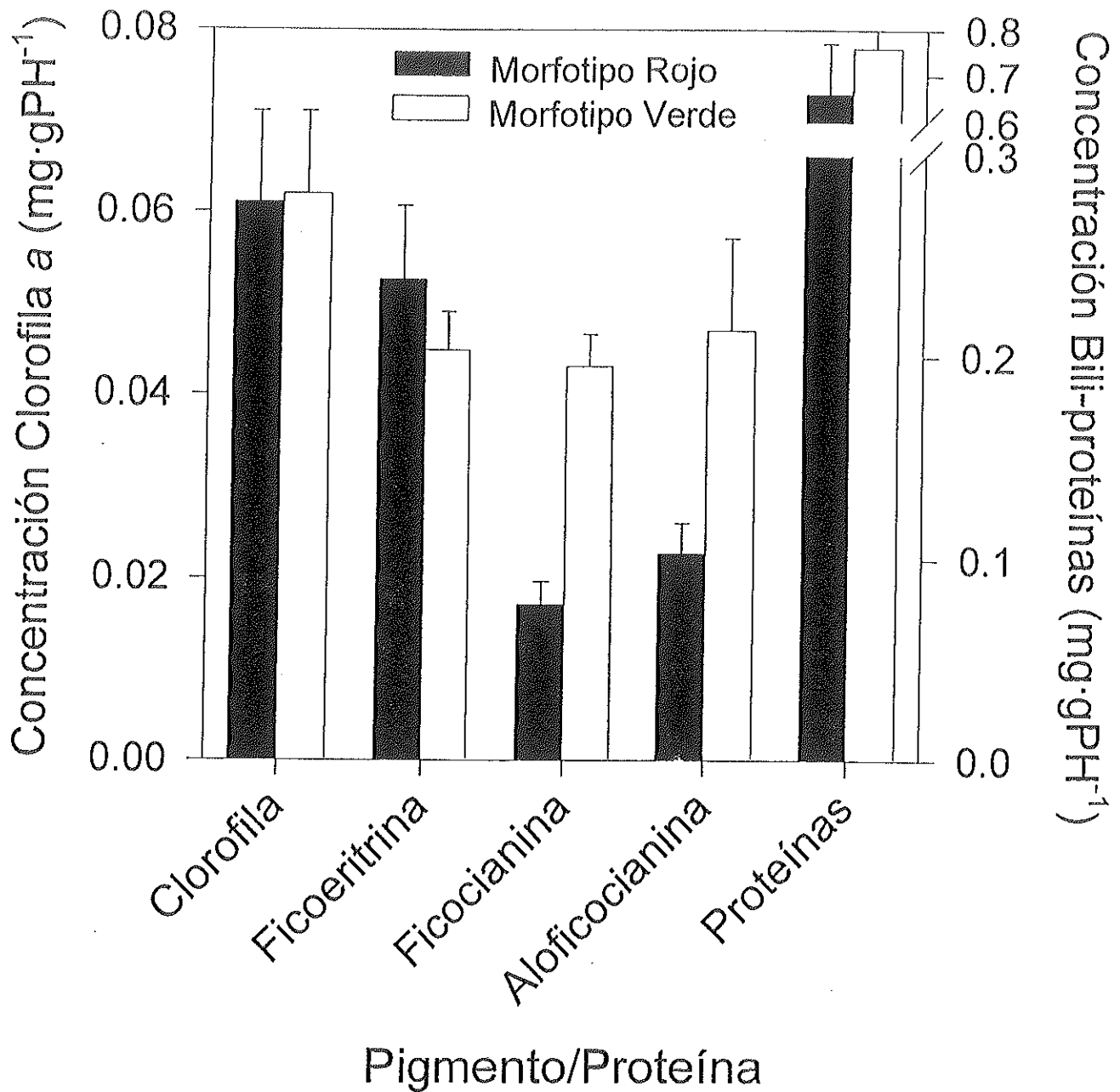


Figura 4. Concentración ($X \pm \text{DE}$, $n > 6$) de clorofila a, ficoeritrina, ficocianina, aloficocinina y proteínas totales en los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii*.

0.76 mg gPH⁻¹, mientras que en el morfotipo rojo fue de 0.66 mg gPH⁻¹.

Crecimiento

Las tasas de crecimiento específico variaron a lo largo del experimento, pero en general no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los dos morfotipos (Fig. 5). Los valores de crecimiento se incrementaron en los primeros 26 días, hasta alcanzar valores cercanos al 5% diario, y fluctuaron alrededor del 3% diario hasta aproximadamente 60 días. Después de los 60 días, las tasas de crecimiento específico decrecieron, y se estabilizaron alrededor del 0.1% diario.

Respuesta de la fotosíntesis a la irradiancia

La respuesta fotosintética a la irradiancia en los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* fue muy similar (Fig. 6). En ambos casos, la fotosíntesis presentó una respuesta clásica de saturación a altas irradiancias. A bajas intensidades de luz, antes de la saturación, la respuesta fotosintética de ambos morfotipos fue lineal.

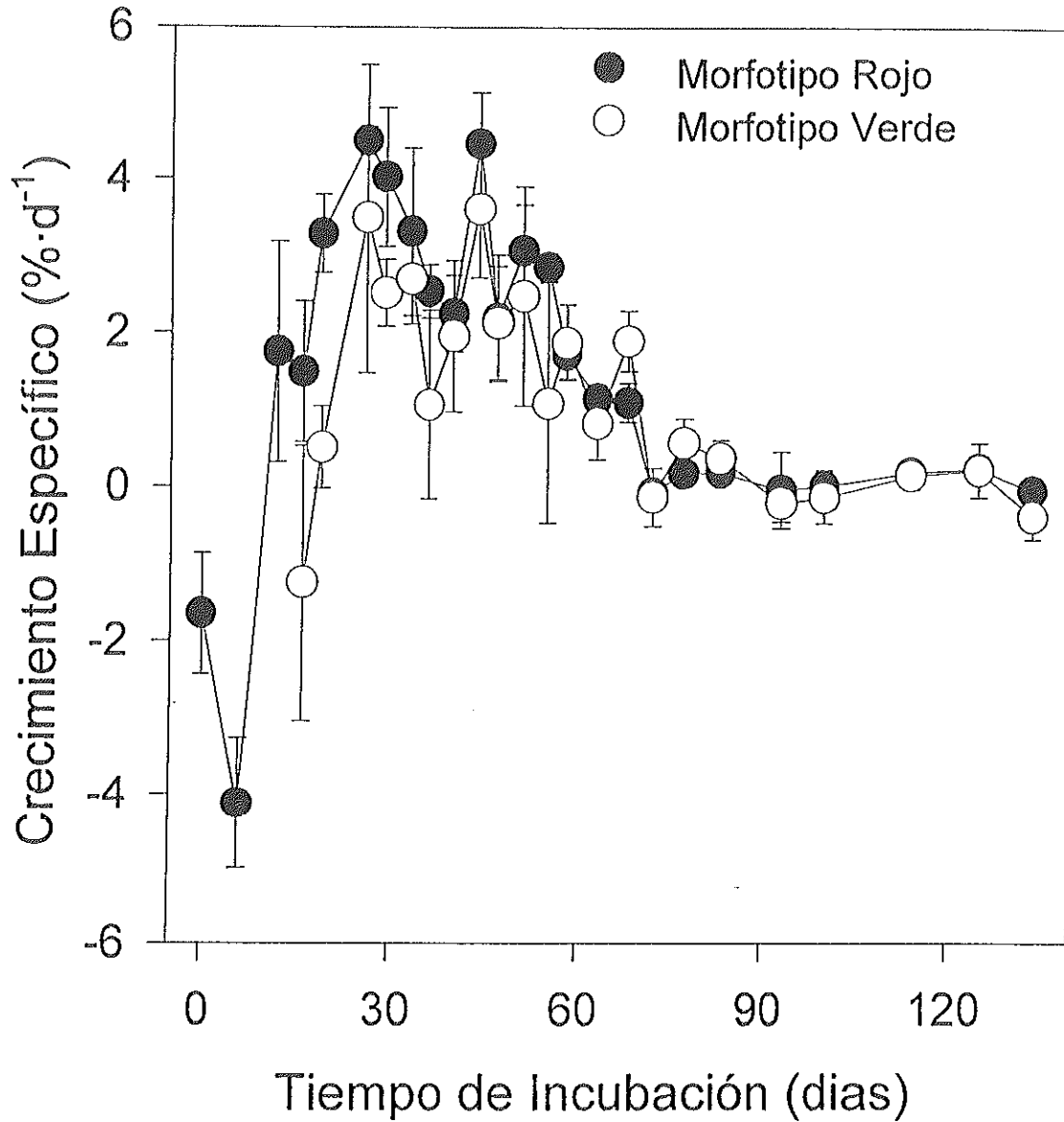


Figura 5: Tasas de crecimiento específico (%) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* en tanques de cultivo exterior.

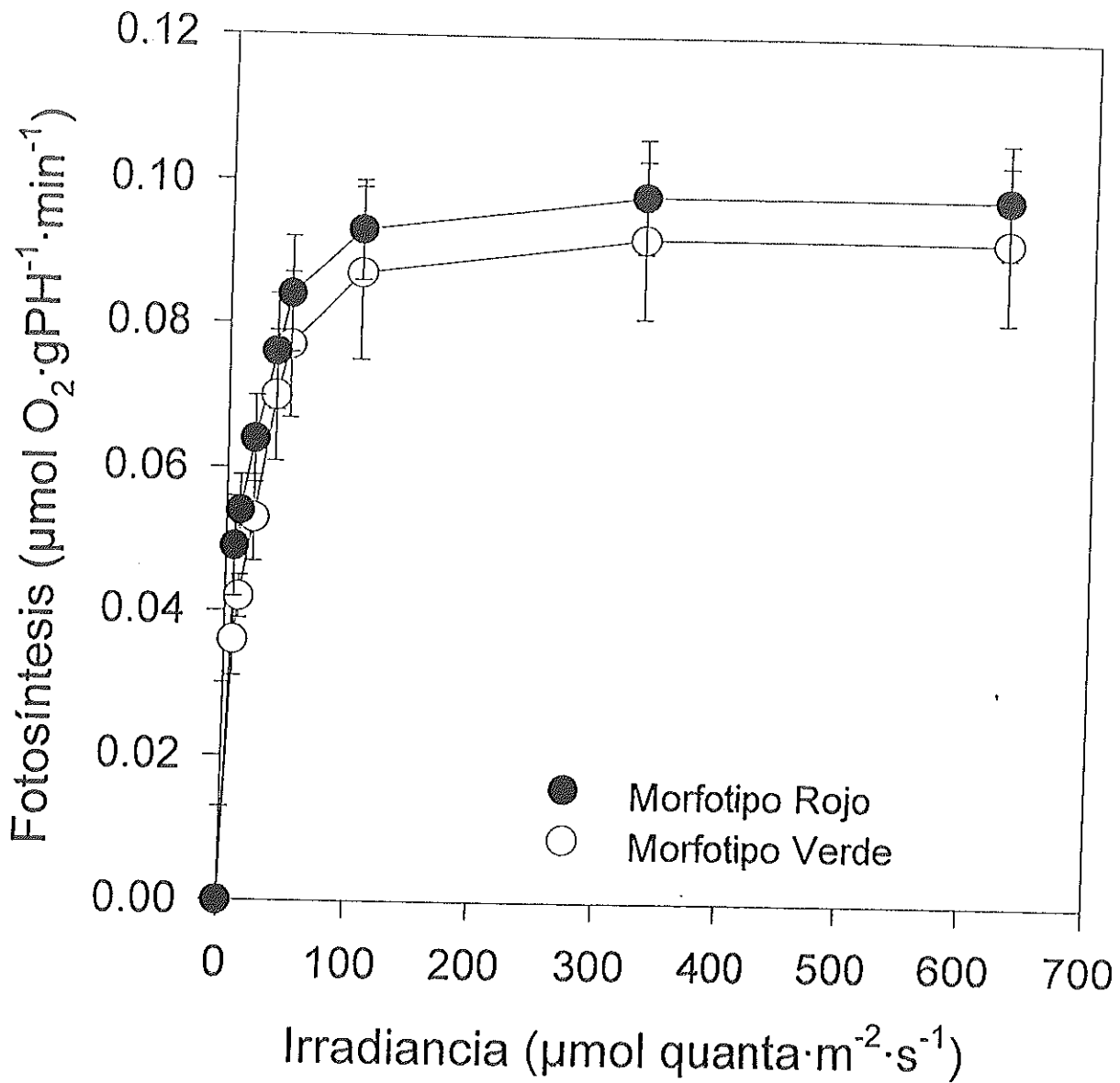


Figura 6. Respuesta fotosíntesis vs. irradiancia de los morfotipos rojo y verdes de *Kappaphycus alvarezii* ($X \pm \text{DE}$, $n = 6$).

Efecto de la temperatura en la fotosíntesis

La respuesta fotosintética de 8 a 37°C bajo luz blanca en general no varió entre los dos morfotipos de *K. alvarezii* (Fig. 7-9). En ambos morfotipos, la fotosíntesis máxima (P_{max}) aumentó de 8 a 30°C, hasta alcanzar un valor de aproximadamente $0.2 \mu\text{mol O}_2 \text{ gPH}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Fig. 7). Sin embargo, los valores de P_{max} disminuyeron drásticamente en ambos morfotipos a los 37 °C.

Al igual que P_{max} , los valores de α variaron con respecto a la temperatura (Fig. 8). Sin embargo, a diferencia de P_{max} , los valores máximos de α (aprox. $0.012 \mu\text{mol O}_2 \text{ gPH}^{-1} \text{ min}^{-1}$) se observaron a los 15°C, y disminuyeron en relación inversa a la temperatura.

El coeficiente de subsaturación (I_k) aumentó exponencialmente con la temperatura hasta alcanzar aproximadamente $110 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a los 30°C (Fig. 9). A los 37°C, el descenso de P_{max} se refleja en I_k , que también desciende abruptamente.

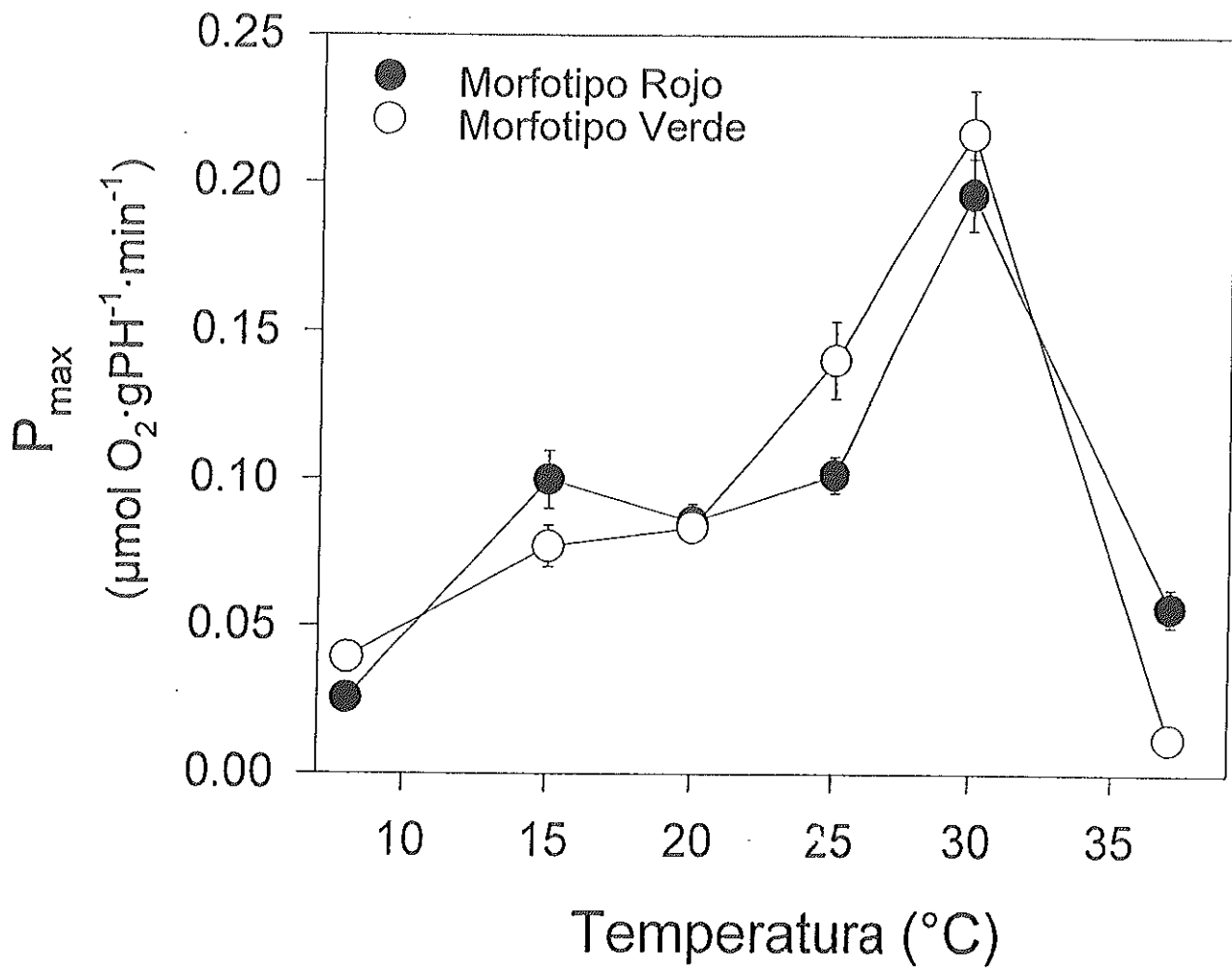


Figura 7. Fotosíntesis máxima (P_{max} , $X \pm DE$, $n = 6$) de los Morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* en función de la temperatura.

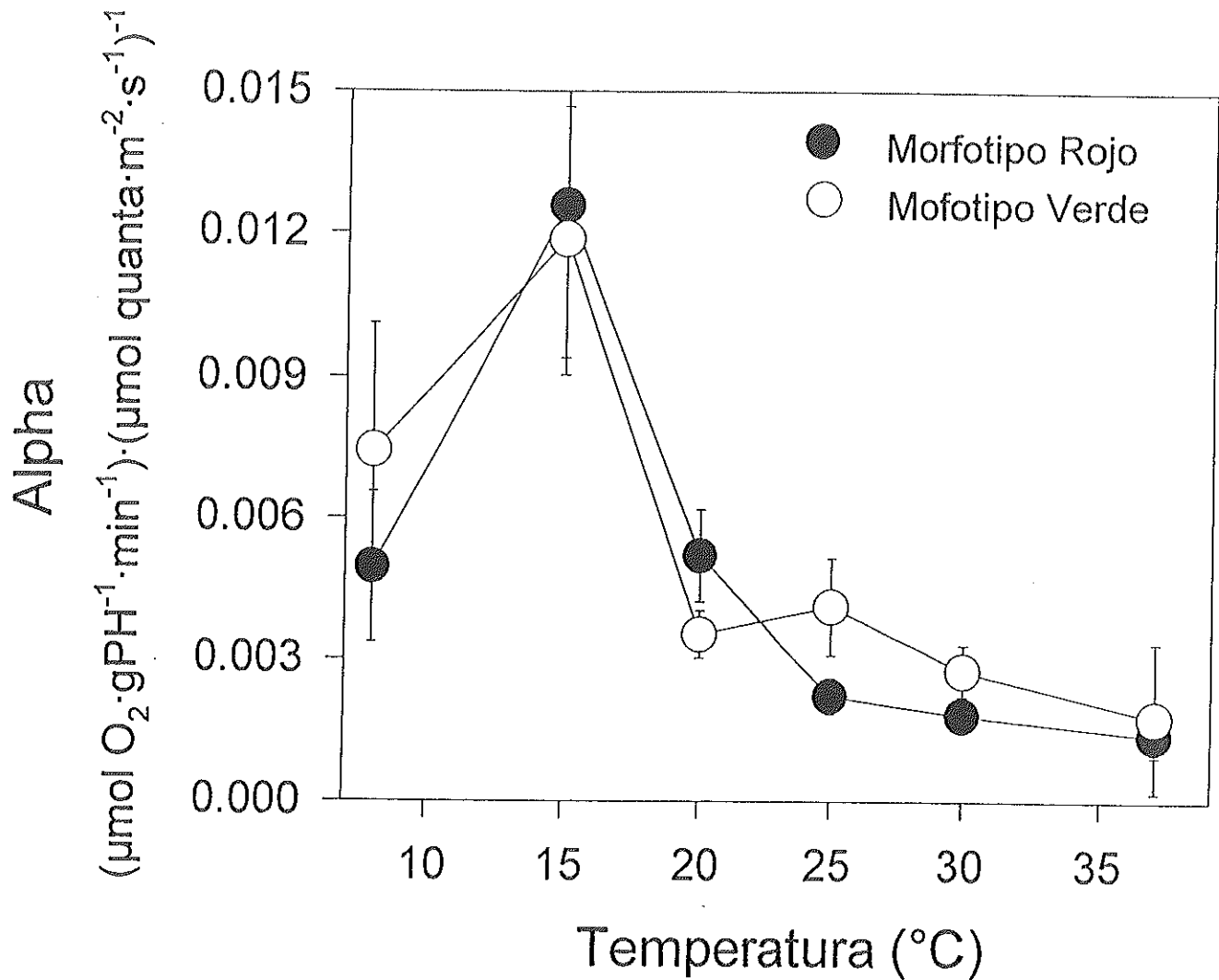


Figura 8. Eficiencia fotosintética (α , $X \pm \text{DE}$, $n = 6$) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* en función de la temperatura.

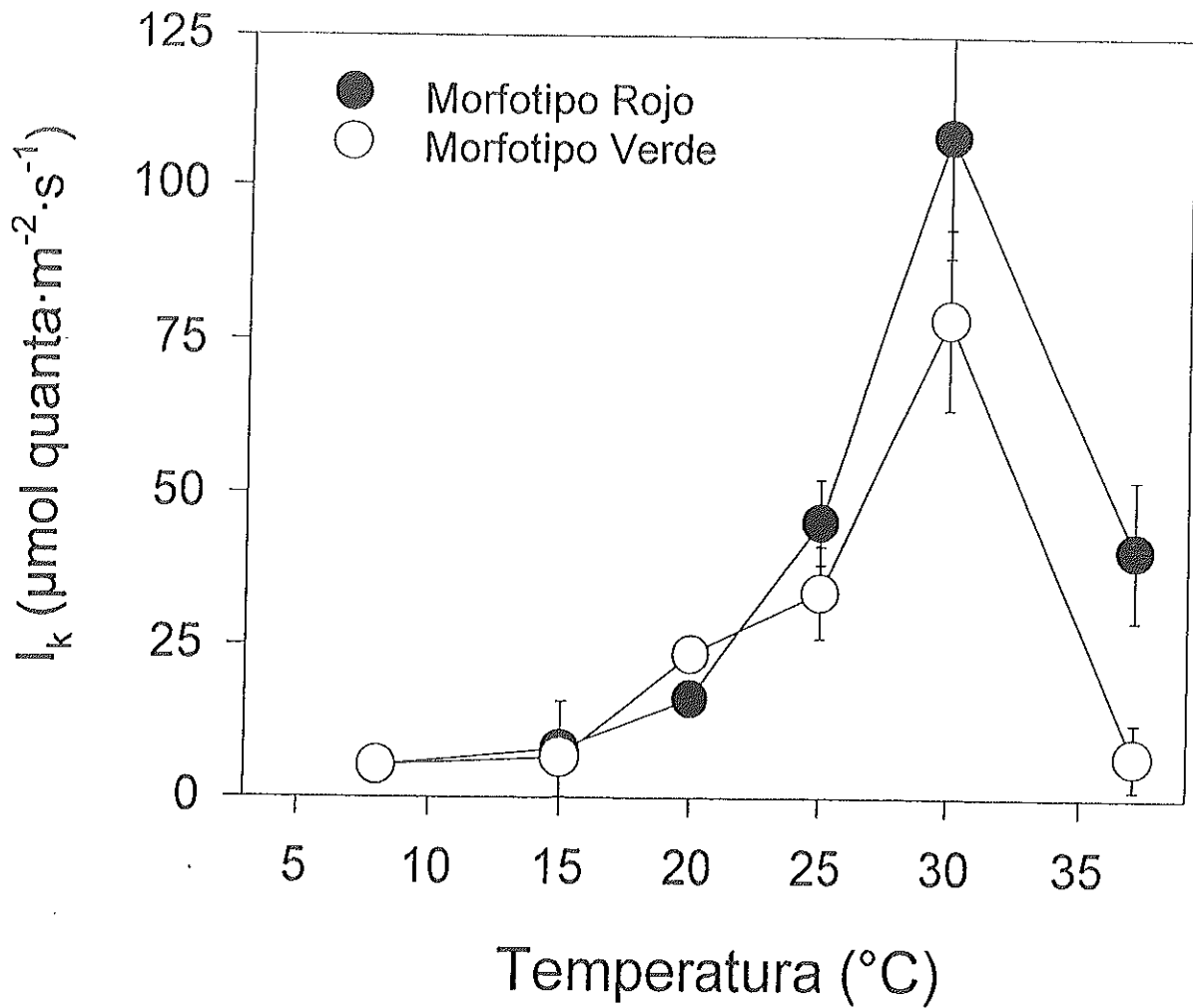


Figura 9. Coeficiente de subsaturación ($\bar{X} \pm \text{DE}$, $n = 6$) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* en función de la temperatura.

La respiración en la obscuridad del morfotipo rojo y verde de *K. alvarezii* no siguió ningún patrón definido en función de la temperatura (Fig. 10). Los valores promedio de respiración fueron de aproximadamente $0.06 \mu\text{mol O}_2 \text{ gPH}^{-1} \text{ min}^{-1}$, que representa aproximadamente el 30-40% de las tasas fotosintéticas. Los valores máximos de respiración se alcanzaron en ambos morfotipos a los 15 y 30°C .

Efecto de la calidad de luz sobre la fotosíntesis

La respuesta fotosintética de *K. alvarezii* a la luz roja fue diferente en los morfotipos rojo y verde. Los valores de P_{max} en el morfotipo rojo disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) cuando la luz experimental fue de longitud de onda (λ) mayor a 600 nm, con respecto a P_{max} en luz blanca (Fig. 11). En el morfotipo verde, P_{max} se incrementó ligeramente, sin embargo, los valores no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$) a los encontrados en luz blanca. Los valores de α se incrementaron en aproximadamente 100% en el morfotipo verde en el tratamiento de luz de λ mayor a 600 nm (Fig. 12). Sin embargo, los valores de α no variaron en el morfotipo rojo en el tratamiento con luz de λ mayor a 600 nm.

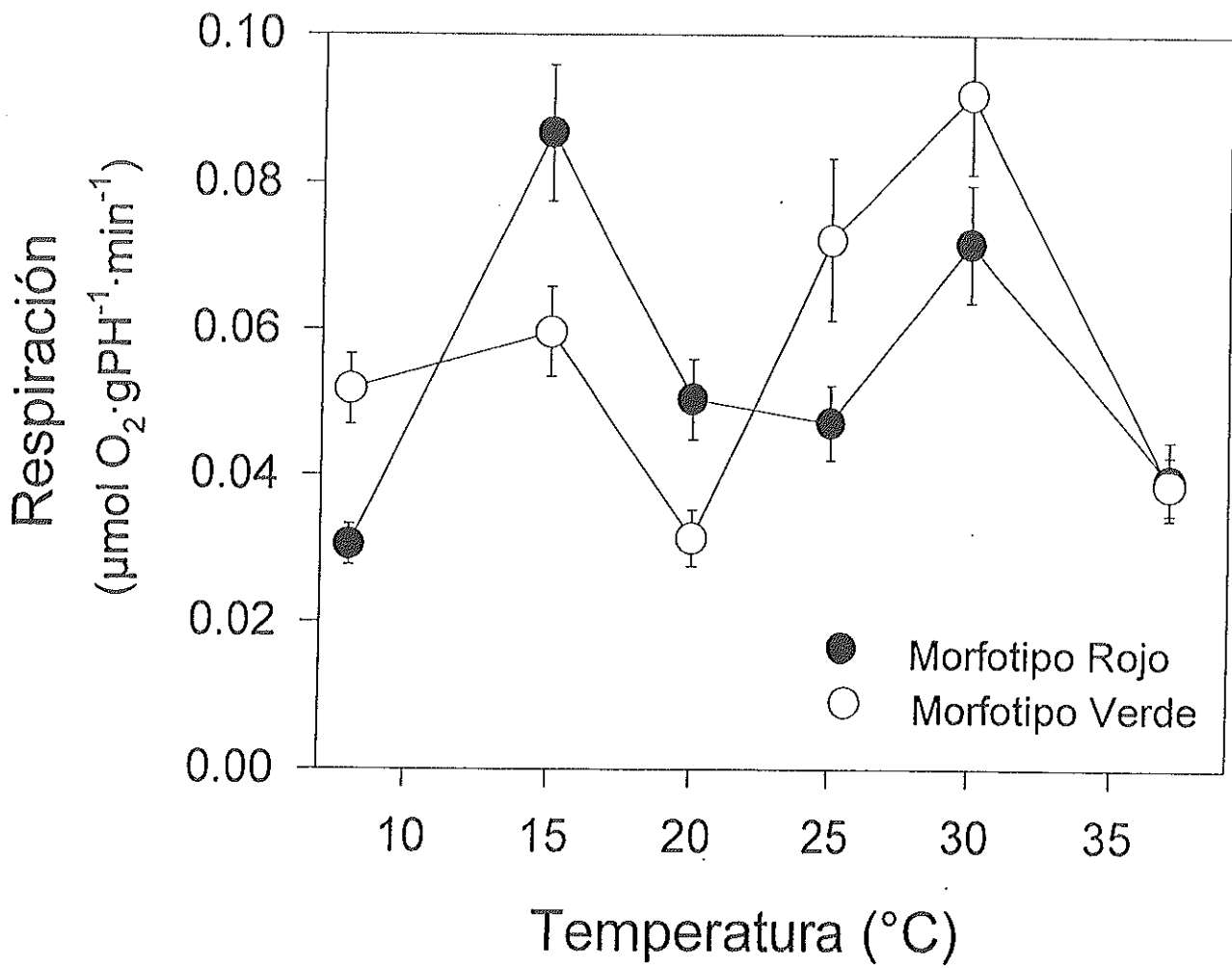


Figura 10. Respiración ($X \pm DE$, $n = 6$) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* en función de la temperatura.

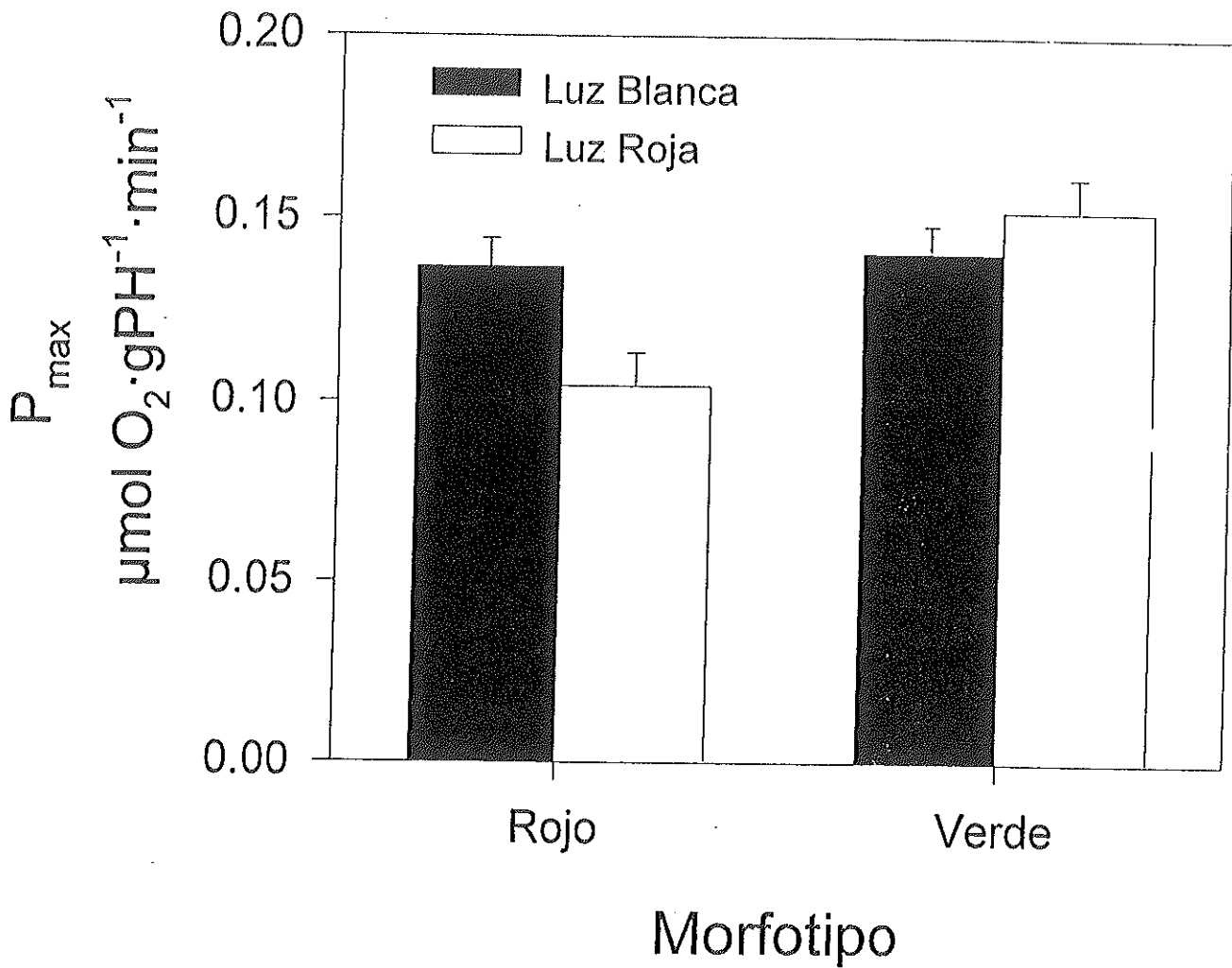


Figura 11. Fotosíntesis máxima ($X \pm DE$, $n = 4$) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* a 25°C en luz roja ($\lambda > 600 \text{ nm}$) y luz blanca ($400 \text{ nm} < \lambda < 700 \text{ nm}$).

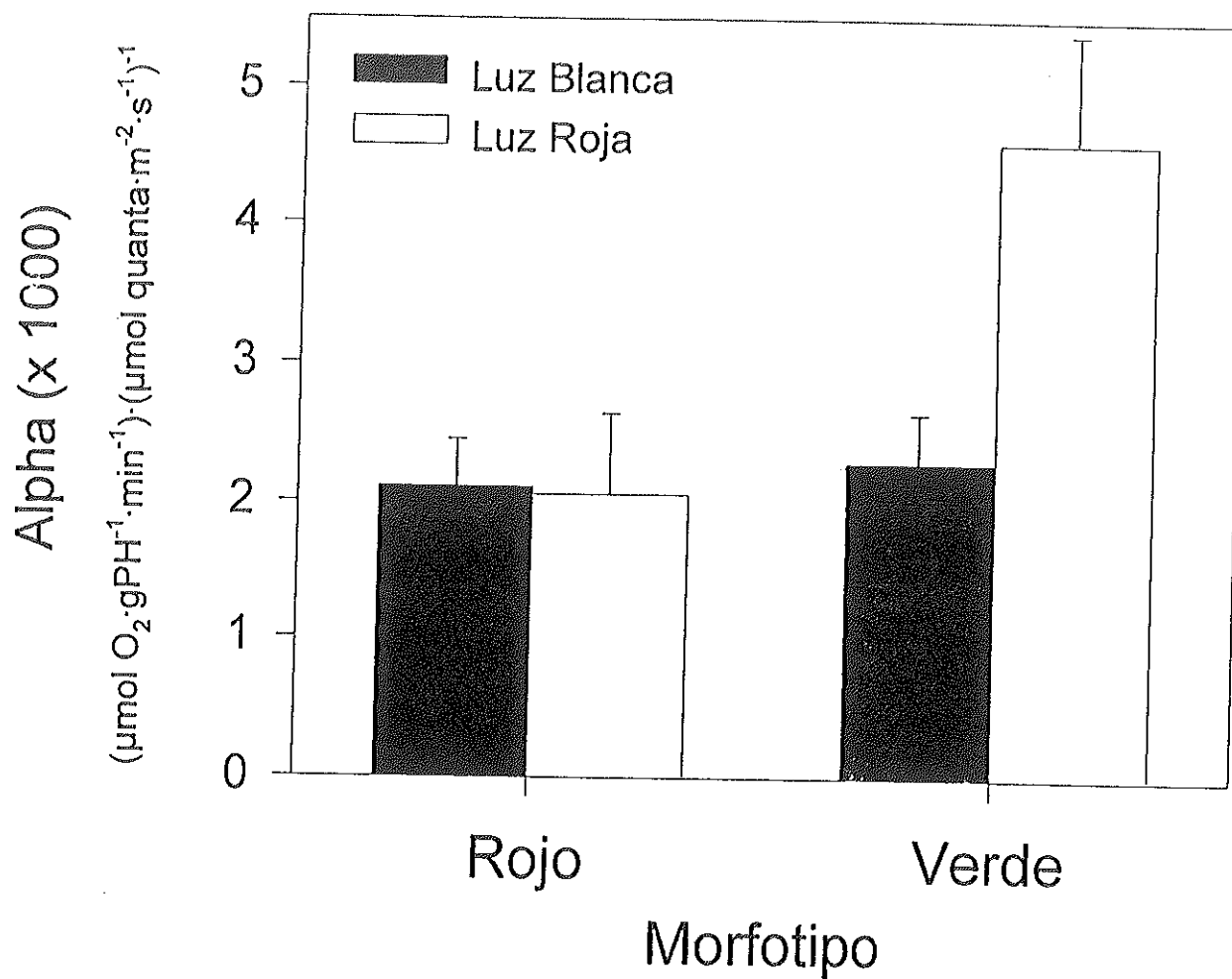


Figura 12. Eficiencia fotosintética (α , $X \pm DE$, $n = 4$) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* a 25°C en luz roja y luz blanca.

Efecto de la luz UV sobre el rendimiento cuántico efectivo del fotosistema II

Los valores de rendimiento cuántico efectivo ($\Delta F/F_m'$) del morfotipo rojo y verde de *K. alvarezii* disminuyeron en aproximadamente 60% cuando los talos fueron expuestos a altas irradiancias de LFA, y en aproximadamente 70% cuando fueron expuestos a altas irradiancias de LFA + UV-A y LFA + UV-A + UV-B (Fig. 13). Sin embargo, no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en la disminución de $\Delta F/F_m'$ entre los tratamientos ni entre los morfotipos.

La recuperación de $\Delta F/F_m'$ fue completa en todos los casos, y se dio aproximadamente a las 6 horas (Fig. 13). Sin embargo, la tasa de recuperación de $\Delta F/F_m'$ varió entre los diferentes morfotipos y los diferentes tratamientos (Fig. 14). La tasa de recuperación fue de aproximadamente 0.05 a 0.06 $\Delta F/F_m' \cdot \text{min}^{-1}$ en el morfotipo rojo en todos los tratamientos y en el morfotipo verde en los tratamientos de LFA + UV-A y LFA. Sin embargo, la tasa de recuperación del morfotipo verde en el tratamiento de LFA + UV-A + UV-B fue significativamente menor a las demás ($p < 0.05$), con un valor de 0.03 $\Delta F/F_m' \cdot \text{min}^{-1}$.

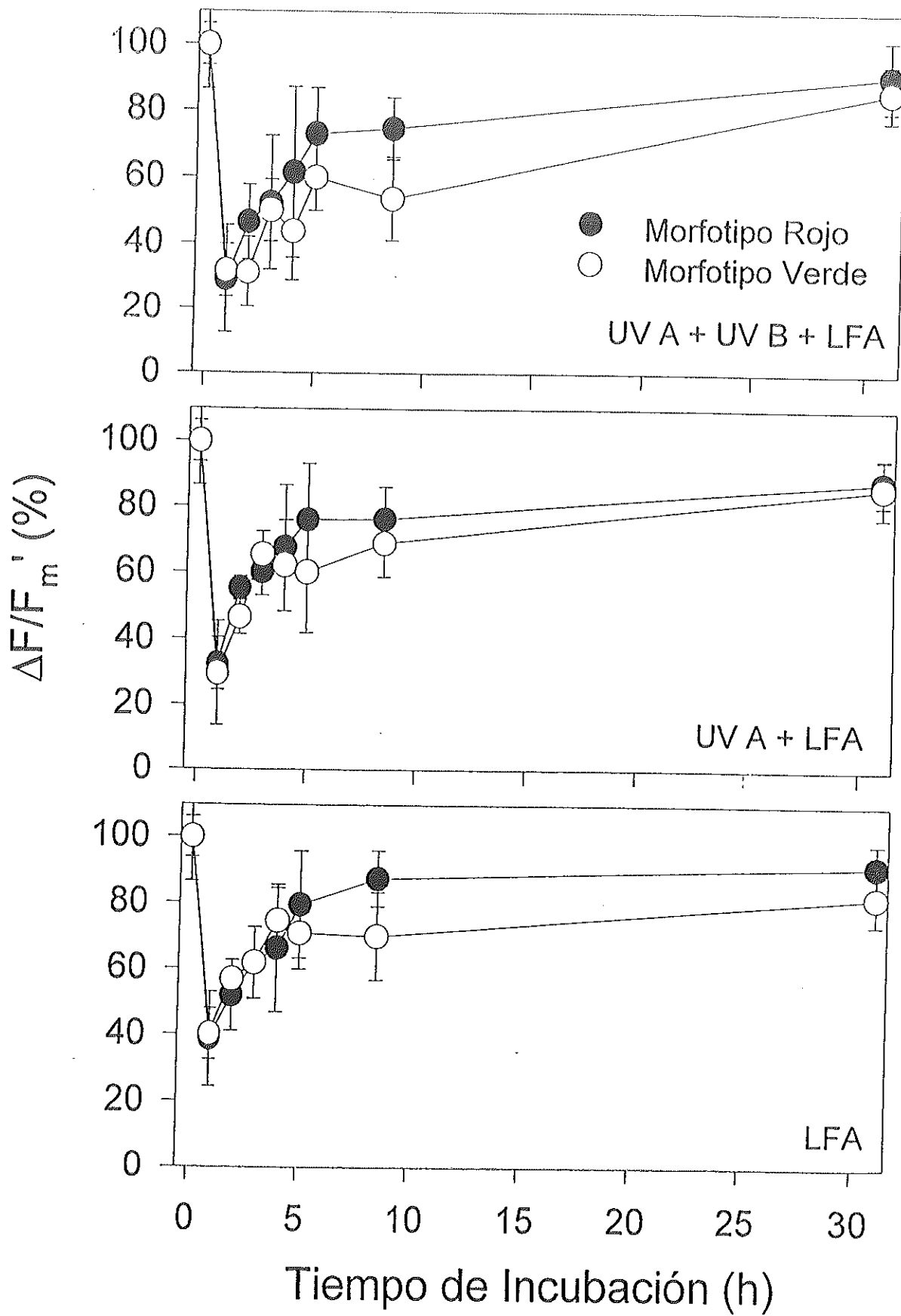


Figura 13. Rendimiento cuántico efectivo ($\bar{X} \pm DE$, $n > 6$) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* expuestos por 1 h a LFA + UV-A + UV-B, LFA + UV-A y LFA. La recuperación de $\Delta F/F_m'$ se evaluó por 30 h.

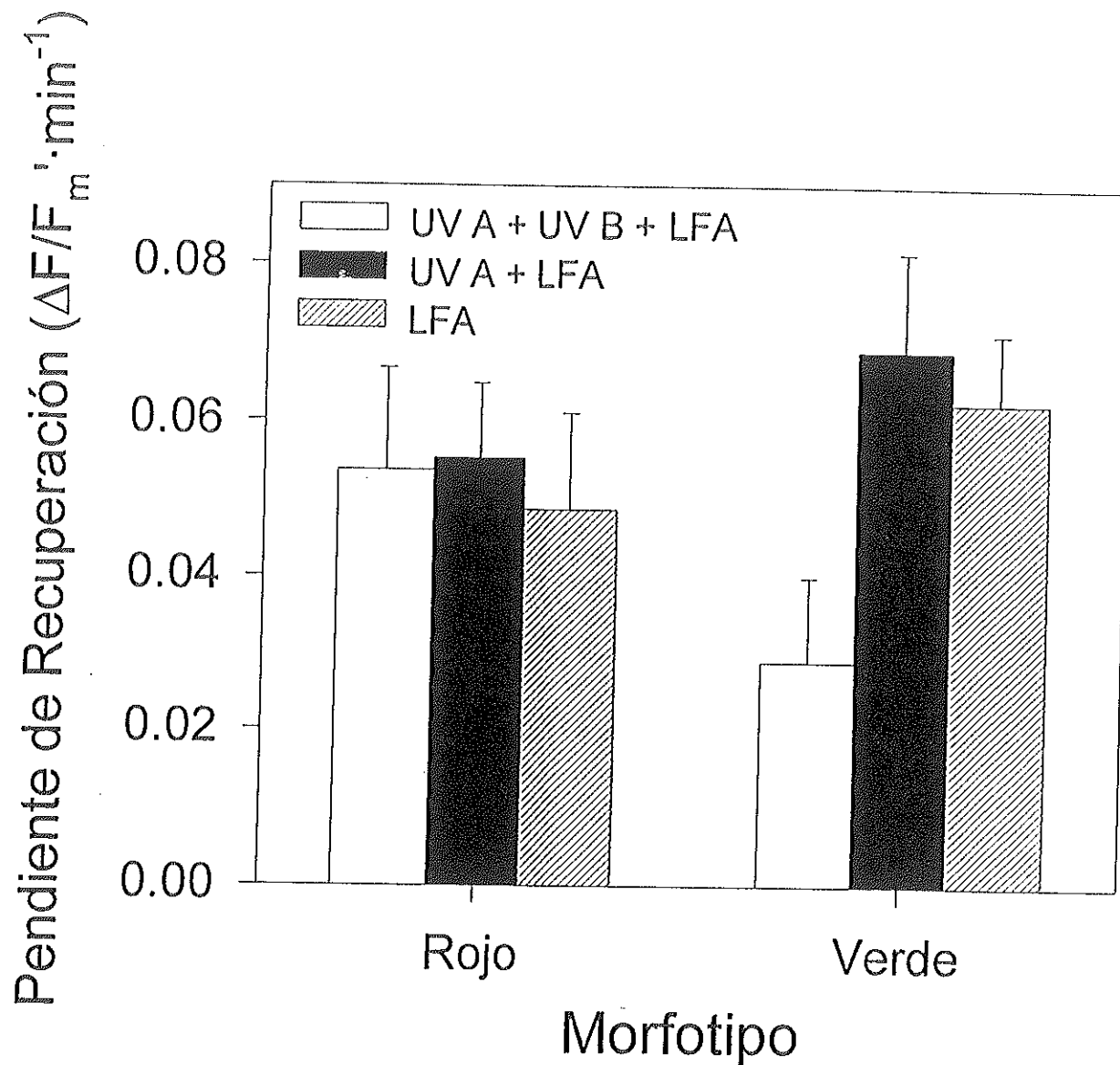


Figura 14. Pendiente de recuperación del rendimiento cuántico efectivo ($\Delta F/F_m'$, $\bar{x} \pm \text{DE}$, $n > 6$) de los morfotipos rojo y verde de *Kappaphycus alvarezii* después de exponerlos a tratamientos de UV y LFA.

Discusiones

Los pigmentos son utilizados por los organismos fotoautótrofos para absorber la luz solar, y obtener energía para la fotosíntesis. Las concentraciones de diferentes pigmentos pueden determinar la eficiencia con la que un organismo utiliza la luz incidente. En *Kappaphycus alvarezii*, así como en otras especies de la división Rhodophyta, existen muchas variaciones morfológicas y pigmentarias (Trono 1992, Kursar et al. 1983). Algunos de estos morfotipos presentan una coloración verde, que no es común para las Rhodophyta. Dawes (1992) encontró que una de ellas tiene menos FE de lo normal, sin embargo, no se ha realizado ninguna determinación de los niveles de FC y AFC en diferentes morfotipos de esta especie. Los resultados de este trabajo demuestran que las diferencias en los niveles de FC y de AFC son mucho más conspicuas que las diferencias en la concentración de FE. Además, se ha reportado que las concentraciones de FE son más sensibles a variaciones ambientales que la FC y la AFC (Talarico 1996). Por lo tanto, la evaluación de los niveles de FC y AFC es necesaria para la caracterización de los morfotipos de *K. alvarezii*, y probablemente también de otras Rhodophytas.

A pesar de las diferencias en la pigmentación de ambos morfotipos, su respuesta ante condiciones naturales de luz, ya sea en el crecimiento, en la fotosíntesis o en el efecto inhibitorio de altas irradiancias, es idéntica. Algunos morfotipos de *K. alvarezii* presentan diferencias en el crecimiento bajo ciertas condiciones experimentales (Dawes et al. 1994, Hurtado Ponce 1995), aunque en la mayoría de los casos el crecimiento es igual entre ellos (Ohno et al. 1994, Dawes et al. 1994, Hurtado Ponce 1995). La ausencia de variación en P_{max} entre los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* es consistente con los resultados reportados anteriormente (Dawes 1992). Sin embargo, se han reportado diferencias en el valor de α de diferentes morfotipos de *K. alvarezii*, pero no se presenta un patrón definido en relación a los morfotipos rojos y verdes (Dawes 1992). Por lo tanto, no existe una relación clara entre las concentraciones de biliproteínas y α .

Los valores similares de crecimiento, fotosíntesis y fotoinhibición encontrados en los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* sugieren que las diferencias pigmentarias entre ellos no son adaptaciones a diferentes nichos ecológicos. Los resultados de este trabajo sugieren que el

morfotipo verde utiliza un mayor número de proteínas que el morfotipo rojo para obtener la misma capacidad fotosintética. Aparentemente, la inversión en nutrientes destinada a la fotosíntesis, principalmente en nitrógeno, es mayor en el morfotipo verde que en el morfotipo rojo. Sin embargo, las biliproteínas también son una reserva importante de nitrógeno en las Rhodophyta (Dawes 1992).

El ensamble de ficobilisomas requiere de la presencia de proteínas estructurales (Glazer y Clark 1986). En relación a la pigmentación típica de un alga roja, el morfotipo verde tiene niveles excesivos de FC y AFC. Sin embargo, las diferencias observadas en la fotosíntesis en luz roja demuestran que la absorción de luz de los pigmentos adicionales del morfotipo verde contribuye a la fotosíntesis y, por lo tanto, estos pigmentos se encuentran acoplados a ficobilisomas. Es posible que las proteínas estructurales también se encuentren en exceso en el morfotipo verde, o que la arquitectura de los ficobilisomas sea flexible, y permita la incorporación de moléculas adicionales de FC y AFC a sus núcleos. Una estimación de la concentración de ficobilisomas en cada morfotipo sería muy útil para determinar si las biliproteínas adicionales forman más unidades de asimilación de luz, con niveles de

FE por ficobilisoma reducidos, o si forman ficobilisomas con núcleos mayores.

La fotosíntesis a irradiancias inferiores a la saturación, depende principalmente de los procesos fotoquímicos y del transporte de electrones (Henley 1993, Davison 1991). Sin embargo, bajo saturación de luz y en ausencia de fotoinhibición, la fotosíntesis depende de los procesos enzimáticos (Henley 1993, Davison 1991). Bajo saturación de luz, P_{max} está limitada principalmente por la fijación de carbono por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RUBISCO), la disponibilidad de fósforo para la síntesis de ATP, o la disponibilidad de CO_2 , que se ve afectada por su difusión y por la actividad de la enzima anhidrasa carbónica (Davison 1991). Todos estos procesos se hacen más eficientes con la temperatura, de manera que P_{max} aumenta con la temperatura hasta alcanzar cierto límite, a partir del cual puede haber una desnaturalización de las proteínas involucradas (Raven y Geider 1988). En *K. alvarezii*, el valor máximo de P_{max} se presentó a los 30°C, mientras que a los 37°C P_{max} fue significativamente menor. Probablemente, una o más enzimas involucradas en la fijación de carbono se desnaturalizó a los 37°C. Este comportamiento es muy similar al reportado

para dos variedades de *Eucheuma striatum* y para *Eucheuma denticulatum*, en donde P_{max} incrementa hasta los 32°C, y empieza a disminuir a temperaturas superiores (Glenn y Doty 1981). *Eucheuma striatum* y *Eucheuma denticulatum* son taxonómicamente cercanas a *K. alvarezii* (Doty y Norris 1985), y también habitan en planicies arrecifales en mares tropicales (Glenn y Doty 1981).

Los valores similares de P_{max} en ambos morfotipos con respecto a la temperatura, son consistentes con la hipótesis de que P_{max} está limitada por procesos enzimáticos, y no por la captación de luz, que podría verse afectada por la concentración de pigmentos. Sin embargo, cuando la calidad de luz limita la absorción a cierta parte del espectro, el morfotipo rojo tiene un P_{max} reducido. Esto significa que, con un espectro de luz restringido, la asimilación de luz puede ser un factor limitante para P_{max} , habiendo una saturación de los pigmentos involucrados. En luz roja, la asimilación de luz del PSII, que es limitante para la fotosíntesis, es realizada exclusivamente por la FC y la AFC, ya que la absorción de la clorofila a se enfoca hacia el PSI, y no interviene en el espectro de acción de la fotosíntesis (Hanelt et al. 1992, Lüning y Dring 1985).

Por lo tanto, la capacidad de asimilación y/o transporte de cuantos de luz de la FC y AFC es susceptible a saturación a partir de cierta irradiancia.

Los cuantos asimilados por la FE deben pasar por la FC y la AFC para llegar al centro de reacción (Glazer y Clark 1986). Sin embargo, el valor de P_{max} del morfotipo rojo no es inferior al del morfotipo verde bajo luz blanca, a pesar de que sus concentraciones de FC y AFC son menores. Por lo tanto, la saturación de la FC y AFC del morfotipo rojo se manifiesta en la captación de fotones, mas no en el transporte de cuantos. Por lo tanto, bajo saturación de luz, la capacidad de transporte de cuantos de la FC y AFC es superior a su capacidad de asimilación de fotones incidentes.

A diferencia de los procesos enzimáticos, los procesos fotoquímicos primarios no se ven afectados por la temperatura (Raven y Geider 1988). Cuando la luz es el factor limitante, la fotosíntesis depende principalmente de procesos fotoquímicos, y α es relativamente insensible a la temperatura, comparada con P_{max} (Davison 1991, Henley 1993, Gattuso 1989, Post *et al.* 1985). Sin embargo, en *K. alvarezii*, α depende de la temperatura tanto como P_{max} .

Se han descrito diferentes mecanismos por los que la temperatura puede afectar a α , sin embargo, todos ellos implican un incremento de α con la temperatura (Raven y Geider 1988, Davison 1991). En las Rhodophytas, la transferencia de energía en los pigmentos antena depende de proteínas, y requiere de interacciones sutiles entre ellas que dependen de su estructura. Estas interacciones podrían verse afectadas por la temperatura y provocar los cambios en α observados en *K. alvarezii*.

Cuando la irradiancia se encuentra concentrada en λ mayores a 600 nm, α del morfotipo verde aumenta. Este incremento se debe probablemente a que la asimilación de luz en el morfotipo verde es más efectiva en luz roja, debido a que tiene más pigmentos que la absorben. Esto indica que, efectivamente, α se encuentra limitada por la asimilación de luz, ya que un incremento en ésta resulta en un incremento en α .

Los valores máximos de P_{\max} se presentan aproximadamente a las temperaturas óptimas reportadas para el crecimiento de *K. alvarezii* (Ohno et al. 1994, Wu et al.

1989). Los valores máximos de α , en cambio, se presentan a temperaturas mucho más bajas. En la naturaleza, los niveles mayores de irradiancia coinciden con las mayores temperaturas, tanto en un día como a lo largo del año. Un nivel alto de P_{\max} requiere que las reacciones de la fase obscura y de la fosforilación fotosintética se den de manera muy eficiente (Davison 1991). Esto implica que los pigmentos excitados sean regresados al estado basal de una forma más eficiente, evitando que la excitación produzca oxígeno activo (O_2^-), y cause daños en el aparato fotosintético (Hanelt 1996). Un valor reducido de α se da cuando la eficiencia de asimilación de fotones y/o la eficiencia de conversión de energía fotosintética disminuye (Henley 1993). Una disminución en la eficiencia de asimilación de fotones reduciría la formación de pigmentos excitados, disminuyendo el riesgo de fotodaño. Es posible que la combinación de un P_{\max} elevado y un α reducido sea una estrategia alternativa a la fotoinhibición para evitar el fotodaño, a temperaturas elevadas. Por el contrario, un P_{\max} reducido y un α elevado, a bajas temperaturas, puede ser una estrategia para incrementar la absorción de fotones a irradiancias bajas, que coinciden frecuentemente con dichas temperaturas.

La fotoinhibición por altas irradiancias ha sido observada en un gran número de especies de macroalgas de las tres divisiones (Cabello Pasini *et al.* sometida, Häder *et al.* 1998, Franklin *et al.* 1996, Hanelt 1992). La eliminación de la luz UV de los tratamientos de luz disminuye la fotoinhibición en algunas especies de Rhodophytas (Figueroa *et al.* 1997, Larkum y Wood 1993), mientras que en otras no se presentan diferencias (Aguirre-von-Wobeser *et al.* 2000). En *K. alvarezii*, la fotoinhibición bajo luz solar natural se debe principalmente al efecto de la LFA. La luz UV es probablemente absorbida en parte por compuestos protectores (Wood 1989, Karsten *et al.* 1998, Franklin *et al.* 1999). Sin embargo, es posible que exista un efecto de la luz UV en ausencia de LFA. Generalmente, *K. alvarezii* es cultivada en planicies submareales someras (Azanza-Corrales *et al.* 1992). Por lo tanto, es muy probable que *K. alvarezii* se fotoinhiba ante las altas irradiancias que se dan principalmente cuando la marea baja coincide con el mediodía solar (Hanelt 1992, Hanelt *et al.* 1994).

La recuperación relativamente rápida de la fotoinhibición sugiere que *K. alvarezii* es capaz de realizar fotoinhibición dinámica y, en gran medida, de evitar un fotodaño. La recuperación ligeramente retardada del morfotipo verde bajo luz UV-B indica un ligero fotodaño. Este daño probablemente no se debe al mecanismo descrito en Hanelt (1996), que implica la formación de radicales de oxígeno, ya que la luz UV-B no contribuye a la fotosíntesis, y por lo tanto no forma pigmentos excitados. En cambio, es posible que este fotodaño se deba a la absorción de la radiación incidente de las moléculas que sufren el daño. La exposición a la luz UV disminuye las concentraciones de clorofila *a* en *E. striatum* (Wood 1989) y en *Porphyra leucostica* (Figueroa et al. 1997). Un retardamiento en la recuperación del rendimiento cuántico efectivo debido a una exposición a luz UV también ha sido observado en la Rhodophyta *Porphyra leucostica* (Figueroa et al. 1997).

En este estudio se demuestra por primera vez que la principal diferencia entre los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* radica en las diferencias de concentración de FC y AFC, y no en las de FE. Sin embargo, los resultados de este trabajo también demuestran que las diferencias en las

concentraciones de FC y AFC no causan diferencias en la fisiología fotosintética de los morfotipos verde y rojo de *K. alvarezii* en luz blanca. Por lo tanto, es probable que en los cultivos y en el campo no se presenten diferencias en el crecimiento de ambos morfotipos. La respuesta fotosintética de los morfotipos rojo y verde de *K. alvarezii* en diferentes calidades de luz indica que la FC y la AFC son más eficientes para transferir energía captada por la FC que para captar fotones incidentes. En este trabajo se demuestra por primera vez que los morfotipos verde y rojo de *K. alvarezii* tienen la capacidad de realizar la fotoinhibición, para evitar un daño más permanente. Esta capacidad de fotoinhibición dinámica puede verse reducida con la presencia de luz UV-B. La fotoinhibición afecta la acuicultura, ya que reduce la productividad en las horas de mayor irradiancia. Sin embargo, la fotoinhibición es una adaptación de las algas a las altas irradiancias, que les permite sobrevivir en ambientes someros y muy expuestos a la luz. Además de la fotoinhibición, existen otros mecanismos de fotoprotección, como la acumulación de sustancias que absorben la luz y disipan su energía en forma de calor. En este trabajo se propone por primera vez el control de α y P_{max} mediante la temperatura como una estrategia de fotoprotección.

Conclusiones

El color verde de una Rhodophyta no siempre se debe a una falta de FE, sino puede deberse a un exceso de FC y AFC, que enmascaran el color rojo de la FE.

La sobrepigmentación no necesariamente incrementa la capacidad fotosintética y las tasas de crecimiento específico en las Rhodophyta, aún cuando los pigmentos adicionales se encuentren acoplados al aparato fotosintético.

La temperatura puede regular la utilización de la luz para la fotosíntesis de acuerdo a las condiciones de luz estacionales, favoreciendo la utilización óptima de la luz en las horas en las que la irradiancia es moderada y no se presenta fotoinhibición.

Las algas tropicales de ambientes someros tienen la capacidad de disminuir la actividad fotosintética para evitar que las irradiancias excesivas dañen al aparato fotosintético.

El aparato fotosintético de las algas tropicales puede sufrir daños con niveles naturales de UV-B, que retrasan la recuperación de la fotosíntesis después de una fotoinhibición.

Literatura citada

- Aguirre-von-Wobeser, E., Figueroa, F.L., Cabello-Pasini, A.
2000. Effect of UV radiation on photoinhibition of
marine macrophytes in culture systems. *Journal of
Applied Phycology*. En Prensa.
- Azanza-Corrales, R. 1990. The farmed *Eucheuma* species in
Danajon Reef, Philippines: vegetative and reproductive
structures. *Journal of Applied Phycology* 2:57-62.
- Azanza-Corrales, R., Sa-a, P. 1990. The farmed *Eucheuma*
species (Gigartinales, Rhodophyta) in Danajon Reef,
Philippines: carrageenan properties.
- Azanza-Corrales, R., Mamauag, S.S., Alfiler, E., Orolfo,
M.J. 1992. Reproduction in *Eucheuma denticulatum*
(Burman) Collins and Hervey and *Kappaphycus alvarezii*
(Doty) Doty farmed in Danajon Reef, Philippines.
Aquaculture 103:29-34.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the
quantitation of microgram quantities of protein
utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Davison, I.R. 1991. Environmental effects on algal photo-
synthesis: temperature. *Journal of Phycology* 27:2-8.
- Dawes, C.J. 1981. *Marine Botany*. Wiley and Sons Publ.,
Nueva York. 628 pp.

- Dawes, C.J. 1989. Temperature acclimatation in cultured *Eucheuma isiforme* from Florida and *E. alvarezii* from the Philippines. *Journal of applied phycology* 1: 59-65
- Dawes, C.J. 1992. Irradiance acclimation of the cultured philippine seaweeds, *Kappaphycus alvarezii* and *Eucheuma denticulatum*. *Botanica Marina* 35 : 189-195.
- Dawes, C.J., Lluisma, A.O., Trono, G.C. 1994. Laboratory and field growth studies of commercial strains of *Eucheuma denticulatum* and *Kappaphycus alvarezii* in the Philippines. *Journal of applied phycology* 6: 21-24.
- Doty, M.S., Norris, J.N. 1985. *Eucheuma* species (Solieriaceae, Rhodophyta) that are major sources of carrageenan. En: Abbott, I.A., Norris, J. *Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species*. La Jolla. pp. 37-45.
- Doty, M.S. 1987. The production and use of *Eucheuma*. En: Doty, M.S., Caddy, J.F., Santelices, B. (Eds.) *FAO Fisheries Technical Paper 281: Case studies of seven commercial seaweed resources*. Roma. pp. 124-164.
- Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A., Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Marine Ecology Progress Series* 151:81-90.

- Franklin, L.A., Seaton, G.G.R., Lovelock, C.E., Larkum, A.W.D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis on a coral reef. *Plant, Cell and Environment* 19:825-836.
- Franklin, L.A., Yakovleva, I., Karsten, U., Lüning, K. 1999. Synthesis of micosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *Journal of Phycology* 35: 682-693.
- Gantt, E. 1996. Pigment protein complexes and the concept of the photosynthetic unit: Chlorophyll complexes and phycobilisomes. *Photosynthesis Research* 48:47-53.
- Gattuso, J.P. 1989. Effect of temperature on the photosynthesis-irradiance curves of two caulerpales algae grown in aquaria. *Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco. No spécial 5*: 173-180.
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990:87-92.
- Glazer, A.N., Clark, J.H. 1986. Phycobilisomes: Macromolecular Structure and Energy Flow Dynamics. *Biophys. J.* 49:115-116.

- Glenn, E.P., Doty, M. 1981. Photosynthesis and respiration of the tropical red seaweeds, *Euclima striatum* (Tmbalang and Elkhorn varieties) and *E. Denticulatum*. Aquatic Botany 10: 353-364.
- Häder, D.P., Lebert, M., Figueroa, F.L., Jiménez, C., Viñegla, B., Perez-Rodriguez, E. 1998. Photoinhibition in Mediterranean macroalgae by solar radiation measured on site by PAM fluorescence. Aquatic Botany 61:225-236.
- Hanelt, D. 1992. Photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the South China Sea. Marine Ecology Progress Series 82:199-206.
- Hanelt, D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. Scientia Marina 60(suplemento 1):243-248.
- Hanelt, D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. Marine Biology 131:361-369.
- Hanelt, D., Huppertz, K., Nultsch, W. 1992. Photoinhibition of photosynthesis and its recovery in red algae. Bot. Acta 101: 278-284.

- Hanelt, D., Li, J., Nultsch, W. 1994. Tidal dependence of photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the South China Sea. *Botanica Acta* 107:66-72.
- Henley, W.J. 1993. Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *Journal of Phycology* 29:729-739.
- Hurtado-Ponce, A.Q. 1995. Carrageenan properties and proximate composition of three morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* Doty (Gigartinales, Rhodophyta) Grown at two depths. *Botanica Marina* 38: 215-219.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Bioche. Physiol. Pflanzen* 167:191-194.
- Jiménez, C., Figueroa, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A., Lebert, M., Häder, D.P. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of southern Spain. *Botanica Marina* 41:329-338.

- Karsten, U., Sawall, T., Hanelt, D., Bischof, K., Figueroa, F. L., Flores Moya, A. y Wiencke, C. 1998. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Botanica Marina* 41: 443-453.
- Kursar, T.A., van der Meer, J., Alberte, R.S. 1983. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: II. Phycobilisome characteristics of pigment mutants. *Plant Physiology* 73: 361-369.
- Kursar, T.A., van der Meer, J., Alberte, R.S. 1983b. Light-harvesting system of the red alga *Gracilaria tikvahiae*: I. Biochemical analyses of pigment mutations. *Plant Physiology* 73: 353-360.
- Larkum, A.W.D., Wood, W.F. 1993. The effect of UV-B radiation on photosynthesis and respiration of phytoplankton, benthic macroalgae and seagrasses. *Photosynthesis Research* 36:17-23.
- Lobban, C.S., Chapman, D.J., Kremer, B.P. 1988. *Experimental Phycology. A laboratory manual.* Cambridge University Press. Cambridge.
- Lüning, K., Dring, M.J. 1985. Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli. *Marine Biology* 87:119-129.

- Ohno, M., Largo, D. B., Ikumoto, T. 1994. Growth rate, carrageenan yield and gel properties of cultured kappa-carrageenan producing red alga *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty in the subtropical waters of Shikoku, Japan. *Journal of Applied Phycology* 6:1-5.
- Post, A.F., de Wit, R., Mur, L.R. 1985. Interactions between temperature and light intensity on growth and photosynthesis of the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Plankton Research* 7(4):487-495.
- Raven, J.A., Geider, R.J. 1988. Temperature and algal growth. *New Phytol.* 110:441-461.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1981. *Biometry*. 2da ed. W.H. Freeman and Company. Nueva York. 863 pp.
- Stryer, L. 1995. *Bioquímica (Tomo II)*. 4a ed. Editorial Reverté, S.A. Barcelona. 1010 pp.
- Talarico, L. 1996. Phycobiliproteins and phycobilisomes in red algae: adaptative responses to light. *Scientia marina* 60 (Suplemento 1): 205-222.
- Trono, G.C. Jr. 1992. *Eucheuma* and *Kappaphycus*: taxonomy and cultivation. *Bull. Mar. Sci. Fish. Kochi Univ.* 12:51-65.

- Trono, G.C., Lluisma, A.O. 1992. Differences in biomass production and carrageenan yields among four strains of farmed carreenophytes in Northern Bohol, Philippines. *Hydrobiologia* 247:223-227.
- Webb, W.L., Newton, M., Starr, D. 1974. Carbon dioxide exchange of *Alnuf rubra*. Mathematical model. *Oecologia* 17:281-291.
- Wood, W.F. 1989. Photoadaptive responses of the tropical red alga *Eucheuma striatum* Schmitz (Gigartinales) to ultra-violet radiation. *Aquatic Botany* 33: 41-51.
- Wu, C., Jiajun, L., Enzhan, X., Zhuosheng, P., Shuzhi, T., Jun, L., Zongcun, W., Xiaohang, H., Zulin, C., Guojun, C. 1989. On the transplantation and cultivation of *Kappaphycus alvarezii* in China. *Chinese journal of oceanology and limnology* 7(4):327-334.

Publicaciones

- Aguirre-von-Wobeser, E., F.L. Figueroa and A. Cabello-Pasini, A. 2000. Effects of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems. *Journal of Applied Phycology* 00:1-10 (Adjunto)
- Cabello-Pasini, A., Aguirre-von-Wobeser, E. and F.L. Figueroa. 2000. Photoinhibition of photosynthesis in *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae), *Chondrus crispus* (Rhodophyceae) and *Ulva lactuca* (Chlorophyceae) in outdoor systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. En prensa.
- Aguirre-von-Wobeser, E., F.L. Figueroa and A. Cabello-Pasini. Photosynthesis and growth of red and green morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) from the Philippines. *Marine Biology* (Sometido).



Effect of UV radiation on photoinhibition of marine macrophytes in culture systems

Eneas Aguirre-von-Wobeser¹, Felix L. Figueroa² & Alejandro Cabello-Pasini^{3,*}

¹Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California, A.P. # 453, Ensenada, 22800 Baja California, México

²Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, E-29071 Málaga, Spain

³Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, A.P. # 453, Ensenada, 22800 Baja California, México

(* Author for correspondence; phone: +52-6-174-4601 ext. 107; fax: +52-6-174-5303; e-mail: acabello@faro.ens.uabc.mx)

Received 3 March 2000; in revised form 23 March 2000; accepted 27 March 2000

Key words: Chlorophyll fluorescence, *Chondrus crispus*, *Macrocystis pyrifera*, photosynthesis, photoinhibition, outdoor culture system, *Ulva lactuca*, UV-radiation

Abstract

The present study examined the effect of UV and photosynthetically active radiation (PAR) on photoinhibition and recovery in the Phaeophyte *Macrocystis pyrifera*, the Rhodophyte *Chondrus crispus* and the Chlorophyte *Ulva lactuca* under outdoor culture conditions. There was an increase in photoinhibition as a consequence of high exposure to UV-B radiation in *M. pyrifera*, however, high levels of PAR accounted for most of the photoinhibition in *C. crispus* and *U. lactuca*. Photodamage by UV-A, UV-B and PAR was completely repaired within 5 h and effective quantum yield reached pretreatment values in the three species studied. Species were less susceptible to photoinhibition after being incubated for 5 d under high exposures of natural irradiance suggesting a photoadaptive process. The recovery of the effective quantum yield was impaired by long exposure to high levels of UV-B in *C. crispus* and UV-A, UV-B and PAR in *M. pyrifera*. This suggests a different kind of damage by UV-A and PAR radiation, one to the photosynthetic apparatus and another which affects the repair mechanism of some species. There was an increase in UV-absorption (λ 330 nm) in *M. pyrifera* and *C. crispus* within four days of the initiation of the experiment suggesting that these species photoprotect their photosynthetic system when exposed to elevated UV and PAR levels.

Abbreviations: BEI_{DNA} – biological effective irradiance for DNA damage; UV – ultraviolet; $\Delta F/Fm'$ – effective quantum yield

Introduction

The thinning of the ozone layer has been observed in both the Antarctic (Chubachi, 1985) and specific areas of the Northern Hemisphere (Blumthaler & Ambach, 1990). The reduction of the stratospheric ozone layer has been implicated with the increasing levels of ultraviolet (UV) radiation reaching the Earth's surface (Frederick & Snell, 1988). As a consequence,

there has been an increasing effort in the last decade to understand the effect of elevated UV levels on the physiology of marine primary producers (Häder & Lopez-Figueroa, 1997).

The photosynthetic apparatus of marine algae have been shown to experience damage by excessive absorption of photosynthetically active radiation (PAR) and UV radiation (Franklin et al., 1999). As a consequence, marine algae have developed mechanisms

to dissipate excess energy as fluorescence and heat from the photosynthetic apparatus or photoprotective mechanisms in order to cope with increasing levels of UV and PAR radiation (Häder et al., 1996). The dissipation of excess energy from photosystem II (PS II) as fluorescence is generally referred to as dynamic photoinhibition and serves as a photoprotective mechanism that interrupts the electron transport chain under elevated solar irradiances in photosynthetic organisms (Krause & Weis, 1991).

Phytoplanktonic populations are able to control the amount of UV and PAR radiation that reach their photosynthetic systems by varying their depth within the water column. Most seaweeds, however, are attached to hard substratum and are unable to control the amount of UV and PAR radiation reaching their thalli. As a consequence, macroalgae species living at the intertidal zone are most likely to suffer the effect of an enhancement in UV radiation compared to subtidal algae (Jimenez et al., 1998). Seaweeds exposed to such high levels of UV and PAR radiation under natural conditions synthesize and concentrate UV-absorbing compounds to shield their photosynthetic systems (Franklin et al., 1999). Furthermore, photoinhibition has been shown to be greater and repair mechanisms for the photosynthetic apparatus slower, in macroalgae adapted to low light environments compared to those species growing near the sea surface (Bruhn & Gerard, 1996; Häder et al., 1997). However, a substantial increase in UV radiation might promote photoinhibitory processes that could reduce photosynthesis and growth rates of some species in the coastal zone and promote ecological successions.

Cultured seaweeds are often raised from their subtidal habitats to culture systems with shallow water columns (Lapointe, 1981; Lapointe & Duke, 1984). The increase of UV and PAR radiation as a consequence of the transplantation of seaweeds from deep to shallow environments promote photoinhibition as well as the synthesis of photoprotection compounds (Franklin et al., 1999). The reduction of high irradiance levels using screen mesh or manipulating tissue density, has been proven to be an effective technique to regulate the synthesis of specific metabolites in a number of seaweeds in culture systems (Lapointe, 1981; Lapointe & Duke, 1984). It is possible that such techniques could be used to decrease high levels of UV and PAR radiation reaching the culture system and reduce photoinhibition.

A global increase of UV radiation could have a negative impact on the world's seaweed aquaculture

production. The majority of studies dealing with the effects of UV radiation on macroalgae have been conducted with natural populations or in experimental laboratory conditions using artificial UV lamps (Häder & Lopez-Figueroa, 1997). However, there are few studies that report the effects of UV radiation on macroalgae growing in outdoor culture systems (Henley et al., 1991). As a consequence, the objective of this study was to evaluate the effects of high PAR levels and UV radiation on photoinhibition of three commercial macroalgal species, *Macrocystis pyrifera*, *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* under culture systems. The effects of long exposure periods of high levels of incident irradiances was also evaluated in these species to investigate photoprotective mechanisms in cultured marine algae.

Material and methods

Macrocystis pyrifera was collected at Campo Kennedy, Baja California (31°42' N, 116°42' W), and was immediately transported (40 km) in an ice cooler to the laboratory facility at Ensenada, Baja California. *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* were obtained from high-density (12 kg m⁻³) culture tanks maintained at the Ensenada facility. Plants were kept in 1200-L outdoor tanks with enriched seawater (250 µM NO₃) at 17 °C and exposed to natural irradiance. Approximately 6 kg fresh weight of *C. crispus*, 100 g *U. lactuca* and 10 blades (without pneumatocysts) of *M. pyrifera* were added to each tank. Seaweeds were suspended in the culture system using constant aeration so that the plants circulated to the top of the tank approximately every 15 s.

UV and PAR irradiance

Incident UV-B (280–320 nm) and UV-A (320–400 nm) radiation was determined at hourly intervals using UV sensors (Gröbel Instruments, Germany) throughout the experimental period. Data were corrected against a UV radiometer of the European Light Dosimeter Network (ELDONET) (Häder et al., 1999). Incident photosynthetically active radiation (PAR) was measured every minute throughout the experimental period with a LI-190SA 2π quantum sensor kept parallel to the ground and recorded by a LI-COR data logger. The attenuation coefficient of downward irradiance (K_d) at the culture tanks was determined by measuring PAR just below the surface and at 0.5 m

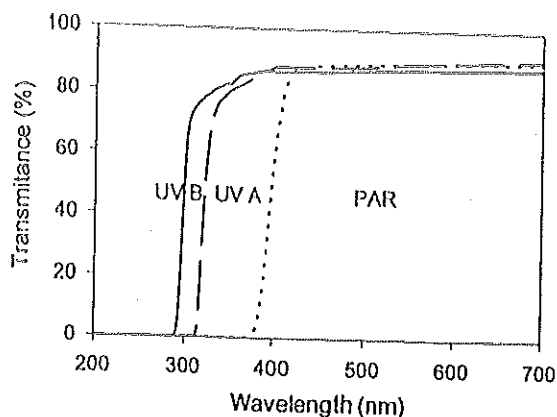


Figure 1. Transmittance (relative units) of the filters used in the UV experiments. Control ($\lambda > 295$ nm, solid line), UV-B filter ($\lambda > 320$ nm, long dash line) and UV-A filter ($\lambda > 395$ nm, short dash line).

depth every minute throughout the experiment with LI-193SA spherical quantum sensors and a LI-COR data logger (LI-1000).

The effect of UV light on the effective quantum yield was evaluated in the three species at the beginning of the experiment and after 5 days of incubation in the culture tanks. The effect of UV light on the effective quantum yield was evaluated by incubating algal tissue in Plexiglas tanks with recirculating water (17°C) for 1 h under PAR+UV-A+UV-B (Ultrapahn, Digrefa GmbH, Germany, $\lambda > 295$ nm), PAR+UV-A (Folex 320 nm, Folex GmbH, Germany) and PAR alone (Ultrapahn $\lambda > 295$, Figure 1). The UV dosage administered to the algal tissue was similar during the first and fifth experimental day. After the UV-radiation treatment, the tissues were taken to the laboratory and incubated at 17°C for approximately 20 h under fluorescent cool white light with no UV radiation and irradiance levels below $10 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Chlorophyll fluorescence in the tissue was evaluated by fluorometry (described below) at different time intervals throughout the recovery phase.

Dosimetry

The biological effective dose of UV radiation for DNA damage (BEI_{DNA}) was evaluated using UV-dosimeters (Viospor Type I and II, Biosense, Bornheim, Germany). The dosimeter consists of *Bacillus subtilis* spores (Wild-type or DNA repair defective strain), immobilized on transparent polyester plastic sheets. Dosimeters were placed at 0.1 m, 0.5 m and 1.0 m below the surface of a culture tank with 100% incident irradiance and at 0.1 m below the sur-

face of culture tanks in which incident irradiance was reduced to 8 and 26% with black screen mesh and incubated for 5 days. After irradiation, the biofilm was covered and shipped to the manufacturer where the BEI_{DNA} was evaluated and expressed as $\text{J m}^{-2} \text{d}^{-1}$ of effective integrated daily irradiance. The decay of BEI_{DNA} values within a culture tank was calculated using the equation for exponential decay of downward irradiance (Kirk, 1994): $\text{BEI}_{DNAz} = \text{BEI}_{DNA0} \exp^{-K_d z}$ where BEI_{DNAz} is the biological effective dose of UV radiation for DNA damage at depth z , BEI_{DNA0} is the biological effective dose of UV radiation for DNA damage at the surface of the culture tank and K_d is the attenuation coefficient for downward irradiance in the culture tank.

Fluorescence measurement

Fluorescence parameters were estimated with a pulse amplitude modulated (PAM) fluorometer (PAM 2000; Waltz, Effeltrich, Germany) according to Schreiber et al. (1995). Effective quantum yield was calculated as $\Delta F/F_m'$ where $\Delta F = F_m' - F_t'$ and F_m' is the maximal fluorescence in the light adapted thalli and F_t' is the current steady-state fluorescence. A decline in $\Delta F/F_m'$ values as a result of elevated irradiance or UV radiation levels is considered as photoinhibition. The $\Delta F/F_m'$ values were determined within 5 min after collection from the tanks in the laboratory at $5\text{--}10 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{min}^{-1}$.

Values of F_t' in *U. lactuca* and *M. pyrifera* were evaluated after a pulse of red light (650 nm , $0.3 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) while F_m' was induced with a saturating white pulse (0.4 ms approx. $9000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). In red algae, the onset of maximal fluorescence after a saturating light pulse occurs very quickly, and is associated with excitation of PS I and a delay of the F_m' decline, thus, a modified PAM protocol described by Hanelt et al. (1997) was used. *C. crispus* samples were submitted to a 5 s low irradiance ($30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) far-red pulse, which was followed by a 5 min darkness period. The stabilization of the fluorescence signal was ensured by providing a short red actinic pulse (5 s , $8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 655 nm) to the sample. An additional 5 s far-red pulse was given to re-oxidize the electron transport chain. Finally, F_o' and F_m' were evaluated as described above. This procedure was repeated in triplicate for each sample at intervals of 5 min darkness to avoid incomplete recovery of fluorescence quenching parameters such as energy quenching or those derived from state transitions (Hanelt et al., 1997).

Pigment analysis

Levels of chlorophyll *a* were determined in the thallus of the three species studied every other day throughout the experimental period. Tissue samples (approx. 0.1 g) from the three species were collected from the culture tanks and extracted with 90% (v/v) acetone and a tissue homogenizer. Chlorophyll *a* concentrations in *M. pyrifera*, *C. crispus* and *U. lactuca* were determined by spectrophotometry using the equations of Jeffrey & Humphrey (1975). UV-absorbing compounds were extracted from approximately 0.1 g of tissue with 25% (v/v) methanol and a glass homogenizer. The extracts were incubated for 2 h at 45 °C and then centrifuged for 15 min for 7000 × g and the absorbance determined with a spectrophotometer at 330 nm. Data are expressed as absorbance units per g fresh weight of tissue.

Statistical analysis

Significance of daily variation in fluorescence parameters was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) after testing for homoscedasticity and normality of the data (Sokal & Rohlf, 1981). Statistically significant differences among slopes were evaluated through an analysis of covariance (ANCOVA).

Results

Incident PAR irradiance reached values of almost 500 $W\ m^{-2}$ during the first 6 days of incubation and decreased to approximately 50% in the last day of incubation due to fog in the area (Figure 2). As observed in other studies, values of UV radiation closely followed those of incident PAR irradiance throughout the experimental period. The levels of UV-A radiation reached maximum values of 58 $W\ m^{-2}$ and were approximately 40 times greater than those observed for UV-B radiation. Weather conditions were relatively clear during the first 6 days of the experiments, however, UV levels decreased approximately 2-fold on the last day. The attenuation coefficient of downward irradiance (K_d) in the culture tanks fluctuated from low values in the morning and noon to high values in the afternoon with mean values of approximately 3 m^{-1} throughout the experimental period. Morning and afternoon fluctuation of K_d were probably the result of changes in the angle of incidence of sunlight over the culture tanks. Minimum K_d values were observed at solar noon and are probably the consequence of the

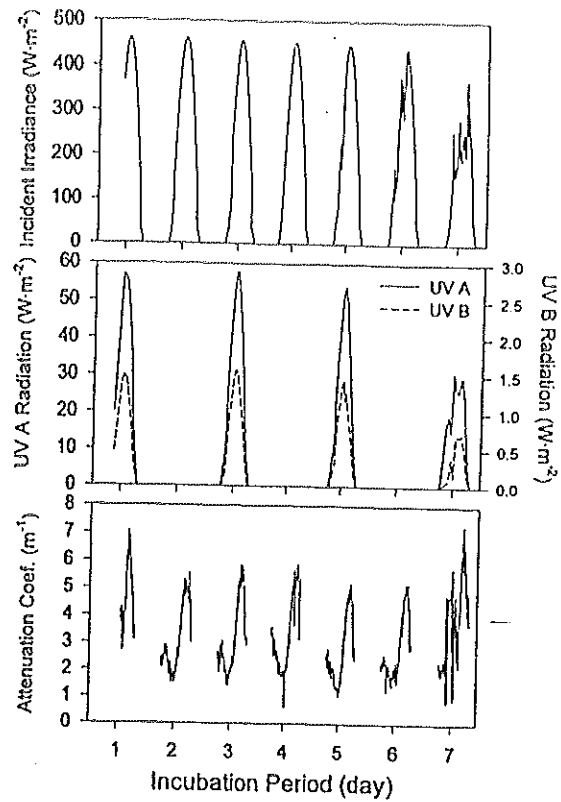


Figure 2. Incident irradiance, UV-A and UV-B radiation, and attenuation coefficient throughout the experimental period (18–25 August 1998) at Ensenada, Baja California, México. Incident irradiance and attenuation coefficient determined at one minute intervals and UV radiation determined at hourly intervals throughout the experimental period. Attenuation coefficient was determined at 1-min intervals by measuring subsurface light and at 0.5 m depth.

perpendicular incidence of solar irradiance over the water surface.

The values of biological effective irradiance for DNA damage (BEI_{DNA}) per day fluctuated as a function of incubation depth within a culture tank and as a function of incident irradiance dosage between tanks (Table 1). The BEI_{DNA} reached approximately 3500 $J\ m^{-2}\ d^{-1}$ in the tank under 100% I_o , and was 4 and 34 times higher in surface water than at 0.5 and 1 m depth, respectively. The observed values of BEI_{DNA} in the 100% I_o culture tank closely followed the BEI_{DNA} calculated values using the equation for exponential equation for the attenuation of downward irradiance assuming a K_d of 3 m^{-1} . Similarly, the 4-fold reduction (26%) of I_o reaching the culture tanks also resulted in a 4-fold reduction in BEI_{DNA} and was similar to BEI_{DNA} values at 0.5 m with full solar radiation (100% I_o). The reduction of irradiance to 8% resulted in a 26-fold reduction of BEI_{DNA} in the cul-

Table 1. Biological effective irradiance per day for DNA damage (BEI_{DNA}) determined with biofilm dosimeters (Viospor Type I and II) incubated for 5 days at different depths and different incident irradiances in the culture tanks. Calculated BEI_{DNA} values were obtained using the equation proposed by Kirk (1994) for attenuation of downward irradiance assuming an attenuation coefficient of 3 m^{-1}

Depth (m)	% Incident light	BEI_{DNA} ($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$)	Calculated BEI_{DNA} ($\text{J}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$)
0.1	100	3542	3542
0.5	100	878	790
1.0	100	106	176
0.1	25	885	920
0.1	8	134	283

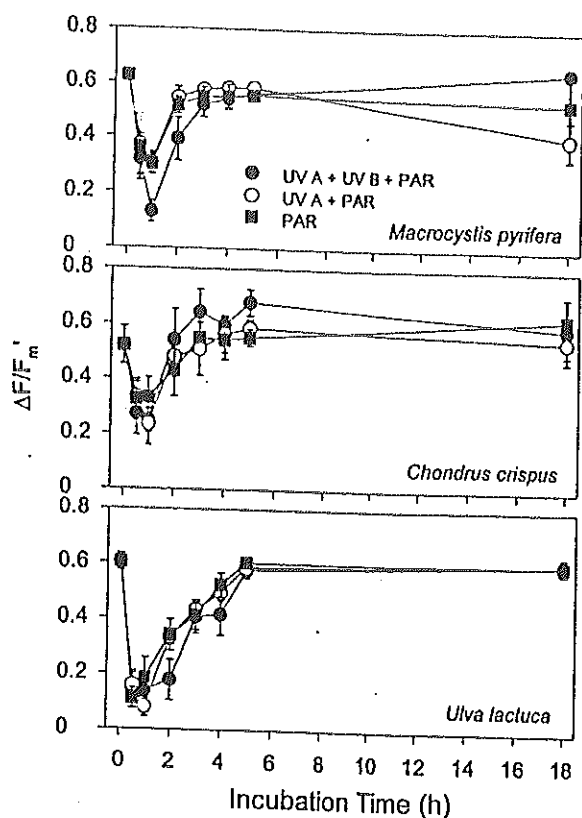


Figure 3. Photoinhibition and recovery of pretreatment effective quantum yield ($\Delta F/F_m'$) for *Macrocyctis pyrifera*, *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* exposed for 1 h to UV-A, UV-B and PAR treatments during the first day of the experimental period. Yield values ($X \pm \text{SD}$, $n \geq 6$) are expressed as percentages of maximum electron transport rates.

ture tanks, and values were similar to those observed at 1 m depth in the 100% I_0 culture tank.

Effective quantum yield values at the beginning of the experiments decreased significantly ($p < 0.05$) in

M. pyrifera, *C. crispus* and *U. lactuca* when incubated for 1 h under UV-A + UV-B + PAR, UV-A + PAR and PAR (Figure 3). In *M. pyrifera*, $\Delta F/F_m'$ values decreased to 20% of control values when incubated with UV-A + UV-B + PAR, while values decreased to approximately 50% when incubated under the UV-A + PAR and PAR treatments. Values of $\Delta F/F_m'$ values in *U. lactuca* and *C. crispus*, decreased in all treatments to approximately 20 and 50% of the control values, respectively. A similar pattern of decreasing $\Delta F/F_m'$ values in the three species was observed after incubating the tissue for 5 days in the culture tanks.

Complete recovery of effective quantum yield ($\Delta F/F_m'$) after the incubation period with UV-A, UV-B and PAR treatments was observed within 5 hours in *C. crispus* and *U. lactuca*, however, recovery in *M. pyrifera* reached only 90% of the pretreatment levels (Figure 3). The recovery of $\Delta F/F_m'$ was maintained for at least 17 h after the UV and PAR treatments in all three species. The recovery levels of *C. crispus* reached values above pretreatment levels, suggesting that the tissue was slightly photoinhibited prior to the experimental treatment. There was a similar effect of UV-A + UV-B + PAR, UV-A + PAR and PAR on photoinhibition of *M. pyrifera*, *C. crispus* and *U. lactuca* incubated under 100% and 8% I_0 (data not shown).

The effect of UV and PAR treatments on $\Delta F/F_m'$ varied in *M. pyrifera*, *C. crispus* and *U. lactuca* at the beginning of the experiments and after incubation for 5 days in the culture tanks (Figure 4). Except for *C. crispus* under the PAR treatment, values of $\Delta F/F_m'$ were significantly greater ($p < 0.05$) after the exposure to all UV and PAR treatments in all three species after incubation for 5 days under natural irradiance levels in the culture tanks. The values of $\Delta F/F_m'$ after 5 days of incubation in all three species, however, were always

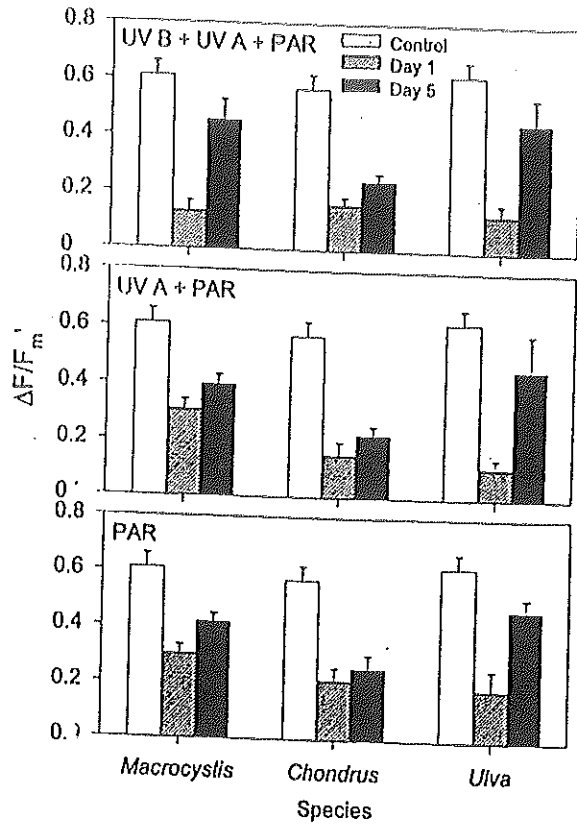


Figure 4. Effective quantum yield values for *Macrocyctis pyrifera*, *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* exposed to UV-A + UV-B + PAR, UV-B + PAR and PAR at the beginning of the experiment and after 5 days of incubation in the culture tanks. Controls indicate the levels of $\Delta F/F_m'$ prior to the UV and PAR treatments.

lower than the UV and PAR pretreatment levels which served as controls. *M. pyrifera* and *U. lactuca* showed the greatest reduction of photoinhibition under all UV and PAR treatments after 5 days of incubation under natural irradiance levels. However, the greatest reduction of the photoinhibitory effect in all species after 5 d of incubation in the culture tanks was observed in thalli tested for UV-A radiation.

The rate of recovery after photoinhibition varied among *M. pyrifera*, *C. crispus* and *U. lactuca* and among the different UV and PAR treatments (Table 2). The rate of recovery after photoinhibition (UV or PAR) for all species, however, was in general slower at the end of the experimental period in the culture tanks. Recovery rates for *M. pyrifera* after the UV and PAR treatments were 4- to 10-fold greater ($p < 0.05$) at the beginning of the experiments than after 5 days of incubation in the culture tanks. In *C. crispus*, recovery rates in tissue tested for UV-B inhibition were 2-fold

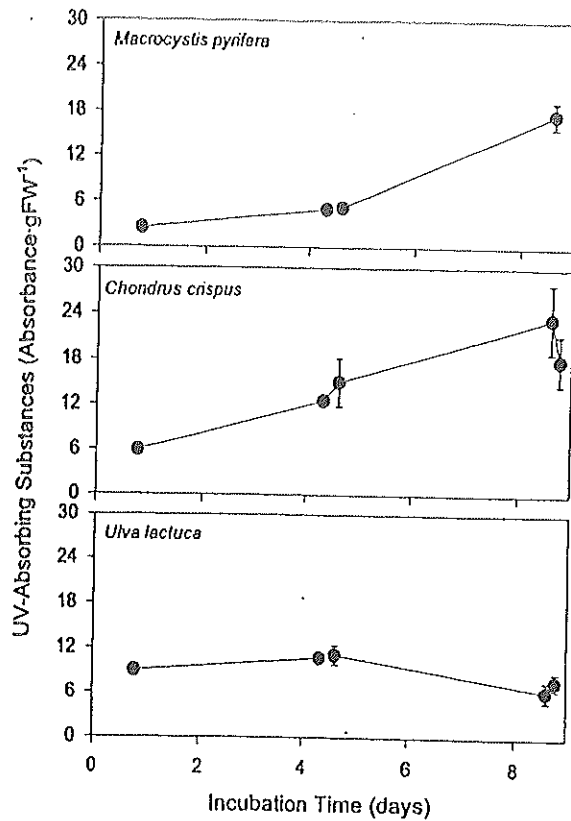


Figure 5. UV-absorbing compounds (λ 330) of extracts of *Macrocyctis pyrifera*, *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* exposed 100% I_0 throughout the experimental period.

greater ($p < 0.05$) at the first day of incubation than after 5 days in the culture tanks.

Levels of UV-absorption (λ 330 nm) increased as a function of incubation time in the tissue of *M. pyrifera* and *C. crispus*, while no variations were observed in *U. lactuca* (Figure 5). The levels of UV-absorption increased 6-fold in *M. pyrifera* and increased 4-fold in *C. crispus* after 8 days in the culture tanks. Chlorophyll *a* levels were approximately 0.17, 0.14 and 0.70 mg g fresh weight⁻¹ for *M. pyrifera*, *C. crispus* and *U. lactuca*, respectively, and levels did not fluctuate ($p > 0.05$) throughout the experimental period in any of the species studied (data not shown).

Discussion

Marine macrophytes in culture systems are generally reared in shallow water columns and as a consequence they may be exposed to elevated dosages of natural solar irradiance. Under these conditions, high levels of UV or PAR radiation have been demonstrated to

Table 2. Analysis of covariance of the recovery slope rates after UV and PAR treatments in *Macrocystis pyrifera*, *Chondrus crispus* and *Ulva lactuca* after 1 and 5 days in the culture systems. S.D. indicates standard deviation; d.f., degrees of freedom; ***, $p < 0.001$ and n.s., not significant

Species	Treatment	Day	*Slope	S.D.	d.f.	F	Signif.
<i>Macrocystis pyrifera</i>	UV-B + UV-A + PAR	1	0.193	0.017	67	102.3	***
		5	0.026	0.006			
	UV-A + PAR	1	0.137	0.013	79	70.9	***
		5	0.033	0.005			
	PAR	1	0.122	0.014	75	41.5	***
		5	0.032	0.005			
<i>Chondrus crispus</i>	UV-B + UV-A + PAR	1	0.120	0.015	67	14.1	***
		5	0.066	0.005			
	UV-A + PAR	1	0.087	0.013	70	0.9	n.s.
		5	0.075	0.005			
	PAR	1	0.071	0.011	79	0.9	n.s.
		5	0.059	0.006			
<i>Ulva lactuca</i>	UV-B + UV-A + PAR	1	0.109	0.007	100	1.0	n.s.
		5	0.098	0.007			
	UV-A + PAR	1	0.109	0.006	89	2.1	n.s.
		5	0.092	0.010			
	PAR	1	0.102	0.005	88	1.7	n.s.
		5	0.091	0.006			

* $(\Delta F_v/F_m') h^{-1}$.

damage the photosynthetic apparatus causing photoinhibition in a number of marine algae (Figuerola et al., 1997). While most studies deal with the effect of high levels of solar radiation on photoinhibition of marine macrophytes in the field (Figuerola et al., 1997), there are few studies that deal with the effect of UV and PAR radiation in culture systems. Here we clearly demonstrate that marine macrophytes in culture systems can be photoinhibited as a consequence of high UV and PAR radiation in culture systems.

The observed decrease in effective quantum yield due to an increase in UV-B radiation in *M. pyrifera* here is consistent with results observed in other marine algae (Figuerola et al., 1997). Photoinhibition has been shown to be less severe when marine algae are exposed to reduced solar irradiances (Figuerola et al., 1997). This suggests that blades of *M. pyrifera* below the canopy are less susceptible to photodamage by UV irradiance or high PAR levels. It has also been reported that UV reduces both the light-saturated and light-limited rates of photosynthesis by 50% in *Macrocystis pyrifera*, however, no significant change in the rate of dark respiration was found (Clendennen et al., 1996). A significant impairment of photosystem II reaction center was observed here, suggesting that PSII is a

major site of damage. In addition, a loss of energy transfer from light-harvesting pigments (fucoxanthin, chlorophylls *a* and *c*) to PSII indicate that the main light-harvesting complex in *M. pyrifera*, is other site of damage (Clendennen et al., 1996).

High irradiance levels have been shown to reduce effective quantum yield and oxygen evolution in a number of marine algae (Ramus & Rosenberg, 1980; Hanelt et al., 1993). The similar photoinhibitory response in tissue from *C. crispus* and *U. lactuca* incubated under UV-A + UV-B + PAR, UV-A + PAR and PAR here suggests that in some species the high levels of PAR accounts for most of the photodamage in culture systems. Similar responses have been observed in Rhodophytes (Lorenz et al., 1997) where energy transfer in the phycobilisomes (PBS) decreases as a response to increasing irradiance. The uncoupling of antenna pigments within the photosynthetic apparatus of the Rhodophytes might be a photoadaptive mechanism to protect the PS II from photodamage after high exposure to high levels of PAR and UV radiation.

The recovery of effective quantum yield in the three species studied was complete within 5 h after treatments with high PAR levels and UV radiation. This is consistent with observations in other studies

where recovery of the $\Delta F/F_m'$ values after exposure to UV radiation of high PAR levels takes minutes to hours (Figueroa et al., 1997; Hanelt, 1998). However, full recovery of photosynthesis after strong photoinhibition has also been shown to require more than 2 d in some Rhodophytes (Hanelt, 1992). It is possible that photoinhibition in culture systems is decreased due the pulse dosage of high PAR and UV radiation caused by the circulation of the tissue from the bottom to the surface of the tank and the elevated K_d values within the tanks. The results here also indicate that complete recovery of the photosynthetic apparatus can be accomplished during the night period. Lowest K_d values in the culture tanks were observed in the morning period as a consequence of the angle of the sun. This suggests that the greatest photoinhibitory damage in the cultured seaweeds could occur in the first part of the day. Similar results have been observed in seaweeds exposed to high irradiance levels in the field (Jimenez et al., 1998). Increasing seaweed biomass or filtering irradiance levels in the culture tanks could decrease such photoinhibitory damage. It is also possible that increasing seaweed circulation rates (top-bottom) within the culture tank might provide additional protection against photoinhibition.

Damage to the photosynthetic components and nucleic acids by elevated UV and PAR radiation has been suggested in a number of studies (Smith et al., 1992; Clendennen et al., 1996). Furthermore, chlorophyll and biliprotein levels as well as the synthesis of specific amino acids in marine algae have been shown to decrease relative to an increase in UV-B radiation (Figueroa et al., 1997). The BEI_{DNA} values observed in the culture tanks here indicate that UV and PAR levels absorbed by the seaweeds in culture tanks could damage their nucleic acids as well as their photosynthetic apparatus. The reduction of BEI_{DNA} within the culture tanks closely followed the exponential attenuation of PAR and UV irradiance in water (Helbling et al., 1994; Kirk, 1994) and fluctuations from the calculated values are probably the result of variation in daily K_d values within the tanks.

The slower recovery rates in *M. pyrifera* under all treatments and *C. crispus* under UV-B treatment after 5 days in the culture tanks suggest at least two different modes of action of high levels of solar radiation on the photosynthetic apparatus. First, a direct damage to PS II to which some species might be able to photoadapt and second, a damage to the repair mechanism of the photosynthetic complex. The recovery of the effective quantum yield has been shown to decrease in subtidal

species after transplantation to shallow depths and thus exposed to elevated PAR levels compared to intertidal species (Hanelt, 1998). It has been argued that the slowing of the repair mechanisms in these species is the result of direct photodamage to PS II rather than just dynamic photoinhibition (Hanelt, 1998). However, it is possible that the destruction of pigments might also reduce the energy transfer for longer periods of time, resulting in slower recovery times (Lorenz et al., 1997). While chlorophyll levels did not vary throughout the experimental period in the three species, accessory pigments might have been damaged as a result of increasing UV and PAR radiation levels.

The synthesis and accumulation of UV-absorbing compounds (280–400 nm), like mycosporine-like amino acids (MAAs) and phenolic compounds, have been reported in a number of seaweed species (Karsten et al., 1998; Franklin et al., 1999). Phenolic compounds and MAAs are synthesized by algae to minimize photodamage from UV radiation (Franklin et al., 1999). Rhodophytes in general, and a few Phaeophytes and Chlorophytes are known to synthesize and accumulate the MAAs in temperate and tropical ecosystems (Karsten et al., 1998). This is consistent with the observed accumulation of UV-absorption in *M. pyrifera* and *C. crispus* in the culture tanks here. This suggests that seaweeds in culture systems respond to elevated UV and PAR radiation stress through the synthesis of photoprotective organic molecules to shield their photosynthetic system. While photoinhibition decreased as a function of incubation time in *U. lactuca*, there was no noticeable increment of UV-absorption. This indicates that Chlorophytes in culture tanks might respond to elevated UV and PAR levels through mechanisms other than the synthesis of UV-absorbing compounds. It has also been demonstrated that subtidal seaweeds immediately increase the accumulation of the MAAs shinorine, aterina and palythine when brought to shallow depths (Franklin et al., 1999). This suggests that subtidal seaweeds that are cultured in tanks with shallow water columns might increase the synthesis and accumulation of UV-absorbing compounds as a result of increasing UV and PAR irradiance levels. It is also possible that concentrations of UV-absorbing compounds vary within a single frond of *M. pyrifera*, since blades at the bottom are much less exposed to UV and PAR levels compared to the surface canopy (North, 1994).

Results of the present study have important implications for the culturing of seaweeds in shallow water columns as well as for marine macroalgae inhabiting

the mesolitoral. While seaweeds have mechanisms to protect their photosynthetic apparatus, it is clear that the rearing of marine macroalgae under current culture conditions might enhance photoinhibition by increasing UV or PAR exposure to the tissue, thus reducing total productivity. Such photoinhibitory mechanisms could be reduced mechanically by applying filters to the culture systems or by manipulating the density of the seaweeds in the culture tanks. However, an increase of global UV-B radiation might promote changes in the coastal macroalgal ecology by decreasing the ability of algae to repair photoinhibitory damage to their photosynthetic apparatus.

Acknowledgements

We thank Dr Jose A. Zertuche-Gonzalez for providing the culture facility during the experiment. Jose Guzmán maintained the seaweed cultures throughout the experimental period. This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (I26655-N), Universidad Autónoma de Baja California (4078-13, 4023). The study was also supported by the Ministerio de Educación y Cultura, Spain (CICYT AMB97-1021-C02-01) and the European Union (Environmental and Climate Programme, ENV4-CT96-0188 and FEDER, IFD97-0824).

References

- Blumbaler M, Ambach W (1990) Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in alpine regions. *Science* 248: 206–208.
- Bruhn J, Gerard VA (1996) Photoinhibition and recovery of the kelp *Laminaria saccharina* at optimal and superoptimal temperatures. *Mar. Biol.* 125: 639–648.
- Chubachi S (1985) A special ozone observation at Syowa station Antarctica from February 1982 to January 1983. In Zerefos CS, Ghazi A (eds), *Atmospheric Ozone*. Dordrecht: D. Reidel Publishing Co., pp. 285–289.
- Clendennen SK, Zimmerman RC, Powers DA, Alberte RS (1996) Photosynthetic response of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Phaeophyceae) to ultraviolet radiation. *J. Phycol.* 32: 614–620.
- Figueroa FL, Salles S, Aguilera J, Jimenez C, Mercado J, Viñela B, Flores-Moya A, Altamirano M (1997) Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 151: 81–90.
- Franklin LA, Yakovleva I, Karsten U, Luning K (1999) Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *J. Phycol.* 35: 682–693.
- Frederick JE, Snell HE (1988) Ultraviolet radiation levels during the Antarctic spring. *Science* 241: 438–440.
- Häder DP, Lopez-Figueroa F (1997) Photocophysiology of marine macroalgae. *Photochem. Photobiol.* 66: 1–14.
- Häder DP, Lebert M, Mercado J, Aguilera J, Salles S, Flores-Moya A, Jimenez C, Figueroa FL (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 DP, Lebert M, Flores-Moya A, Jimenez C, Mercado J, Salles S, Aguilera J, Figueroa FL (1997) Effects of solar radiation on the photosynthetic activity of the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. *J. Photochem. Photobiol.* 37: 196–202.
- Häder DP, Lebert M, Marangoni R, Colombetti G (1999) ELDONET-European Light Dosimeter Network hardware and software. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 52: 51–58.
- Hanelt D (1992) Photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the south Chinese Sea. *Mar. Ecol. Progr. 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, Huppertz K, Nultsch W (1993) Daily course of photosynthesis and photoinhibition in marine macroalgae investigated in the laboratory and field. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 97: 31–37.
- Hanelt D, Wiencke C, Nultsch W (1997) Influence of UV radiation on the photosynthesis of Arctic macroalgae in the field. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 38: 40–47.
- Helbling EW, Villafañe V, Holm-Hansen O (1994) Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing. *Antarctic Research Series* 62: 207–227.
- Henley WJ, Levavasseur G, Franklin LA, Lindley ST, Ramus J, Osmond CB (1991) Diurnal responses of photosynthesis and fluorescence in *Ulva rotundata* acclimated to sun and shade in outdoor culture. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 75: 19–28.
- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c₁ and c₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 191–194.
- Jimenez C, Lopez-Figueroa F, Salles S, Aguilera J, Mercado J, Viñela B, Flores-Moya A, Lebert M, Häder DP (1998) Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of southern Spain. *Bot. Mar.* 41: 329–338.
- Karsten U, Sawall T, Hanelt D, Bischof K, Lopez-Figueroa F, Flores-Moya A, Wiencke C (1998) An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Bot. mar.* 41: 443–453.
- Kirk JT (1994) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. 2nd Edn. Cambridge University Press, Cambridge 509 pp.
- Krause GH, Weis E (1991) The photosynthetic apparatus and chlorophyll fluorescence: an introduction. In Lichtenthaler HK (ed.), *Applications of Chlorophyll Fluorescence*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 3–11.
- Lapointe BE (1981) The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* v. *angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycol.* 17: 90–95.
- Lapointe BE, Duke CS (1984) Biochemical strategies for growth of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta) in relation to light intensity and nitrogen availability. *J. Phycol.* 20: 488–495.
- Lorenz M, Schubert H, Forster RM (1997) *In vitro*- and *in vivo*-effects of ultraviolet-B radiation on the energy transfer in photobilisomes. *Photosynthetica* 33: 517–527.
- North WJ (1994) Review of *Macrocystis* biology. In Akatsuka I (ed.), *Biology of Economic Algae*. SPB Academic Publishing, 447–527.

- Ramus J, Rosenberg G (1980) Diurnal photosynthetic performance of seaweeds measured under natural conditions. *Mar. Biol.* 56: 21-28.
- Schreiber U, Endo T, Mi H, Asada K (1995) Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by the saturation pulse method: particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. *Pl. Cell Physiol.*, Tokyo 36: 873-882.
- Smith RC, Prezelin BB, Baker KS, Bidigare RR, Boucher NP, Coley T, Karentz D, MacIntyre S, Matlick HA, Menzies D, Ondrusek M, Wan Z, Waters JK (1992) Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255: 952-958.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*. W.H. Freeman and Company, New York, 859 pp.

