



Universidad de Málaga

Facultad de Ciencias
Departamento de Ecología y Geología
Área de Ecología

Tesis Doctoral

Fotorregulación y efecto del nitrógeno inorgánico en
la acumulación de aminoácidos tipo micosporina
en algas rojas

Nathalie Korbee Peinado

Málaga, 2003

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la concesión de una beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Los trabajos se han realizado y financiado dentro del Grupo de Investigación UVIFAN, fotobiología y Ecofisiología de algas (RNM 295, Junta de Andalucía) y en el marco de los proyectos titulados “Red piloto de medida de radiación ultravioleta-fotosintética en Andalucía. UVIFAN” (FEDER 1FD97-0824) y “DEPUSIAL” (MCYT, AGL-2001-1888-CO3-O2).

Parte de los resultados han sido presentados en el V Congreso de Fotoquímica del Grupo Especializado de fotoquímica (GRUFO) de la Real Sociedad Española de Química, Torremolinos (Málaga), 2001; en el 7º Congreso Internacional de Ficología, Thessaloniki (Grecia), 2001; en el 1º Congreso de la Sociedad Internacional de Ficología Aplicada, Aguadulce, Roquetas de Mar (Almería), 2002 y en el 3^{er} Congreso Europeo de Ficología, Belfast (Irlanda), 2003. Y se encuentra en proceso de publicación en la revista *J. Phycol.*

A mis padres

A Paco

*La ciencia se compone de errores, que
a su vez son los pasos hacia la verdad.*

Julio Verne

*La ciencia avanza a pasos, no
a saltos.*

T.B. Macaulay

Índice:

Abreviaturas y símbolos	1
Introducción	3
1. Radiación ultravioleta. Efectos biológicos en organismos acuáticos.....	6
1.1. Aminoácidos tipo micospolina (MAAs).....	7
1.1.1. Propiedades de los MAAs.....	8
1.1.2. Biosíntesis de los MAAs.....	9
1.1.3. MAAs en organismos acuáticos.....	10
1.1.4. Funciones propuestas de los MAAs.....	14
1.1.4.1. Papel fotoprotector de los MAAs.....	15
2. Acumulación de MAAs y disponibilidad de nitrógeno inorgánico.....	19
Objetivos	23
Material y métodos	27
M.1. Material biológico.....	29
M.2. Localidades de muestreo de las especies del género <i>Porphyra</i>	34
M.2.1. Lagos (Málaga): <i>Porphyra leucosticta</i>	34
M.2.2. Helgoland (Alemania): <i>Porphyra umbilicalis</i>	35
M.2.3. Barrancas Blancas (Playa Unión, Rawson, Chubut, Argentina): <i>Porphyra columbina</i>	35
M.3. Medidas de radiación solar y artificial.....	36
M.4. Fuentes de radiación artificial.....	37
M.5. Dosis de radiación y espectros de acción.....	38
M.6. Tratamientos de luz.....	39
M.7. Medios de cultivo.....	41
M.7.1. Medio Provasoli.....	41
M.7.2. Agua de mar artificial.....	41
M.8. Medida de la tasa de fotosíntesis por fluorescencia <i>in vivo</i> de la clorofila asociada al PSII.....	43
M.9. Medida de la tasa de fotosíntesis por desprendimiento de oxígeno.....	47
M.10. Estimación de la relación peso fresco/peso seco.....	48
M.11. Tasa relativa de crecimiento.....	48

M.12. Estimación del contenido pigmentario.....	49
M.12.1. Clorofila <i>a</i>	49
M.12.2. Ficobiliproteínas.....	49
M.13. Estimación de la concentración de proteínas solubles y estructurales.....	50
M.14. Medidas de carbono y nitrógeno total.....	50
M.15. Método de análisis de MAAs.....	51
M.16. Determinación de aminoácidos libres.....	54
M.17. Estadística.....	55
Capítulo I. Técnica de extracción e identificación de los MAAs. Estabilidad de la porphyra-334 frente a cambios de pH y temperatura. Fluorescencia de la porphyra-334. Estudio preliminar sobre la biosíntesis de los MAAs en <i>P. umbilicalis</i>	57
I.1. Extracción e identificación de los MAAs.....	59
I.1.1. Extracción de los MAAs.....	59
I.1.2. Identificación de los MAAs.....	62
I.2. Purificación de un extracto de MAAs.....	66
I.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad de los MAAs.....	69
I.4. Efecto del pH en la estabilidad de los MAAs.....	70
I.5. Fluorescencia de porphyra-334.....	71
I.6. Biosíntesis de los MAAs en <i>P. umbilicalis</i>	72
I.6.1. Introducción.....	72
I.6.2. Diseño experimental.....	75
I.6.3. Resultados.....	76
Respuesta fotosintética.....	76
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	77
Contenido en aminoácidos libres.....	78
Contenido de MAAs.....	79
Relación MAAs/ficobiliproteínas.....	80
I.6.4. Discusión.....	81
Capítulo II. Distribución taxonómica, espacial (latitudinal y batimétrica) y temporal (escala diaria y estacional) de los MAAs en macroalgas marinas.....	83
II.1. Lugares de muestreo. Zonación.....	85
II.1.1. Isla de las Palomas, Tarifa (Cádiz, España).....	85
II.1.2. Cabo de Gata-Níjar (Almería, España).....	86

II.1.3. Las Palmas de Gran Canaria y Arucas (Gran Canaria, España).....	86
II.1.4. Albufeira (Algarve, Portugal).....	86
II.1.5. Isla de Chiloé (Chile).....	86
II.1.6. Camarones (Argentina).....	87
II.2. Dosis anuales de radiación (PAR, UVA y UVB).....	88
II.3. Distribución taxonómica, espacial y temporal de los MAAs en distintos grupos de macroalgas marinas.....	89
II.3.1. Abreviaturas.....	89
II.3.2. Rhodophyta.....	90
II.3.2.1. Bangiales.....	90
II.3.2.2. Bonnemaisoniales.....	90
II.3.2.3. Ceramiales.....	90
II.3.2.4. Corallinales.....	92
II.3.2.5. Gelidiales.....	93
II.3.2.6. Gigartinales.....	93
II.3.2.7. Gracilariales.....	95
II.3.2.8. Nemaliales.....	95
II.3.2.9. Palmariales.....	95
II.3.2.10. Plocamiales.....	96
II.3.2.11. Rhodymeniales.....	96
II.3.3. Phaeophyta.....	96
II.3.3.1. Dictyotales.....	96
II.4. Estacionalidad en la acumulación de MAAs en <i>Bangia atropurpurea</i> , <i>Porphyra leucosticta</i> , <i>Caulacanthus</i> sp., <i>Corallina</i> sp. y <i>Gelidium pusillum</i>	97
II.4.1. Especies recolectadas en Lagos (Málaga) <i>Bangia atropurpurea</i> , <i>Porphyra leucosticta</i> , <i>Caulacanthus</i> sp. y <i>Corallina</i> sp.....	97
II.4.1.1. Medidas de radiación con el radiómetro ELDONET.....	97
II.4.1.2. Contenido total de MAAs.....	98
II.4.1.3. Tipos de MAAs.....	99
II.4.1.4. Correlación entre MAAs y dosis de radiación.....	104
II.4.2. Estacionalidad en la acumulación de MAAs en <i>Gelidium pusillum</i> recolectado en Tarifa (Cádiz).....	105
II.4.2.1. Medidas de radiación con el radiómetro ELDONET.....	105
II.4.2.2. Contenido total de MAAs.....	106
II.4.2.3. Tipos de MAAs.....	106
II.4.2.4. Correlación entre MAAs y dosis de radiación.....	108
II.5. Discusión.....	109

II.5.1. Contenido de MAAs en distintos grupos taxonómicos, latitudes y zonación...	110
II.5.1.1. Bangiales.....	110
II.5.1.2. Bonnemaisoniales.....	111
II.5.1.3. Ceramiales.....	112
II.5.1.4. Corallinales.....	115
II.5.1.5. Gelidiales.....	116
II.5.1.6. Gigartinales.....	118
II.5.1.7. Gracilariales.....	120
II.5.1.8. Nemaliales, Palmariales, Plocamiales y Rhodymeniales	120
II.5.1.9. Dictyotales.....	121
II.5.1.10. Síntesis.....	121
II.5.2. Estacionalidad.....	123

Capítulo III. Efecto a corto plazo de la RUV y PAR en la acumulación de MAAs y el estado fotosintético en dos especies del género *Porphyra*.....127

III.1. Efecto a corto plazo de fuentes artificiales de RUV y PAR en <i>Porphyra leucosticta</i> sobre la acumulación de MAAs y el estado fotosintético.....	129
III.1.1. Diseño experimental.....	129
III.1.2. Resultados.....	130
Respuesta fotosintética.....	130
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	132
Acumulación de proteínas solubles.....	133
Contenido de MAAs.....	134
Relación MAAs-rendimiento cuántico efectivo-dosis de radiación.....	136
III.2. Efecto a corto plazo de fuentes artificiales de RUV y PAR sobre la acumulación de MAAs y el estado fotosintético de dos fototipos de <i>P. columbina</i> (sol y sombra)	137
III.2.1. Diseño experimental.....	137
III.2.2. Resultados.....	138
Respuesta fotosintética.....	138
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	139
Contenido de MAAs.....	141
III.3. Efecto a corto plazo de la radiación solar (RUV y PAR) en <i>P. columbina</i> sobre la acumulación de MAAs y el estado fotosintético.....	144
III.3.1. Diseño experimental.....	144
III.3.2. Resultados.....	145

Respuesta fotosintética.....	145
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	146
Contenido de MAAs.....	147
III.4. Discusión.....	149
III.4.1. Respuesta fotosintética.....	149
III.4.2. Variaciones pigmentarias.....	153
III.4.3. Variaciones del contenido de MAAs.....	154
Capítulo IV. Efecto de la irradiancia y calidad lumínica en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de <i>P. leucosticta</i>.....	157
IV.1. Efecto de la irradiancia PAR en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de <i>P. leucosticta</i>	159
IV.1.1. Diseño experimental.....	159
IV.1.2. Resultados.....	160
Respuesta fotosintética.....	160
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	161
Acumulación de proteínas solubles.....	162
Relación FB/PtS.....	163
Contenido de MAAs.....	163
Correlaciones.....	165
IV.2. Efecto de la calidad lumínica (luz blanca, azul, verde, amarilla y roja) en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de <i>P. leucosticta</i>	166
IV.2.1. Diseño experimental.....	166
IV.2.2. Resultados.....	167
Respuesta fotosintética.....	167
Crecimiento.....	169
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	170
Acumulación de proteínas solubles y estructurales.....	172
Relación FB/PtS.....	173
Carbono y nitrógeno total. Relación C/N.....	173
Absortancia.....	175
Contenido de MAAs.....	175
Correlaciones.....	177
IV.3. Efecto de fuentes artificiales de RUV y PAR en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético a lo largo de una fase gametofítica de <i>P. leucosticta</i>	179
IV.3.1. Diseño experimental.....	179

IV.3.2. Resultados.....	180
Respuesta fotosintética.....	180
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	181
Acumulación de proteínas solubles y estructurales.....	183
Relación FB/PtS.....	184
Carbono y nitrógeno total. Relación C/N.....	185
Contenido de MAAs.....	187
Correlaciones.....	189
IV.4. Discusión.....	190
IV.4.1. Irradiancias PAR.....	190
IV.4.2. Calidad lumínica.....	192
IV.4.3. Efecto de la RUV y PAR a lo largo de un ciclo de la fase gametofítica...197	
Capítulo V. Efecto combinado de la RUV y la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de tres especies del género <i>Porphyra</i>.....	201
V.1. <i>Porphyra columbina</i>	203
V.1.1. Diseño experimental.....	203
V.1.2. Resultados.....	205
V.1.2.1. Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.....	205
Respuesta fotosintética.....	205
Crecimiento.....	208
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	208
Absortancia.....	209
Contenido de MAAs.....	210
Relaciones pigmentarias.....	210
Correlaciones.....	211
V.1.2.2. Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.....	212
Respuesta fotosintética.....	212
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i>).....	212
Contenido de MAAs.....	213
V.2. <i>Porphyra leucosticta</i>	214
V.2.1. Diseño experimental.....	214
V.2.2. Resultados.....	215
V.2.2.1. Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.....	215
Respuesta fotosintética.....	215

Crecimiento.....	216
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	216
Contenido de proteínas solubles.....	217
Carbono y nitrógeno total. Relación C/N.....	218
Absortancia.....	219
Contenido de MAAs.....	220
Relaciones pigmentarias.....	221
Correlaciones.....	222
V.2.2.2. Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.....	223
Respuesta fotosintética.....	223
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	223
Contenido de MAAs.....	224
V.3. <i>Porphyra umbilicalis</i>	225
V.3.1. Diseño experimental.....	225
V.3.2. Resultados.....	226
V.3.2.1. Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.....	226
Respuesta fotosintética.....	226
Crecimiento.....	227
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	227
Contenido de proteínas solubles y estructurales.....	228
Absortancia.....	229
Contenido de MAAs.....	229
Relaciones pigmentarias.....	230
Correlaciones.....	231
V.3.2.2. Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.....	231
Respuesta fotosintética.....	231
Contenido pigmentario (clorofila <i>a</i> y ficobiliproteínas).....	232
Contenido de MAAs.....	233
V.4. Síntesis de los resultados del capítulo.....	234
V.5. Discusión.....	237
Síntesis	245
Conclusiones	251
Bibliografía	257

Abreviaturas y símbolos:

α	eficiencia fotosintética
a	área
A	absortancia
AP	alto PAR
APUV	alto PAR+RUV
AS	asterina-330
AT	absortancia total
BMV	bajamar mareas vivas
BP	bajo PAR
BPUV	bajo PAR+RUV
Cl <i>a</i>	clorofila <i>a</i>
DBE	dosis biológicamente efectiva
Dicbre	diciembre
DO	densidad óptica
DO _{λ}	densidad óptica a la longitud de onda λ nm
E	irradiancia incidente
e ⁻	electrones
ϵ	coeficiente de extinción molar
ϵ'	coeficiente de extinción específico
E _k	irradiancia saturante
F	flujo
FC	ficocianina
FE	ficoeritrina
FE/FC	relación ficoeritrina/ficocianina
FB	ficobiliproteínas
F _m	fluorescencia máxima en plantas adaptadas a oscuridad
F _m '	fluorescencia máxima en plantas adaptadas a luz
F _o	fluorescencia basal en plantas adaptadas a oscuridad
F _o '	fluorescencia basal en plantas adaptadas a luz
F _t	fluorescencia instantánea
F _v	fluorescencia variable
F _v /F _m	rendimiento cuántico óptimo o máximo
Φ_{PSII}	rendimiento cuántico efectivo
GMT	hora según el meridiano de Greenwich
H	altura del triángulo
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IBE	irradiancia biológicamente efectiva
λ	longitud de onda
LED	diodos emisores de luz

MAA	aminoácido tipo micosporina
MG	mycosporine-gly
n	número de réplicas
Novbre	noviembre
P	tratamiento PAR
PA	tratamiento PAR+UV-A
PAB	tratamiento PAR+UV-A+UV-B
PAM	pulso de amplitud modulada
PAR	radiación fotosintéticamente activa (400-700 nm)
PEST	proteínas estructurales
PF	peso fresco
PMV	pleamar mareas vivas
PNE	palythine
POL	palythinol
PR	porphyra-334
PS	peso seco
PSI	fotosistema I
PSII	fotosistema II
PtS	proteínas solubles
qN	amortiguamiento no fotoquímico
R	reflectancia
R _o	respiración en oscuridad
Rubisco	ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa
RUV	radiación ultravioleta
S	superficie
Septbre	septiembre
SH	shinorine
T	transmitancia
TFB	tasa de fotosíntesis bruta
TFB _{máx}	tasa de fotosíntesis bruta máxima
TRC	tasa relativa de crecimiento
TTE	tasa de transporte de electrones
UA	unidades de absorbancia
UVA	ultravioleta A (315-400 nm)
UVB	ultravioleta B (280-315 nm)
V	volumen
W	base del triángulo

INTRODUCCIÓN

En este trabajo se analizará el papel de la radiación lumínica y la disponibilidad de nutrientes en la fotosíntesis y en la acumulación de pigmentos fotosintéticos y moléculas fotoprotectoras.

La radiación solar es la fuente primaria de energía para la vida sobre la Tierra; ésta puede afectar al crecimiento y al desarrollo de las plantas tanto como fuente de energía mediante la fotosíntesis, como fuente de calor y como fuente de información ambiental. La irradiancia, la composición espectral, la dirección con que incide y su fotoperiodo son aspectos del ambiente lumínico que cambian en condiciones naturales y proporcionan información acerca de las condiciones ambientales. Las plantas poseen fotorreceptores que les permiten emplear dicha información en la modulación de distintos aspectos del crecimiento y desarrollo.

Las algas necesitan carbono inorgánico, agua, luz y nutrientes para la fotosíntesis y el crecimiento. El nitrógeno es uno de los elementos químicos más abundantes en la materia viva, todos los aminoácidos contienen nitrógeno y está presente en otras importantes biomoléculas (como son la clorofila, la ficobiliproteína, etc). También es el elemento que con más frecuencia limita el crecimiento algal. La asimilación de nitrógeno es un proceso dependiente de la fotosíntesis y del metabolismo del carbono para el aporte de poder reductor, ATP y esqueletos carbonados. Por ello, no sólo el nitrógeno inorgánico, sino también la luz y los azúcares, actúan como señales que modulan positivamente la síntesis y la actividad de diversas enzimas relacionadas con la asimilación del nitrógeno.

En el primer apartado de la introducción se abordarán los efectos biológicos que induce la RUV en los organismos acuáticos y los posibles mecanismos de fotoprotección presentes en los mismos, como la presencia de moléculas pantalla de esta banda de RUV, entre las que se encuentran los aminoácidos tipo micosporina (MAAs, de su abreviatura en inglés mycosporine-like amino acids). Estas moléculas, además de poseer una estructura química que les permite absorber estas longitudes de onda, poseen nitrógeno entre los elementos químicos que la componen. Nos planteamos la posibilidad de que su presencia no sólo se relacione con la cantidad de radiación recibida, sino que también pueda estar relacionada con la disponibilidad relativa de nutrientes (concretamente de nitrógeno) en el medio de cultivo. En el segundo apartado de la introducción se tratará este aspecto.

1. Radiación ultravioleta. Efectos biológicos en organismos acuáticos.

La radiación solar no llega en su totalidad a la superficie de la Tierra, ciertas longitudes de onda son absorbidas total o parcialmente antes de alcanzarla. La radiación UVB (280-315 nm) representa sólo una pequeña proporción del total de la radiación solar y menos de un 1% del flujo solar total que alcanza la superficie terrestre, pero se trata de un rango de radiación altamente activa en términos biológicos, ya que los fotones de estas bajas longitudes de onda son de mayor energía y son absorbidos por numerosos componentes celulares potenciando una variedad de efectos biológicos. La disminución del ozono estratosférico ha causado un incremento del flujo de radiación UVB sobre la superficie terrestre y los ecosistemas acuáticos (Kerr y McElroy, 1993). La efectividad biológica de la mayoría de las reacciones respecto al UVB se incrementa considerablemente conforme disminuye la longitud de onda (Caldwell *et al.*, 1986). La radiación UVA (315-400 nm) también puede influenciar negativamente en la fotosíntesis (Cullen *et al.*, 1992), pero en muchos casos se ha observado que esta banda tiene un efecto positivo en la fisiología, induciendo procesos fotobiológicos como la actividad fotoliasa para reparar el daño en el ADN (Buma *et al.*, 1997), o en la actividad nitrato reductasa (Viñegla, 2000).

La penetración de la radiación solar es más alta en las aguas oceánicas que en las costeras, llegando el 1% de la radiación UVB que alcanza la superficie terrestre en aguas oceánicas a profundidades de 25-35 m y el de la radiación UVA a 35-50 m y en aguas costeras del litoral andaluz (Cabo de Gata y Tarifa) a profundidades de 17-23 m y 30-45 m respectivamente (Pérez-Rodríguez, 2000).

Entre los componentes celulares que se dañan con la radiación UVB en organismos fotosintéticos se pueden citar proteínas, ADN, ARN y membranas (Buma *et al.*, 1995,1997; Bischof *et al.*, 2000; Vincent y Neale, 2000; Helbling *et al.*, 2001) además también se ven dañados algunos procesos biológicos como la fotosíntesis (Cordi *et al.*, 1997; Figueroa *et al.*, 1997), el crecimiento (Grobe y Murphy, 1994; Altamirano *et al.*, 2000) o la germinación de esporas (Altamirano *et al.*, 2003); al igual que se puede alterar la estructura de las comunidades de macroalgas en los sistemas acuáticos (Bischof *et al.*, 1998).

La sensibilidad frente a la radiación UVB varía según las especies y según los estadios de vida afectados (Dring *et al.*, 1996), sin embargo, existen mecanismos de protección y reparación frente al UV (Mitchell y Karentz, 1993; Karentz *et al.*, 1991 a y b) que en su conjunto complican la evaluación del significado ecológico de los efectos de la RUV en las

macroalgas marinas. Contra el daño fotoquímico se encuentran las siguientes defensas bioquímicas: fotorreactivación de ADN (mediada por radiación PAR y UVA), reparación de la excisión nucleotídica y la recombinación del ADN (Mitchell y Karentz, 1993), acumulación de antioxidantes lipo- e hidrosolubles y la actividad de enzimas antioxidantes (Cockell y Knowland, 1999). Otro mecanismo fisicoquímico contra los efectos dañinos del UV, es la biosíntesis y acumulación de moléculas apantalladoras de UV. Entre estas sustancias con papel potencial como pantalla de la RUV en organismos marinos se encuentran los carotenoides, las ficobiliproteínas, los fenoles, los MAAs.

Puesto que la investigación en torno a estas moléculas es bastante reciente, se recoge en el siguiente apartado de la introducción una revisión de los resultados y conclusiones más representativos en relación con los MAAs.

1.1. Aminoácidos tipo micosporina.

En 1961 Tsujino y Saito descubrieron unas sustancias que absorbían la RUV en algas rojas, las llamó sustancia 334. En 1969 Shibata sugirió que el papel fisiológico en algas verde-azuladas marinas y en corales de estas sustancias era su actuación como filtro ante la RUV o como precursoras de pigmentos ya existentes. Más tarde, Yoshida y Sivalingam (1970), basándose en su espectro de fluorescencia y su posible localización en los cloroplastos, apuntaron a que estas sustancias podían jugar un papel importante en la fotosíntesis. En 1972 Maragos encontró una correlación negativa entre la absorción de estas sustancias y la profundidad a la que se encontraban la colonia de corales, esta fue la primera evidencia experimental de su posible papel fotoprotector frente a la RUV. Más tarde, Sivalingam y colaboradores (1974 y 1976a,b) sugirieron que la sustancia 334 en algas marinas actuaba como un aceptor o transportador temporal de la energía de la RUV hacia las clorofilas del sistema fotosintético, es decir, actuarían como un pigmento accesorio fotosintético en la antena. Esta conclusión la extrajeron teniendo en cuenta el espectro de fluorescencia de esta sustancia y también su posible localización en la fracción soluble de los cloroplastos (Sivalingam *et al.*, 1976b).

Las micosporinas, propiamente dichas y de ahí su nombre, fueron caracterizadas en primer lugar en 1965 por Leach en el hongo *Ascochyta pisi*, se las relacionó con la inducción lumínica de la esporulación. Favre-Bonvin y colaboradores (1976) fueron los primeros en describir la estructura química de una micosporina en el hongo *Stereum hirsutum*, fue denominada micosporina-310. Young y Patterson (1982) postularon que las micosporinas protegían de la RUV del sol a las esporas de hongos en su dispersión por la atmósfera.

En los últimos años, se han aislado de cianobacterias, algas y otros organismos marinos una serie de derivados de la micoporina-310, se trata de derivados imino-carbonil del cromóforo de ciclohexenona de las micoporinas, estos nuevos compuestos se denominaron aminoácidos tipo-micoporina (MAAs). Tanto las micoporinas como los MAAs tienen conjugado en el anillo sustituyentes nitrogenados (amino), aminoácidos o sus amino-alcoholes correspondientes, la glicina es el aminoácido más común presente en los MAAs. Se apunta a que los MAAs se acumulan intracelularmente (García-Pichel y Castenholz, 1993). En 1995 Böhmer y colaboradores describieron en la cianobacteria terrestre *Nostoc commune* MAAs unidos a oligosacáridos (se denominaron OMAAs) estos OMAAs se localizaban en la cubierta extracelular de las cianobacterias, donde formaban complejos de alto peso molecular unidos a dicha cubierta mediante interacciones no covalentes (Hill *et al.*, 1994).

1.1.1. *Propiedades de los MAAs.*

Los MAAs poseen características de compuestos iónicos (son anfóteros) con una temperatura de desnaturalización alta y una alta solubilidad en agua. Los pesos moleculares rondan los 330 Da. Los máximos de absorción se encuentran en el intervalo de 310-360 nm y sus espectros se caracterizan por poseer sólo un pico con un ancho de banda de aproximadamente 20 nm (Karentz, 1994; Carroll y Shick, 1996) y poseen una alta fotoestabilidad (Conde *et al.*, 2000). Se ha postulado que al tratarse de moléculas pequeñas los MAAs ejercen una presión osmótica celular y contribuyen a la turgencia de la célula, por ello, su acumulación en grandes cantidades podría causar efectos fisiológicos; y por lo tanto se hace necesario regular su acumulación para el mantenimiento de la homeostasis (García-Pichel, 1994; Oren, 1997).

Hay descritas 13 micoporinas distintas en hongos (Bandaranayake, 1998). En organismos marinos hay descritos 23 MAAs: mycosporine-gly y asterina-330 (Gleason, 1993), shinorine (Tsujino *et al.*, 1980), porphyra-334 y palythine (Takano *et al.*, 1978 a), palythinol (Dunlap *et al.*, 1986), palythene (Takano *et al.*, 1978b), mycosporine-tau y mycosporine-2-gly (Stochaj *et al.*, 1994), ácido palythenico, mycosporine-thr, mycosporine-gly-ser, mycosporine-gly-val (Karentz *et al.*, 1991b), mycosporine-gly-asp, mycosporine-metilamina-thr (Wu Won *et al.*, 1995), palythine-ser, palythine-thr-sulfato y palythine-ser-sulfato (Wu Won *et al.*, 1997), mycosporine-NMA:ser, mycosporine-NMA:thr; mycosporine-glu-gly, mycosporine-glu y usujirene (Bandaranayake *et al.*, 1996) (figura 1).

Existe una base de datos en Internet, <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1>, en la que resumen algunos aspectos básicos sobre los MAAs, sus propiedades, el método de

extracción, las estructuras químicas de algunos de ellos, etc. Además de unas tablas donde se recogen datos de distintas publicaciones científicas con gran cantidad de especies, recolectadas de distintos lugares y en distintas épocas del año, de cianobacterias, microalgas y macroalgas y en las que se especifican el contenido o únicamente los tipos de MAAs presentes.

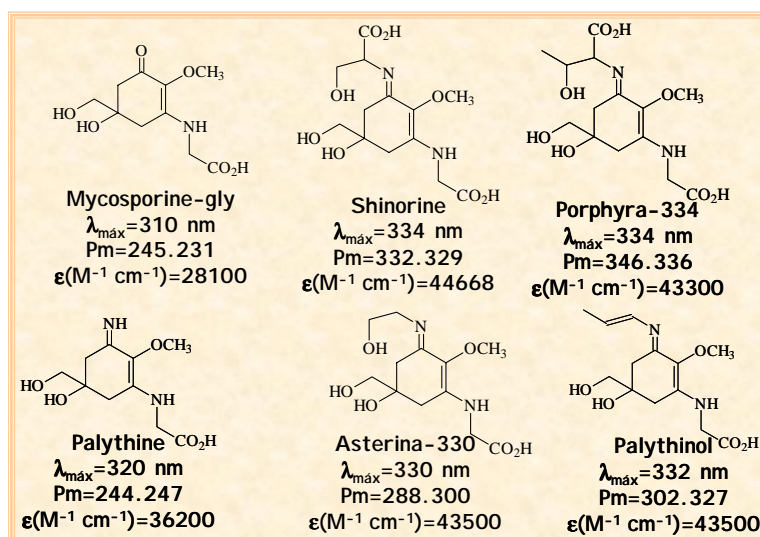


Figura 1. Estructuras químicas, máximos de absorción, pesos moleculares y coeficientes de extinción molar de los seis MAAs presentes con mayor frecuencia en macroalgas marinas (referencias en el texto).

1.1.2. Biosíntesis de los MAAs.

Favre-Bonvin y colaboradores en 1987 fueron los primeros en investigar la biosíntesis de las micosporinas, concretamente de mycosporine-glutaminol en el hongo *Trichothecium roseum*. Estudiaron la incorporación de ácido acético, ácido glicérico y ácido dehidroquinico marcados radiactivamente con carbono 14 y concluyeron que el anillo de ciclohexenona se originaba en la primera parte de la ruta del ácido chiquímico; además, apuntaron a que el 6-deoxygadusol podría ser el precursor de estos anillos (más evidencias en Bandaranake y Rocher, 1999). Las micosporinas se sintetizarían, por lo tanto, en los plástidos y en el citosol. Esta ruta bioquímica está presente en bacterias, hongos y plantas, sin embargo, en células animales no lo está (Bentley, 1990; Haslam, 1993), por lo la presencia de MAAs en algunos animales hay que atribuirle a la dieta (por consumo de micro o macroalgas que contienen MAAs) (evidencias experimentales en Carroll y Shick, 1996; Carrefot *et al.*, 2000; Newman *et al.*, 2000). Una vez incorporado los MAAs al organismo pueden sufrir una serie de reacciones de bioconversión (Dunlap y Shick, 1998).

Las cadenas de los MAAs proceden de los correspondientes aminoácidos que se incorporan al anillo en un paso posterior de condensación. Las variaciones en los últimos pasos de la biosíntesis explican la diversidad de MAAs encontrada en la naturaleza.

Otra evidencia experimental de que la ruta del ácido chiquímico es la vía de síntesis de los anillos de los MAAs la obtuvieron Shick y colaboradores (1999), emplearon un inhibidor de esta ruta metabólica, el herbicida glifosato (N-(fosfometil)-gly), y vieron cómo en 7 días de exposición el contenido en MAAs disminuyó considerablemente e incluso desaparecieron estas moléculas en el coral *Stylophora pistillata*.

En cianobacterias también se ha demostrado el origen del anillo de los MAAs, procede de la ruta del ácido chiquímico, en este estudio se emplearon trazadores radiactivos (acetato y piruvato). Para demostrar la incorporación posterior de cadenas aminoácidas al anillo emplearon moléculas de glicina y serina marcadas también con carbono 14. Además se determinó que la molécula monosustituída mycosporine-gly era la precursora de la bisustituída shinorine (Portwich y García-Pichel, 1999).

La ruta del ácido chiquímico es vital para el metabolismo intermedio y está unida funcionalmente a la fotosíntesis (Bentley, 1990). Por ello, incrementos en las tasas fotosintéticas podrían incrementar el flujo de carbohidratos a través de esta ruta y consecuentemente incrementar la producción de MAAs. Esta dependencia se comprobó en dinoflagelados empleando un inhibidor de la fotosíntesis (Carreto *et al.*, 1990a). También se ha demostrado que cuando disminuía la actividad fotosintética por estrés térmico, disminuía la concentración de MAAs (en presencia o no de UV) (Lesser *et al.*, 1994; Glynn *et al.*, 1993). Sin embargo, la dependencia no es completa, Neale y colaboradores (1998) observaron una estimulación en la biosíntesis de MAAs mucho mayor que el incremento en la fotosíntesis cuando se iluminaba con una luz blanca intensa los cultivos de microalgas, por lo tanto, se deduce que los MAAs no siguen únicamente el carbono fotosintético, sino que la regulación de la síntesis de MAAs es parte de una serie de respuestas a altas irradiancias (Moisan y Mitchell, 2001). Además en la literatura encontramos que la síntesis de algunos MAAs no estaba relacionada con la fotosíntesis ya que se sintetizaban aún no estando presente la radiación PAR (Karsten *et al.*, 1998a).

1.1.3. MAAs en organismos acuáticos.

Entre distintas cepas de **cianobacterias** la variabilidad en el contenido de MAAs es muy grande, es más, en el género *Microcoleus* los patrones de MAAs y carotenoides se usaron para resolver problemas taxonómicos (Karsten y García-Pichel, 1996).

Se determinó una relación directa entre la acumulación de MAAs en cianobacterias y la cantidad de RUV recibida (García-Pichel *et al.*, 1993; Ehling-Schulz *et al.*, 1997; Sinha *et al.*, 1999). Sin embargo, otros autores no observaron influencia alguna de la calidad de luz en la acumulación de MAAs (Quesada *et al.*, 1998).

Los MAAs se inducían por estrés provocado por radiación UV-B y estrés osmótico, además, el sinergismo entre ambos derivaba en un incremento en la acumulación de mycosporine-gly (Portwich y García-Pichel, 1999).

En **microalgas** también se ha estudiado el contenido de MAAs. En dinoflagelados y diatomeas de distintas latitudes se observó una acumulación de MAAs cuando se los exponía a RUV solar o artificial y también cuando se incrementaban las dosis de PAR. Esta acumulación fue en muchos casos especie-dependiente y específica para cada MAAs además de estar controlada por la calidad espectral de la radiación incidente (Carreto *et al.*, 1990a; Lesser, 1996; Wängberg *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1997, 1999; Helbling *et al.*, 1996; Riegger y Robinson, 1997; Wulf *et al.*, 1999; Klisch y Häder, 2000; Newman *et al.*, 2000). Sin embargo, en otros trabajos no se observó una correlación positiva entre exposiciones a radiación UVB y el contenido de MAAs (Helbling *et al.*, 1996; Xiong *et al.*, 1996; Hannach y Sigleo, 1998).

En aguas oceánicas se atribuyeron las propiedades de absorción en el rango de la RUV a los MAAs presentes en el fitoplancton (Vernet *et al.*, 1989; Helbling *et al.*, 1996). Actualmente, se ha demostrado que los MAAs son un componente de la MOD (materia orgánica disuelta) que aunque están presentes en bajas concentraciones contribuyen a la absorción de la RUV (Whitehead y Vernet, 2000).

Marchant y colaboradores (1991) determinaron que en el estadio de vida colonial de la especie *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiofita) se producían compuestos que absorbían luz UV (presumiblemente MAAs, aunque no identificados por HPLC) que eran secretados a la matriz mucilaginosa colonial en respuesta a una exposición a radiación UVB, también se observó un mayor contenido de estas moléculas en células de regiones antárticas que en las de zonas templadas. Sugirieron que estos compuestos protegían de la RUV a los organismos presentes en la columna de agua durante un bloom de *P. pouchetii*. En el dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum*, la RUV provocaba un descenso de la concentración de MAAs dentro de la célula y un incremento en la absorción en el UV en el medio que le rodeaba (Vernet y Whitehead, 1996). La excreción de MAAs al medio puede ser un mecanismo por el que se incrementa el efecto protector de estas moléculas, ya que de este modo la radiación se atenúa antes de entrar en la célula (Sinha *et al.*, 1998).

Se realizaron experimentos para estudiar la relación de simbiosis, en términos de MAAs, entre algas e invertebrados y se observó una acumulación de grandes cantidades de 3 MAAs (mycosporine-gly, shinorine y porphyra-334) en el dinoflagelado *Symbiodinium microadriaticum* (simbionte de *Cassiopeia xamachana*) en presencia de RUV y PAR y no en presencia de PAR solamente. Estos MAAs los transportaban a sus hospedadores. Sin embargo, no se inducía la concentración de MAAs en otras especies relacionadas con la anterior como *Symbiodinium californium*, el simbionte de *Anthopleura elegantissima*, crecido en los mismos regímenes lumínicos indicados para el caso anterior y carente de MAAs en todos los casos (Banaszak y Trench, 1995).

Karsten y colaboradores (1998b) determinaron que especies de **macroalgas** de zonas templadas (como el Sur de España) presentaban una concentración intracelular de MAAs más alta que otras especies de zonas más polares, como prueba de la relación directa existente entre el contenido de MAAs y la dosis anual de luz solar que reciben. Se confirmó que las algas rojas de aguas profundas, las algas verdes y las pardas no poseían MAAs o bien sólo poseían trazas de ellos (otros autores que llegaron a la misma conclusión, Karentz *et al.* 1991b; Karentz, 1994; Molina y Montecino, 1996; Sivalingam *et al.*, 1974; Hoyer *et al.*, 2001); sin embargo, en otras publicaciones se hace referencia a una concentración muy alta de mycosporine-gly en algas pardas y verdes (Banaszak *et al.*, 1998). También una alta concentración de un compuesto que absorbía la RUV con un máximo a 324 nm se detectó en el alga verde *Prasiola crispa*, aunque este compuesto está aún sin identificar, podría tratarse de un MAA (Hoyer *et al.*, 2001). La acumulación de uno u otro tipo de MAA es dependiente de la calidad de la luz incidente y también es dependiente de la especie (Karsten *et al.* 1998b; Franklin *et al.*, 1999).

La concentración de MAAs se incrementaba al transplantar ejemplares de algas rojas desde aguas profundas a aguas someras y además se observó la existencia de un ciclo estacional en la acumulación de MAAs (Post y Larkum, 1993; Karsten *et al.*, 1999). Los ápices de las especies árticas *Devaleraea ramentacea* y *Palmaria palmata* contenían 5 veces más MAAs que la base (Karsten *et al.*, 1999; Karsten y Wiencke, 1999). Ni la radiación PAR, ni la UV (A y B) hacían variar la concentración de MAAs respecto al valor inicial en el alga roja *Porphyra umbilicalis* lo atribuyeron a que la concentración inicial de MAAs era ya muy alta (Gröniger *et al.*, 1999). Tampoco se detectó una inducción de la síntesis de MAAs en el alga roja *Gracilaria cornea*. En este mismo trabajo se comprobó la gran estabilidad de los MAAs ante el estrés ambiental (UV-B y temperatura) (Sinha *et al.*, 2000). Los tejidos reproductores de algas rojas de manglares contenían una alta concentración de MAAs (Karsten *et al.*, 2000).

Hoyer y colaboradores (2001) distinguieron tres tipos de comportamientos; especies que no podían sintetizar MAAs (9 de las 18 algas rojas analizadas), especies que poseían una concentración básica de MAAs que podían variar según la radiación recibida y por último, especies con una concentración interna alta y que se mantiene constante independientemente de las condiciones ambientales. A este grupo pertenece *Bangia atropurpurea* que no presentaba variaciones estacionales en la acumulación de MAAs (Karsten y West, 2000).

Ya que en general, las algas pardas y verdes poseen a lo sumo trazas de MAAs, deben llevar a cabo otras estrategias para protegerse frente a una exposición excesiva a la RUV. La inducción y acumulación de florotaninos (compuestos polifenólicos) después de la exposición a RUV en el alga parda *Aschophyllum nodosum* se describió como un mecanismo de fotoprotección potencial contra la RUV (Pavia *et al.*, 1997). En el alga verde *Dasycladus vermicularis* se identificó otra sustancia de naturaleza fenólica (3,6,7-trihidroxycumarina) que parecía proteger a las células frente a la radiación UVB (Pérez-Rodríguez, 2000), este compuesto se concentraba mayoritariamente en la parte apical del talo, la más expuesta a la RUV, también estaba presente en la parte interna de las paredes celulares y alrededor de la membrana vacuolar (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2003). Estas moléculas del alga verde *Dasycladus vermicularis*, se liberan al agua de mar ante distintas condiciones de estrés, como altas irradiancias y temperaturas, y se propone que protegen a otras algas filtrando parte de la RUV antes de que llegue a estos organismos (Pérez-Rodríguez *et al.*, 2001). En plantas vasculares se ha observado que los fenilpropanoides (derivados de flavinas) las protegen de la RUV (Tevini *et al.*, 1991; Kootstra, 1994).

Dunlap y Chalker (1986) identificaron que las sustancias que absorbían la RUV en **corales** eran MAAs. La concentración de MAAs disminuía logarítmicamente conforme se incrementaba la profundidad (Dunlap *et al.*, 1986; aunque Shick *et al.*, 1991 no encontró tal variación), presentando una gran plasticidad en su capacidad de absorber la RUV (Gleason y Wellington, 1993; Muszynski *et al.*, 1998), según las especies (Teai *et al.*, 1997) o incluso entre dos morfologías de color distintas dentro de la misma especie (Gleason, 1993). La producción y acumulación de MAAs en corales se disparaba con la radiación solar, concretamente con el rango del UV (Jokiel y York, 1982; Dunlap y Shick, 1998; Lesser, 2000). Banaszak y colaboradores (1998) determinaron que algunas especies de corales no respondían disminuyendo la concentración de MAAs al disminuir la RUV, apuntaron a que otras variables, como por ejemplo la movilidad del agua (como ya señalaron Jokiel y colaboradores, 1997) podrían también afectar a la acumulación de los MAAs.

Se ha observado la presencia de MAAs en **otros organismos**, en una bacteria heterotrófica marina (Arai *et al.*, 1992), además algunas especies de los géneros *Pseudoalteromonas* y *Vibrio* pueden transformaban shinorine y porphyra-334 en el medio en mycosporine-glycine o 4-deoxygadusol. También se han detectado MAAs en esponjas (Bandaranayake *et al.*, 1996), anémonas (Banaszak y Trench, 1995), equinodermos (Bandaranayake y Rocher, 1999), moluscos (Ishikura *et al.*, 1997), crustáceos (Grant *et al.*, 1985), ascidias (Kobayashi *et al.*, 1981), platelmintos y anélidos (Karentz, 1994), peces y ratones (Mason *et al.*, 1998). También se han encontrado MAAs en líquenes, sólo en aquellos que tienen cianobacterias de los géneros *Collema*, *Gonohymenia* y *Peltula* como ficobiontes (Büdel *et al.*, 1997).

1.1.4. *Funciones propuestas de los MAAs.*

- Fotoprotector frente la RUV (Karsten *et al.*, 1998b, Banaszak *et al.*, 1998). Esta función será ampliamente descrita en el siguiente apartado.
- Actividad antioxidante *in vitro* (mycosporine-gly) (Dunlap y Yamamoto, 1995). Aunque los resultados obtenidos no serían de aplicación directa a los sistemas vivos, los autores sugirieron que este MAA podría proteger a los organismos del estrés fotooxidativo provocado por los radicales de oxígeno.
- Osmolito orgánico y soluto compatible en comunidades de cianobacterias halofílicas (Oren, 1997). La dilución del hábitat hipersalino en el que vivían estas cianobacterias derivaba en una excreción inmediata desde el interior celular, de manera que el porcentaje de pérdida era aproximadamente proporcional al porcentaje de dilución del medio. Portwich y García-Pichel (1999) determinaron que en *Chlorogloeopsis* la síntesis de mycosporine-gly se producía debido a la acción osmótica y además existía sinergismo con la radiación UVB. Sin embargo, en esta cianobacteria que tolera concentraciones salinas próximas al 70% del agua de mar normal, los MAAs representaban menos del 5% del total intracelular de osmolitos, por lo tanto, su papel fisiológico en este caso no era el de regulación osmótica (Shick y Dunlap, 2002).
- Pigmento accesorio fotosintético. La fluorescencia de los MAAs a 430-450 nm permitiría que la clorofila del sistema fotosintético pudiese aprovechar la energía de la luz absorbida en la región del UV (Price y Forrest, 1969; Sivalingam *et al.* 1976a,b; Maragos, 1972; Logan *et al.*, 1990). Sin embargo, en un estudio reciente se ha demostrado que los MAAs (principalmente shinorine) en la microalga *Phaeocystis antartica* no transferían la energía de la RUV (directamente o por fluorescencia) a la clorofila *a*, y por lo tanto, no participaban en la fotosíntesis. Esta conclusión la dedujeron debido a que en la región del

UV el rendimiento de fluorescencia relativo de la clorofila *a* es muy inferior a aquel en la región visible (Moisan y Mitchell, 2001).

- Precusores de algunos pigmentos (Price y Forrest, 1969; Shibata, 1969). Estos autores apuntaron hacia esta posibilidad, pero no existen trabajos posteriores en los que se investigue esta función.
- Papel en la reproducción de diversos organismos, se llegó a esta conclusión en diversos trabajos debido a que se alcanzaba la máxima concentración de MAAs en los huevos alrededor del periodo de desove (Grant *et al.*, 1985; Post y Larkum, 1993; Adams y Shick, 1996; Bandaranayake *et al.*, 1996 y 1997; Bandaranayake y Rocher, 1999). Sin embargo, esta sincronización no tiene por qué significar que los MAAs están regulando la reproducción, simplemente se puede afirmar que se puede emplear la concentración de MAAs como un indicador de la maduración de los ovarios. Quedaría por demostrar si los factores medioambientales y fisiológicos que regulan el desarrollo de los ovarios también controlan el secuestro y el metabolismo de los MAAs (Shick y Dunlap, 2002).

1.1.4.1. Papel fotoprotector de los MAAs.

Deben cumplirse varios requisitos para considerar que una molécula tiene un papel fotoprotector:

- El más importante de ellos, son los beneficios que la molécula debe brindar al organismo, mejor adaptación de los organismos a la RUV cuando posean estas moléculas (en términos de crecimiento, supervivencia...).
- La molécula debe proteger al organismo de manera pasiva, de modo que exista una correlación entre la concentración de la molécula y la resistencia a la RUV, incluso bajo condiciones de inactividad fisiológica, donde otros mecanismos activos de fotoprotección no estén funcionales.
- Además los beneficios que brindan las moléculas deben ser máximos en aquellas longitudes de onda donde dichas moléculas tengan la máxima absorción.

La presencia de MAAs en gran parte de los organismos marinos sugiere que debido a que la vida se originó bajo condiciones de ausencia de ozono y por tanto, bajo intensidades más altas de radiación UVB, la protección frente a la exposición a la RUV debería haber sido un importante carácter en la evolución de los primeros eucariotas y, por lo tanto, en el proceso de selección natural. Se puede corroborar con el hecho de que las rutas de síntesis de MAAs son

muy similares en hongos y cianobacterias. Sin embargo, no hay evidencias del origen filogenético de los MAAs ni de los patrones de distribución en los distintos grupos taxonómicos. Por otro lado, la gran cantidad de datos existentes donde se apunta a una relación entre el contenido interno de MAAs y la cantidad de RUV recibida ya sea por distinta localización batimétrica o latitudinal, parecen estar en consonancia con un papel fotoprotector. Sin embargo, no existen demasiadas evidencias experimentales que lo demuestren y en general, se ha concluido que la síntesis de MAAs protege parcialmente a los componentes celulares y a los procesos fisiológicos (Wood, 1989; Post y Larkum, 1993; García-Pichel *et al.*, 1993; Lesser, 1996; Neale *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2000; Yakovleva y Titlyanov, 2001).

García-Pichel (1994,1996) basándose en modelos ópticos calculó la eficacia de fotoprotección relativa de los MAAs en células de fitoplancton, asumiendo que los MAAs se distribuían de manera homogénea en la célula. Llegó a la conclusión de que las células grandes esféricas con bajo autosombreado se beneficiarían más de la inversión en la síntesis de productos pantalla de luz. La vulnerabilidad de las células pequeñas frente a las de más tamaño se debe a que cuanto mayor sea el paso de luz más se pueden absorber los fotones antes de dañar los componentes celulares. Según estos resultados, las células de dinoflagelados estarían protegidas. En este sentido, Bracher y Wiencke (2000) determinaron que sólo en los blooms o en las grandes colonias de fitoplancton antártico los MAAs actuarían como protectores eficientes frente al UV. Por otro lado, si los OMAAs (MAAs glicosilados) presentes en *Nostoc commune* se podría afirmar se distribuyesen homogéneamente alrededor de la cubierta externa tendrían un factor de protección solar del 70% (Ehling-Schulz *et al.*, 1997).

Neale y colaboradores (1998) mostraron que la fotosíntesis del dinoflagelado *Gymnodinium sanguineum* estaba protegida al menos en un 80% de los daños del UV en las longitudes de onda mayormente absorbidas por los MAAs. Pero en el alga *Chondrus crispus* Franklin y colaboradores (1999) no llegaron a la conclusión de que los MAAs protegían a la fotosíntesis de manera completa, por ello estos autores plantearon que quizá esta diferencia se debía a que en *G. sanguineum* se inducía la síntesis de MAAs cuando se iban incrementando los niveles de radiación PAR sin UV, además de que en los tratamientos de *C. crispus* la RUV era extremadamente alta. Otra explicación a esta diferencia puede ser que en *C. crispus* había un cambio en la proporción de MAAs y por ello podría ser que los MAAs con máximos de absorción a longitudes de onda más bajas fuesen pantallas más efectivas que shinorine, que era el MAA mayoritario en los estadios primeros de aclimatación. En este mismo trabajo del alga roja *C. crispus* se decía que el contenido de MAAs no protegía frente a una reducción del crecimiento, esta reducción podía deberse a daños en otros procesos celulares y a pesar de la

síntesis rápida de los MAAs el pool presente no era suficiente para prevenirlo (Franklin *et al.*, 1999).

El contenido de MAAs en *Mastocarpus stellatus* era 6 veces mayor que en *C. crispus*, *M. stellatus* era más resistente a la RUV y por ello más competitivo. Los autores apuntaron a que esta mayor resistencia pudiera deberse a su mayor contenido en MAAs (Bischof *et al.*, 2000). La forma colonial de la Prymnesiofita antártica *Phaeocystis antarctica* acumulaba MAAs, y sin embargo, su crecimiento era sensible a la radiación UVB (Karentz y Spero, 1995). Además, algunas especies de diatomeas antárticas no acumulaban MAAs y sobrevivían mejor al UVB que *P. antarctica* (Davidson *et al.*, 1994).

En relación con el papel fotoprotector que podrían tener los MAAs en las cianobacterias hay autores que apuntaron a que los MAAs eran un importante mecanismo de protección frente al fotodaño producido por la RUV (Karentz *et al.*, 1991a,b; Ehling-Schulz *et al.*, 1997; Quesada *et al.*, 1999). Sin embargo, esta protección depende de las especies y de la localización de estos pigmentos en ellas. García-Pichel y Castenholz (1993) estimaron los factores de protección de los MAAs en células de varias cianobacterias, la presencia de MAAs protegía entre un 10 y un 30% frente a los efectos dañinos de la RUV, cuando estos pigmentos se localizaban en el citoplasma. Pero la capacidad de apantallar la radiación se incrementaba en comunidades o colonias de cianobacterias (Castenholz, 1997). El factor de protección solar de los MAAs para la cianobacteria *Gloeocapsa* sp. fue de un 30% a 326nm, por lo que se concluyó que la aclimatación a la RUV no era debida únicamente a la presencia de MAAs. Además bajo condiciones de desecación, donde los mecanismos fisiológicos de fotoprotección y de reparación no estaban operativos, las células con alto contenido en MAAs únicamente tenían un 20-25% de resistencia (García-Pichel *et al.*, 1993).

En animales también se ha sugerido cierta capacidad de fotoprotección. Shick y colaboradores (1994) mediante el uso de la resonancia paramagnética electrónica presentaron evidencias experimentales sobre la protección que brindaban los MAAs frente al estrés oxidativo provocado por la RUV en ovarios de erizos marinos. Adams y Shick (1996) demostraron que los MAAs protegían de la RUV a los huevos de erizos marinos de la especie *Strongylocentrotus droebachiensis*. En *Holothuria atra* se observó que algunos MAAs tenían papel fotoprotector y otros, papel en la reproducción, los imino-MAAs se acumulaban en la epidermis (fotoprotector) y estos eran transformados en el tracto digestivo a mycosporine-gly, que se acumulaba temporalmente en las vísceras para ser transferidas posteriormente a los órganos reproductores (Bandaranayake y Rocher, 1999). La concentración de MAAs era alta en los huevos de *Aplysia dactylomela*, seguido de la piel y era baja en las glándulas digestivas.

Concluyeron que debía existir un mecanismo de transporte de los MAAs desde la dieta mediante el que se ejercía el papel fotoprotector de los MAAs (Carefoot *et al.*, 2000).

Dionisio-Sese y colaboradores (1997) demostraron que la presencia de MAAs en la superficie de la túnica, que es transparente a la luz visible fotosintética, de una ascidia colonial protegía a sus simbioses fotoautótrofos del fotodaño producido por la RUV. Además, Ishikura y colaboradores (1997) en un trabajo similar al anterior estudiaron el efecto de la RUV en la fotosíntesis de zooxantelas que vivían dentro de cubiertas sifonales de la almeja gigante *Tridacna crocea*, en estas cubiertas había alta concentración de MAAs que protegía a la zooxantela de la RUV. En este trabajo se concluyó que los MAAs eran capaces de absorber el 87% de la radiación de 310 nm y un 90% la de 320 nm antes de que esta radiación alcanzara una profundidad de 0.2 mm en el manto sifonal (Ishikura *et al.*, 1997). En corales Dunlap y Shick (1998) sugirieron que el contenido de MAAs era la primera línea de defensa frente a la RUV de sus algas endosimbiontes. Sin embargo, Kinzie (1993) determinó que la fotosíntesis bruta en el coral Hawaiano *Montipora verrucosa* decrecía después de una aclimatación a la RUV bajo fotoperiodos largos a pesar de que se producía un incremento en la concentración de MAAs.

A pesar de la variedad de resultados a partir de los que, en algunos casos, se deduce un papel fotoprotector de los MAAs, hay que tener en cuenta que un protector solar debe ser eficiente no sólo absorbiendo las longitudes de onda de la RUV, sino también disipando la energía absorbida, sin que se transfiera a biomoléculas sensibles y sin que provoque estrés fotooxidativo debido a la formación de radicales de oxígeno. Por lo tanto, las funciones de pantalla solar y antioxidante para la protección frente a la RUV, están entrelazadas. Sólo hay dos publicaciones que tratan de las características fotofísicas para la disipación de la energía de la RUV por parte de los MAAs, y ambas examinan las propiedades del estado excitado y la fotoestabilidad de imino-mycosporines de macroalgas *in vitro*. Shick y colaboradores (2000) estudiaron shinorine (17 μM) en este contexto, y concluyeron que al no formarse radicales libres cuando se irradiaba con RUV y debido a que no se detectaba fluorescencia cuando se excitaba en un rango de longitudes de onda alrededor de su máximo de absorción, se podía considerar que esta molécula era muy eficiente disipando térmicamente la energía de la RUV absorbida. Conde y colaboradores (2000) estudiaron la porphyra-334 (6 μM) y concluyeron que los bajos rendimientos cuánticos de fluorescencia, los cruces intersistemas y la ausencia de productos de la fotólisis de la molécula estaban de acuerdo con el papel fotoprotector en sistemas vivos (Conde *et al.*, 2000). Todo ello, unido a la alta fotoestabilidad *in vitro* (Conde *et al.*, 2000) e *in vivo* (Adams y Shick, 2001) son atributos de un agente protector de la RUV efectivo.

El estudio del papel fotoprotector en macroalgas marinas sería mucho más sencillo si se supiese a ciencia cierta la localización de los MAAs y la penetrabilidad de la RUV en los talos algales. Sólo hay un trabajo en el que se hable de la posible localización de los MAAs en los cloroplastos de macroalgas (Yoshida y Silvalingam, 1970), aunque en general, se asume una localización citoplasmática (García-Pichel y Castenholz, 1993), y ninguno en relación a la penetrabilidad de la radiación UVB en un talo de un alga multicelular.

2. Acumulación de MAAs y disponibilidad de nitrógeno inorgánico.

Las principales fuentes de nitrógeno para macroalgas son el nitrógeno inorgánico disuelto (en forma de nitrato y amonio) y el nitrógeno orgánico disuelto (urea, aminoácidos). El amonio, es generalmente, la fuente preferente (Ullrich, 1983). La incorporación de nitrógeno está influenciada por la cantidad de luz disponible, la temperatura, el movimiento del agua, el nivel de desecación y la forma iónica del elemento. Los factores biológicos que influyen en la incorporación del nitrógeno son, el tipo de tejido, la edad de la planta, su historia nutricional y la variabilidad entre individuos. El nitrato se reduce intracelularmente a amonio por la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa. A continuación, el amonio es incorporado a los aminoácidos por dos vías principalmente. La vía de la glutamina sintetasa, en la que la glutamina es el primer producto. Y la segunda vía, de menor importancia, es la de la glutamato dehidrogenasa que resulta en la formación de ácido glutámico.

La incorporación de nitrógeno es más rápida en el alga cuando los talos han crecido en condiciones de limitación de nitrógeno, se observó en los talos de *C. elongata* (López-Figueroa, 1993). El nitrato y el amonio incorporados además de emplearse para sintetizar aminoácidos y proteínas, se pueden almacenar en el citoplasma o en las vacuolas. Además el nitrógeno asimilado puede ser transferido a otros tejidos y bajo condiciones favorables, la incorporación del nitrógeno del medio externo, suele exceder las necesidades de crecimiento y tiende a acumularse en forma de biomasa. Durante la asimilación de amonio se produce una movilización de C desde estructuras de reserva (Vergara, 1993), además este proceso de movilización es dependiente de la irradiancia, puesto que depende de la cantidad de C reducido fotosintéticamente.

La disponibilidad de nitrógeno afecta a gran cantidad de procesos bioquímicos, como pueden ser mecanismos de defensa y de reparación de los efectos causados por la RUV. Sin embargo, no se conocen con profundidad las consecuencias de la limitación de nitrógeno en los efectos que la RUV induce en la producción primaria, en general, se afirma que puede incrementar la susceptibilidad hacia el daño producido por la RUV debido a que puede afectar

de manera negativa a los procesos de defensa, como por ejemplo, aquellos en los que intervienen enzimas o cofactores proteicos que necesitan del nitrógeno para su síntesis (Roy, 2000); también enzimas que participan en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno cuya presencia se induce por la RUV (Lesser y Shick, 1989); Además, la limitación de nitrógeno puede influir en la reducción del tamaño celular (Doucette y Harrison, 1990) y por lo tanto, se disminuye el paso para la atenuación de la RUV (García-Pichel, 1994).

Sí está ampliamente estudiado que la limitación de nitrógeno afecta a la fotosíntesis. Se ha descrito que, independientemente de la irradiancia del cultivo, el fitoplancton presentaban mayores rendimientos cuánticos óptimos en presencia de nitrógeno que en ausencia de este nutriente (Parkhill *et al.*, 2001). La reducción del rendimiento cuántico óptimo la relacionaron con la pérdida de la proteína D1 (Geider *et al.*, 1993). La fotosíntesis máxima caía en términos de área en algas crecidas en alta irradiancia, pero sólo en aquellas que tenían limitación de nitrógeno (Pérez-Lloréns *et al.*, 1996). En un trabajo de 1994 se determinó que la fotosíntesis se inhibía en mayor medida por la RUV en diatomeas crecidas en limitación de nitrógeno que en aquellas crecidas con suficiente cantidad de este elemento, en las primeras se observaba que el balance entre procesos de daño y reparación se rompía a favor del daño aunque no se conoce el mecanismo que influye en este balance (Lesser *et al.*, 1994).

El nitrógeno inorgánico también influye en el contenido proteico. En diferentes algas se observó una reducción de proteínas solubles, como la Rubisco en condiciones de bajo nitrógeno (Beardall *et al.*, 1991; Wulff *et al.*, 2000). La deficiencia en nitrógeno reducía temporalmente la síntesis de Rubisco y/o la reparación del PSII, resultando en una caída de la fotosíntesis máxima y de la tasa de crecimiento en *Ulva rotundata* (Henley *et al.*, 1991b). De hecho, se ha descrito en *Laminaria japonica* que la primera fase de limitación de nitrógeno se caracteriza porque el contenido de nitrógeno soluble es suficiente para la demanda metabólica, sin embargo, la última fase de limitación aguda se caracteriza por una disminución gradual del contenido de nitrógeno inorgánico (Mizuta *et al.*, 1994). Se degradan preferentemente las proteínas del cloroplasto frente a las proteínas mitocondriales en limitación de nitrógeno en *Euglena*, de manera que proporcionan los aminoácidos necesarios en el estrés nutricional o para que continúe la división celular (Coleman *et al.*, 1988). En *C. elongata* y *G. lemaneiformis*, las proteínas solubles no pigmentadas (calculadas como la diferencia entre las proteínas solubles y las ficobiliproteínas) se veían menos afectadas por la limitación de nitrógeno y además cuando se suplementa el medio con nitrógeno inorgánico, se producía la estimulación preferencial de las ficobiliproteínas (Vergara y Niell, 1993; Vergara *et al.*, 1995). Quizá durante la limitación de nitrógeno, los ARN_t del citosol estén uniendo los aminoácidos antes de que estos se transporten al cloroplasto, por ello la síntesis de proteínas del citosol estarían menos afectadas

por la limitación de nitrógeno (Vergara *et al.*, 1995). Las proteínas solubles pigmentadas (ficobiliproteínas) también disminuían en limitación de nitrógeno (Talarico y Maranzana, 2000) y se incrementaban rápidamente cuando se añadía al cultivo grandes cantidades de este nutriente (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993). Se ha descrito que cuando los organismos están exentos de algún nutriente esencial, los ficobilisomas son específicamente degradados (Aráoz y Häder, 1997). La FE en el ficobilisoma presenta una gran plasticidad, pudiendo desacoplarse de éste bajo diversas condiciones fisiológicas (Algarra y Rüdiger, 1993), se refleja en *Gracilariopsis lemaneiformis*, en la que el contenido de FC se veía menos influenciado por la disponibilidad de nitrógeno que el de FE (Vergara *et al.*, 1995). El contenido interno de otro pigmento fotosintético, la clorofila *a*, se ve influenciado del mismo modo por la disponibilidad de nitrógeno en el cultivo (López-Figueroa y Niell, 1991; Costanzo *et al.*, 2000).

Los MAAs, son otros de los compuestos que poseen en su estructura química nitrógeno (figura 1). Como se ha descrito la influencia de este elemento en otros muchos compuestos nitrogenados, tal y como se refleja en párrafos anteriores, nos proponemos estudiar la regulación de la síntesis de los MAAs por este nutriente. Únicamente existe un trabajo en el que se analiza la síntesis y acumulación de MAAs ante distintas condiciones nutricionales en dinoflagelados, se observó que la concentración de MAAs era inferior cuando en el medio de cultivo había menos nitrógeno (concretamente nitrato) y que la limitación de nitrógeno incrementaba la sensibilidad de la fotosíntesis en toda la banda de RUV, el incremento de sensibilidad fuera de la región de absorción de los MAAs lo asociaron a una disminución del tamaño celular y a una menor actividad de los mecanismos de reparación (Litchman *et al.*, 2002).

Se resumen en el siguiente diagrama los aspectos básicos sobre los que se desarrolla la experimentación de esta memoria de Tesis Doctoral (figura 2).

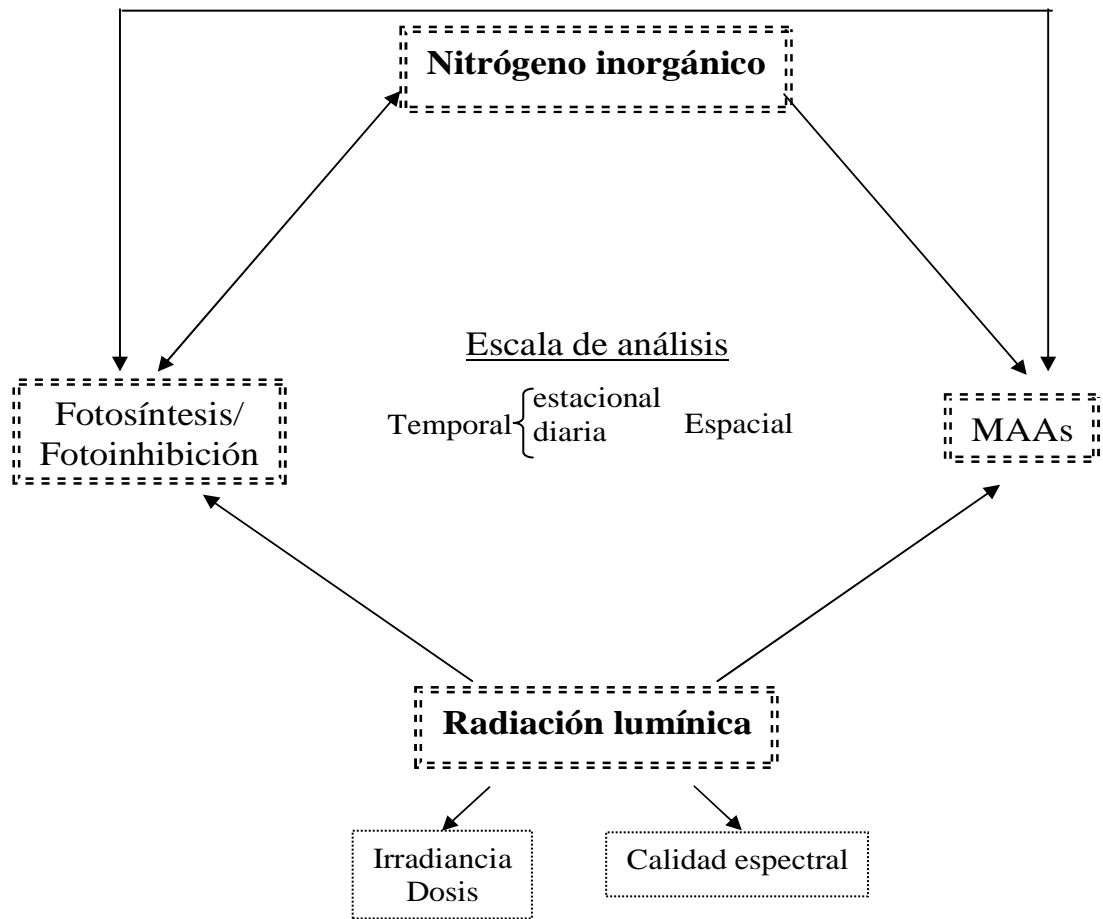


Figura 2. Diagrama representativo de los aspectos que se tratarán en esta memoria.

OBJETIVOS

Puesto que existe gran controversia en torno a la inducción de la síntesis de aminoácidos tipo micoporina (MAAs) por las distintas bandas de radiación lumínica y a su potencial papel fotoprotector. Y ya que no se conoce en profundidad cómo se ven afectadas estas moléculas por la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo, se analizará el efecto de estos dos factores ambientales en la acumulación de MAAs, y la influencia de los mismos en la capacidad de fotoprotección de macroalgas frente a exposiciones a distintas dosis de RUV y PAR.

Dentro de este marco, los objetivos específicos de este trabajo son:

1. Poner a punto las técnicas de extracción y cuantificación de MAAs. Caracterizar los MAAs: su estabilidad frente a cambios de pH y temperatura, la fluorescencia de porphyra-334 (capítulo I).
2. Investigar mediante un análisis preliminar la ruta biosintética de estas moléculas en *Porphyra umbilicalis* (capítulo I).
3. Describir la distribución de los MAAs en los diversos grupos taxonómicos de macroalgas marinas, analizar la relación entre la acumulación de los diversos tipos de MAAs con la zonación, la época del año y la latitud de recolección (capítulo II).
4. Determinar el efecto a corto plazo de la RUV y PAR en la acumulación de MAAs y en el metabolismo fotosintético en dos especies del género *Porphyra* (capítulo III).
5. Estudiar el efecto de la irradiancia PAR y RUV, y de la calidad lumínica a largo plazo en la acumulación de MAAs y en el metabolismo fotosintético en el alga roja *Porphyra leucosticta* (capítulo IV).
6. Analizar el efecto combinado de la RUV y de la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la acumulación de MAAs y en el metabolismo fotosintético en tres especies del género *Porphyra* recolectadas en distintas latitudes (capítulo V).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales y métodos empleados en la parte experimental de esta Tesis Doctoral se abordan de forma conjunta en este apartado. En algunos casos se proponen varias opciones; en los siguientes capítulos se especificará cuál de ellas se empleó para cada experimento.

M.1. Material biológico (Tablas M.1, M.2, M.3).

Tabla M.1. Relación de especies de algas rojas analizadas, lugares y fechas de recolección.

**Caulacanthus ustulatus* (Mertens) Kützing (J. Feldmann *et* G. Feldmann) Augier *et* Boudouresque (Augier y Boudouresque, 1971).

Algas rojas	Lugar recolección	Fecha
<i>Amphiroa rigida</i> Lamouroux	Giglio (Italia)	Abril 98
<i>Antithamnion simile</i> (Hooker <i>et</i> Harvey) Agardh	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Asparagopsis</i> sp.	Albufeira (Portugal)	Junio 02
<i>Asparagopsis armata</i> Harvey	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99 Mayo 00 Octubre 01
<i>Asparagopsis taxiformis</i> (Delile) Trevisan de Saint-León	Gran Canaria	Septbre 99 Febrero 01 Octubre 01
<i>Bangia atropurpurea</i> (Roth) C. Agardh	Lagos (Málaga)	Novbre 00/ Abril 01
<i>Bostrychia</i> sp.	Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Bostrychia scorpioides</i> (Hudson) Montagne	Palmones (Algeciras)	Septbre 99
<i>Callithamnion gaudichaudii</i> C. Agardh	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Callophillis variegata</i> (Bory) Kützing	Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Caulacanthus</i> sp.	Lagos (Málaga)	Novbre 00/ Abril 01
	Albufeira (Portugal)	Junio 02
<i>Ceramium</i> sp.	Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Ceramium nodulosum</i> (Lightfoot) Ducluzeau	Helgoland (Alemania)	Julio 99
	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Ceramium strictum</i> Harvey	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Chondracantus</i> sp.	Chiloé (Chile)	Novbre 99
	Cabo de Gata (Almería)	Octubre 00
<i>Chondrus crispus</i> Stackhouse	Helgoland (Alemania)	Junio 98
<i>Corallina</i> sp.	Albufeira (Portugal)	Junio 02
	Lagos (Málaga)	Novbre 00/ Abril 01
<i>Corallina elongata</i> J. Ellis <i>et</i> Solander	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99 Mayo 01 Octubre 01
	Gran Canaria	Febrero 01
	Cabo de Gata (Almería)	Octubre 00 Junio 01
<i>Corallina officinalis</i> Linnaeus	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Cystoclonium purpureum</i> (Hudson) Batters	Helgoland (Alemania)	Junio 98
<i>Dumontia incrassata</i> (O. F. Müller) Lamouroux	Helgoland (Alemania)	Junio 98
<i>Feldmannophycus</i> sp.	Isla de las Palomas (Tarifa)	Mayo 00 Octubre 01
<i>Feldmannophycus rayssiae</i> J. Feldmann <i>et</i> G. Feldmann*	Gran Canaria	Febrero 01

<i>Gelidiella</i> sp.	Albufeira (Portugal)	Junio 02
<i>Gelidiella nigrescens</i> (J. Feldmann) J. Feldmann <i>et</i> Hamel	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
<i>Gelidium arbuscula</i> Bory de Saint-Vicent <i>ex</i> Børgesen	Gran Canaria	Febrero 01
<i>Gelidium canariense</i> (Grunow) Seoane-Camba <i>ex</i> Haroun, Gil-Rodríguez, Díaz de Castro <i>et</i> Prud'homme van Reine	Gran Canaria	Septbre 99 Febrero 01
<i>Gelidium latifolium</i> (Greville) Bornet <i>et</i> Thuret	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99 Mayo 00 Octubre 01 Febrero 01
<i>Gelidium pusillum</i> (Stackhouse) Le Jolis	Porto (Portugal) Isla de las Palomas (Tarifa)	Septbre 98 Ver Cap. II
<i>Gelidium sesquipedale</i> (Clemente) Thuret in Bornet <i>et</i> Thuret	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99 Mayo 00 Octubre 01 Junio 02
<i>Gigartina</i> sp.	Albufeira (Portugal) Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Gracilaria</i> sp.	Gran Canaria	Febrero 01 Octubre 01 Mayo 00
<i>Gracilaria chilensis</i> Bird, McLachlan <i>et</i> Oliveira	Isla de las Palomas (Tarifa) Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Gracilaria gracilis</i> (Stackhouse) Steentoft, Irvine <i>et</i> Farnham	Cádiz	Febrero 01
<i>Grateloupia dichotoma</i> J. Agardh	Gran Canaria	Octubre 01
<i>Grateloupia doryphora</i> (Montagne) M. Howe	Gran Canaria (cultivo)	Marzo 03
<i>Grateloupia lanceolata</i> Okamura (Kawaguichi)	Gran Canaria (cultivo)	Marzo 03
<i>Grateloupia lanceolata</i> Okamura (Kawaguichi)	Guadalmar (Málaga)	Mayo 02
<i>Grateloupia turuturu</i> Yamada	Brest (Francia)	Abril 03
<i>Gymnogongrus devoniensis</i> (Greville) Schotter	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99 Mayo 00 Octubre 01
<i>Gymnogongrus furcelatus</i> (C. Agardh) J. Agardh	Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Heterosiphonia merenia</i> Falkenberg	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Jania rubens</i> (Linnaeus) Lamouroux	Gran Canaria	Septbre 99 Febrero 01 Mayo 00 Octubre 00 Junio 01 Novbre 01 Junio 02
<i>Laurencia</i> sp.	Isla de las Palomas (Tarifa) Cabo de Gata (Almería)	Septbre 99 Febrero 01 Octubre 01
<i>Laurencia obtusa</i> (Hudson) Lamouroux	Camarones (Argentina) Albufeira (Portugal)	Novbre 01 Junio 02
<i>Laurencia pinnatifida</i> (Hudson) Lamouroux	Gran Canaria	Septbre 99 Febrero 01 Octubre 01
<i>Laurencia pinnatifida</i> (Hudson) Lamouroux	Cabo de Gata (Almería)	Octubre 00 Junio 01
<i>Laurencia pinnatifida</i> (Hudson) Lamouroux	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99 Mayo 00 Octubre 01
<i>Lithophyllum</i> sp.	Albufeira (Portugal)	Junio 02
<i>Lithophyllum expansum</i> Philippi	Giglio (Italia) Isla de las Palomas (Tarifa)	Abril 98 Mayo 00
<i>Lomentaria clavellosa</i> (Turner) Gaillon	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Mastocarpus stellatus</i> (Stackhouse) Guiry	Helgoland (Alemania)	Junio 98
<i>Mazzaella laminarioides</i> (Bory) Fredericq	Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Myriogramme multinervis</i> (J. D. Hooker <i>et</i> Harvey) Kylin	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Myriogramme smithii</i> (J. D. Hooker <i>et</i> Harvey) Kylin	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Palmaria palmata</i> (Linnaeus) O. Kuntze	Playa Estaño (Oviedo)	Novbre 99
<i>Peyssonnelia</i> sp.	Cabo de Gata (Almería)	Octubre 00 Junio 01

<i>Plocamium cartilagineum</i> (Linnaeus) Dixon	Isla de las Palomas (Tarifa)	Mayo 00
	Cabo de Gata (Almería)	Octubre 00
	Albufeira (Portugal)	Junio 02
<i>Polysiphonia</i> sp.	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Polysiphonia lanosa</i> (Linnaeus) Tandy	Plymouth (Inglaterra)	Marzo 99
<i>Polysiphonia stricta</i> (Dillwyn) Greville	Sylt (Alemania)	Septbre 98
<i>Porphyra columbina</i> Montagne	Chiloé (Chile)	Novbre 99
	Camarones (Argentina)	Novbre 01
<i>Porphyra leucosticta</i> Thuret in Le Jolis	Lagos (Málaga)	Novbre 00/ Abril 01
<i>Porphyra purpurea</i> (Roth) J. Agardh	Throteim (Noruega)	Julio 99
<i>Porphyra umbilicalis</i> (Linnaeus) J. Agardh	Sylt (Alemania)	Septbre 98
	Helgoland (Alemania)	Octubre 02
<i>Porphyra yezoensis</i> Ueda	Kobe (Japón)	Novbre 98
<i>Pterocladia capillacea</i> (Gmelin) Bornet <i>ex</i> Bornet <i>et</i> Thuret	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
	Cabo de Gata (Almería)	Octubre 00
		Junio 01
	Gran Canaria	Septbre 99
		Febrero 01
	Albufeira (Portugal)	Junio 02
<i>Rissoella verruculosa</i> (Bertoloni) J. Agardh	Lagos (Málaga)	Febrero 01
<i>Streblocladia corymbifera</i> (C. Agardh) Kylin	Camarones (Argentina)	Novbre 01

Tabla M.2. Relación de especies de algas pardas analizadas, lugares y fechas de recolección.

Algas pardas	Lugar recolección	Fecha
<i>Colpomenia sinuosa</i> (Mertens <i>ex</i> Roth) Derbés <i>et</i> Solier	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
<i>Cystoseira tamariscifolia</i> (Hudson) Papenfuss	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
<i>Dictyopteris polypodioides</i> (D. C.) Lamouroux	Gran Canaria	Septbre 99
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) Lamouroux	Gran Canaria	Septbre 99
<i>Halopteris scoparia</i> (Linnaeus) Sauvageau	Gran Canaria	Septbre 99
<i>Lobophora variegata</i> (Lamouroux) Womersley <i>ex</i> Oliveira	Gran Canaria	Febrero 01

Tabla M.3. Relación de especies de algas verdes analizadas, lugares y fechas de recolección.

Algas verdess	Lugar recolección	Fecha
<i>Caulerpa</i> sp.	Gran Canaria	Septbre 99
<i>Chaetomorpha aerea</i> (Dillwyn) Kützing	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
<i>Codium adhaerens</i> C. Agardh	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
	Chiloé (Chile)	Novbre 99
<i>Cymopolia barbata</i> (Linnaeus) Lamouroux	Gran Canaria	Septbre 99
<i>Dasycladus vermicularis</i> (Scopoli) Krasser	Cabo Gata (Almería)	Agosto 99
	Gran Canaria	Septbre 99
<i>Enteromorpha</i> sp.	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
	Gran Canaria	Febrero 01
<i>Ulva</i> sp.	Isla de las Palomas (Tarifa)	Julio 99
	Rawson (Argentina)	Novbre 01

Género *Porphyra*.

Se eligió el género *Porphyra* en los capítulos III, IV y V de este trabajo de investigación en primer lugar, debido al amplio conocimiento de esta especie que posee nuestro grupo de investigación, concretamente de los procesos y pigmentos fotosintéticos (López-Figueroa, 1987; López-Figueroa y Niell, 1989,1990, 1991; Mercado *et al.*, 1997, 1999), de los factores ambientales que implican la aparición de la fase macroscópica (Hernández *et al.*, 1993b; Flores-Moya *et al.*, 1997) y del efecto de la luz en procesos fotosintéticos y la actividad de ciertas enzimas (Figueroa *et al.*, 1995a y b; Figueroa, 1996; Mercado *et al.*, 1996; Aguilera *et al.*, 2000). En segundo lugar, la morfología (alga plana monoestromática) y composición pigmentaria, hacen de esta especie un modelo para estudios fotobiológicos. Además, al crecer en la parte litoral superior, expuesta a condiciones extremas de luz y de desecación, es de esperar que posea mecanismos de aclimatación y fotoprotección de gran interés ecofisiológico. Por último, el interés económico del género *Porphyra* quedó ya plasmado desde el siglo XVII en países del extremo oriente como Japón, China y Corea (Oohusa, 1993). Actualmente dicho interés va en aumento en la industria alimentaria por su alto contenido proteico (25% del peso seco), y por las grandes cantidades de vitamina B y C que posee. También tiene importancia desde el punto de vista médico, ya que se ha postulado que puede emplearse como antibiótico, para reducir el colesterol en sangre y para prevenir y curar el escorbuto; quizá también se pueda emplear *Porphyra* para el tratamiento de úlceras y cánceres de estómago (<http://biology.ucsc.edu/classes/bio170/spring99/porphyra/econom.html>). A todo ello hay que añadir su facilidad de cultivo y su alta tasa de crecimiento. Ya desde el 1600 se cultivaba *Porphyra* en Japón, pero no sólo se colecta esta especie en Japón, sino que también en Gran Bretaña, Canadá, China y el estado de Maine emplean esta especie para el consumo humano y con fines industriales.

Taxonómicamente esta especie se encuentra dentro del Phylum Rhodophyta, Clase Bangiophyceae, Orden Bangiales, Familia Bangiaceae, Género *Porphyra*; palabra que procede del griego y significa tinte púrpura.

La diferenciación de las especies dentro de este género se ha realizado durante mucho tiempo únicamente basándose en diferentes caracteres morfológicos, lo que ha provocado discrepancias y confusiones constantes en cuanto a la determinación de las mismas. Actualmente el uso de técnicas genéticas y bioquímicas ha facilitado la labor, e incluso existe la posibilidad de discriminar morfotipos o de evidenciar la evolución de los caracteres en el género (Lindstron y Cole, 1992a,b, 1993).

En el ciclo de vida del género *Porphyra* se puede distinguir reproducción sexual y asexual. El ciclo sexual es heteromórfico con alternancia de generaciones: una fase macroscópica (talo

laminar) haploide y una fase microscópica (filamentosa) diploide denominada conchocelis (Drew, 1949).

Cuando llega el periodo estival, en el que se aumenta el número de horas del fotoperiodo y se incrementa la temperatura del agua, en la parte del talo haploide correspondiente a células masculinas, se produce la formación de espermatangios, que posteriormente van a liberar espermátidas. Éstas van a fertilizar a los carpogonios, situados en la zona femenina del talo, estas células se dividen y forman eventualmente carposporas diploides dentro de los carposporofitos, las cuales desarrollan un tubo germinal, que posteriormente constituye la fase filamentosa (esporofito) o conchocelis (figura M.1.A). Esta fase posee crecimiento apical, elongación parietal de los cloroplastos y conexiones con las células adyacentes, los filamentos pueden refugiarse durante años dentro de las conchas de moluscos y percebes, y por lo tanto, este proceso le permite al alga vivir de unas estaciones a otras.

La fase conchocelis puede dar lugar a monosporas diploides que derivan en más individuos de tipo filamentoso y también puede producir conchosporangios mediante meiosis, algunas especies requieren fotoperiodos cortos como *P. tenera* para la producción de conchosporangios, y otras como *P. torta* no. En los conchosporangios se produce la diferenciación de las células fértiles o conchosporas, las cuales son liberadas en condiciones de fotoperiodo corto cuando bajan las temperaturas (Dixon y Richardson, 1970). Se ha propuesto que la meiosis pueda ocurrir durante la germinación de la conchospora (Ma y Miura, 1984). La germinación de la conchospora, que crece dentro de esporas bipolares, da lugar a la fase macroscópica (gametofito) (figura M.1.B). El gametofito es un talo haploide, de morfología laminar, monostromático y de crecimiento difuso, dado que la división celular es totipotente.

Conforme se acerca el verano, mientras aumenta el fotoperiodo se puede producir una propagación de la fase vegetativa por aplanosporas, esporas asexuales que se dividen por mitosis y que germinan dando lugar al talo haploide (Magne, 1991; Kormann, 1994) (figura M.1.C). También podemos encontrar otro tipo de ciclo de vida en el que a partir de las células vegetativas de un talo haploide se producen monosporas haploides que se liberan y dan un nuevo organismo cuando germinan.

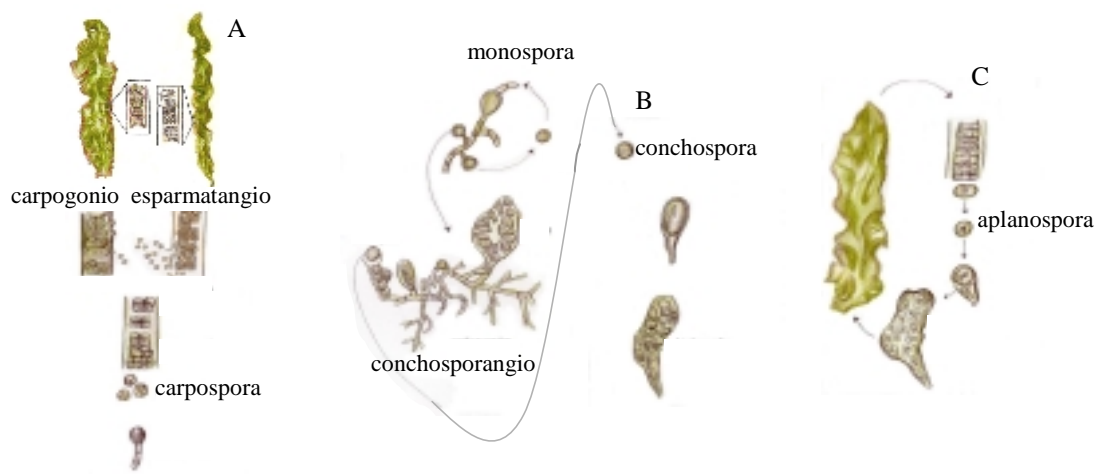


Figura M.1. Ciclo de vida de *Porphyra* sp. Fuente: adaptado de la página Web <http://www.biology.ucsc.edu/classes/bio170/spring99/porphyra/history.htm>.

M.2. Localidades de muestreo de las especies del género *Porphyra*.

M.2.1. Lagos (Málaga, España): *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis

Pequeña localidad de la provincia de Málaga, situada a 35 Km al Este de la capital y con coordenadas geográficas 36°28'N y 4°1'O. Entre los meses de Diciembre a Abril se desarrolla la fase macroscópica o gametofítica de *P. leucosticta* en su intermareal rocoso, concretamente en la zona supralitoral del intermareal, el máximo recubrimiento lo encontramos a mediados de Febrero (Karsten, 1999). La temperatura del agua de mar durante el periodo de desarrollo de la fase gametofítica varió entre 14 y 16° C aproximadamente, y las dosis de radiación solar se muestran en el capítulo II. La concentración de nitrato estuvo entre 4.2-16 μ M, la de nitrito fue inferior a 0.5 μ M y la de amonio entre 4-8 μ M (datos para el periodo 93-94; Aguilera, 1997). Existe estacionalidad en la disponibilidad de nutrientes para *P. leucosticta* en su medio natural, el crecimiento al principio del ciclo comienza sin limitación de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y termina con una limitación de fósforo a finales de abril (Flores-Moya *et al.*, 1997). Esta especie fue determinada en los primeros estudios que realizó este grupo de investigación como *P. umbilicalis*, pero con posterioridad, se realizaron nuevos análisis morfológicos a nivel celular y del talo y también estudios genéticos y enzimáticos y se concluyó que se trataba de la especie *P. leucosticta* (comunicación personal, I. Bartsch, Alemania). Actualmente se han realizado nuevos estudios y aunque todavía no está confirmado, parece que estamos ante una nueva especie de *Porphyra*, que si fuese así sería *Porphyra malacitana* (comunicación personal, I. Bartsch y J. Brodie). También se recolectaron del intermareal rocoso de Lagos (Málaga) ejemplares de *Bangia atropurpurea*, *Caulacanthus* sp. y *Corallina* sp.

M.2.2. Helgoland (Alemania): *Porphyra umbilicalis* (Linnaeus) Kützinger.

Isla del Mar del Norte situada a 60 Km de la Alemania continental con coordenadas geográficas 54°11'N 7°53'E. Es la zona de Alemania con más diversidad de fauna y flora marina. Posee más de 35 Km² de fondo rocoso. El litoral se caracteriza por estar formado por areniscas de un color rojizo, con ocasionales zonas arenosas y con gran cantidad de cubetas y canales (Munda y Markham, 1982). Los ejemplares de *P. umbilicalis* se recolectaron en el mes de Octubre de 2002 de la parte superior del intermareal rocoso, esta especie se caracteriza por estar presente en su forma macroscópica durante todo el año (Karsten, 1999). También se recolectó de las costas rocosas de la Isla de Helgoland, ejemplares de *Ceramium nodulosum*, *Chondrus crispus*, *Cystoclonium purpureum*, *Dumontia incrassata* y *Mastocarpus stellatus*.

La amplitud de marea es de 2.3 m en marea viva y la temperatura del agua de mar oscila entre 2° C en invierno y 18° C en verano (Janke, 1986). La zona litoral está en continuo cambio debido a los fuertes vientos que azotan la isla, capaces incluso de disgregar las rocas de los acantilados.

M.2.3. Barrancas Blancas (Playa Unión, Rawson, Chubut, Argentina): *Porphyra columbina* Montagne

Desde el otoño hasta la primavera australes se puede encontrar en el intermareal rocoso la fase macroscópica de *P. columbina*, concretamente desde los meses de abril-mayo hasta octubre-noviembre (comunicación personal, Graciela Casas). Se recolectó durante la bajamar en el intermareal rocoso de la playa de Barrancas Blancas en Playa Unión (Rawson). Las coordenadas geográficas de esta zona son 43°18'S 65°03'O. Los estudios se llevaron a cabo durante los meses de Octubre y Noviembre de 2001. La temperatura del agua de mar durante el periodo de estudio varió entre 14 y 17° C, la temperatura en la superficie de la roca rondó los 23-25° C. La irradiancia media para las horas centrales del día en estos meses fue de 1748 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para la banda PAR, y de 60 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ y 1.7 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ para la radiación UVA y UVB respectivamente. La playa de Barrancas Blancas se caracteriza porque durante la primavera existe una gran descarga de nutrientes, principalmente nitrógeno, en la desembocadura del río Chubut. Estos nutrientes proceden del lavado de fertilizantes añadidos en los terrenos próximos al cauce del río (Helbling, 1989).

M.3. Medidas de radiación solar y artificial.

Los datos de radiación solar se tomaron del radiómetro ELDONET (Real Time Computer, Erlangen, Alemania), siglas que corresponden a la denominación European Light DOSimeter NETwork. Se trata de un radiómetro de banda ancha que mide la radiación en tres bandas espectrales: UVB (280-315 nm), UVA (315-400 nm) y PAR (400-700 nm) (figura M.2.A).

La irradiancia espectral de las lámparas empleadas en los experimentos se obtuvieron a partir de un espectrorradiómetro Li-1800 UW (Li-Cor Radiation Sensors Inc., Lincoln, EE.UU.) dotado de un sensor plano (2π) colocado perpendicularmente a la fuente de luz. Se puede determinar la irradiancia en el rango espectral 300-850 nm con una precisión de ± 1 nm. Las unidades en las que se expresa la irradiancia espectral son $\mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{nm}^{-1}$ (figura M.2.C).

El radiómetro PUV510 (Biospherical Instrument Inc, San Diego, California) determina la RUV en cuatro bandas: 305 ± 1 nm (ancho de filtro de 7 ± 1 nm), 320 ± 2 nm (ancho de filtro de 11 ± 1 nm), 340 ± 2 nm (ancho de filtro de 10 ± 1 nm) y 380 ± 2 nm (ancho de filtro de 10 ± 1 nm). Los valores de UVA (320-400 nm) y UVB (280-320 nm) se estiman a partir de estos valores de irradiancia empleando las ecuaciones de Orce y Helbling (1997). La radiación PAR se determina por un sensor de banda ancha desde 400 a 700 nm (figura M.2.B). Este radiómetro se empleó para convertir la irradiancia instantánea de las lámparas en la banda PAR medida con los sensores detallados a continuación, gracias a una intercalibración de equipos.

La irradiancia instantánea de las lámparas se determinaron mediante distintos sensores planos Li-Cor Li-189 (M.2.D) y Gröbel (M.2.E), conectados a radiómetros de banda ancha Li-Cor LI-1000 y Gröbel (Gröbel UV-Elektronik, Ettlinger, Alemania) respectivamente, y mediante un sensor esférico Zemoko (Holanda) conectado al primero de los radiómetros enumerados anteriormente (figura M.2.F). El primero y tercero de ellos miden la banda de luz que va desde 400-700 nm (PAR), y el segundo según sea el sensor empleado de UVA (320-400 nm) o de UVB (280-320 nm). Los valores obtenidos de PAR se convirtieron a medidas del radiómetro PUV510 y los valores obtenidos de RUV se convirtieron a medidas del radiómetro ELDONET, en ambos casos se empleó unas ecuaciones de ajuste obtenidas mediante una intercalibración de equipos realizada empleando lámparas artificiales.

$$\begin{array}{l}
 0.93 \cdot E_{\text{Zemoko}} - 5.2 = E_{\text{PUV510}} \\
 1.26 \cdot E_{\text{Li-189}} - 2.94 = E_{\text{PUV510}}
 \end{array}
 \left. \vphantom{\begin{array}{l} 0.93 \cdot E_{\text{Zemoko}} - 5.2 = E_{\text{PUV510}} \\ 1.26 \cdot E_{\text{Li-189}} - 2.94 = E_{\text{PUV510}} \end{array}} \right\} \text{PAR}$$

$$E_{\text{ELDONET}} = 2 \cdot E_{\text{Gröbel}} \longrightarrow \text{UVA}$$

$$E_{\text{ELDONET}} = E_{\text{Gröbel}}/6 \longrightarrow \text{UVB}$$

Siendo E la irradiancia medida con cada uno de los instrumentos indicados en el subíndice.

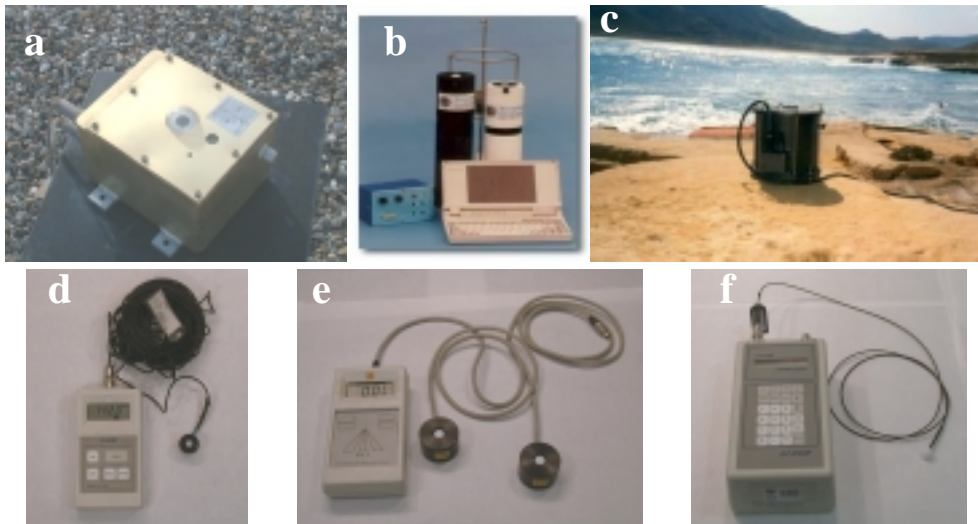


Figura M.2. ELDONET (A), PUV-510 (B), LI-1800 (C), LI-189 (D), Gröbel (E), Zemoko (F).

M.4. Fuentes de radiación artificial.

Las lámparas que emiten luz en la banda espectral de PAR empleadas en los distintos experimentos de laboratorio fueron: lámparas fluorescentes, Truelite 40W (Duro-Test, EE.UU.) y Osram-DL 20W (Alemania), y lámparas de halogenuros metálicos Optimarc 250W (Duro-Test, EE.UU.) cuyo espectro de emisión es más parecido al solar que el de las otras lámparas (figura M.3A,B).

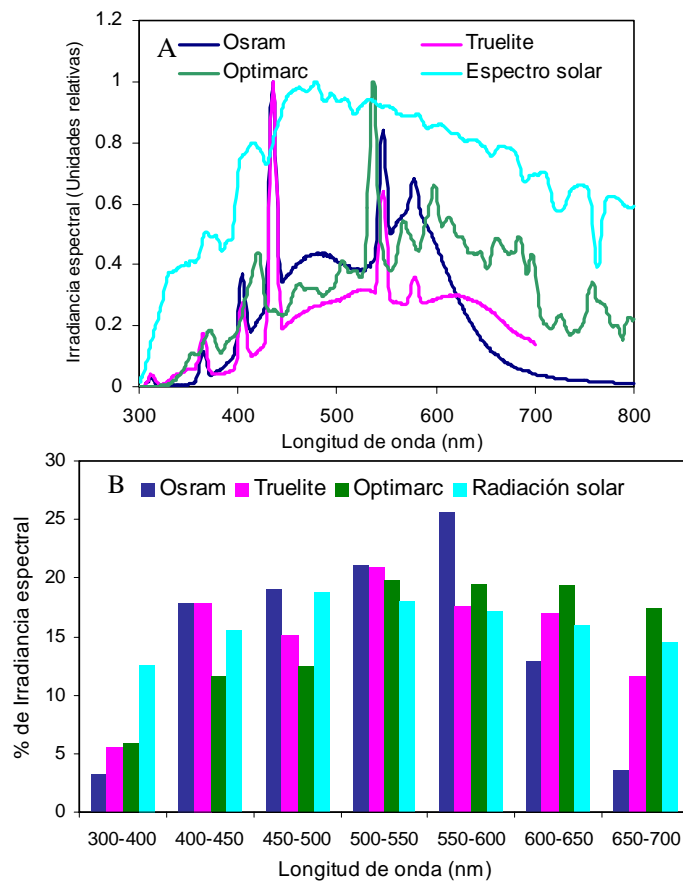


Figura M.3. (A) Espectros de emisión de luz de las lámparas de PAR y (B) Porcentaje de la irradiancia espectral para los anchos de banda señalados.

Las lámparas empleadas que emiten luz en la banda de UVA fueron las Q-Panel 340 (Q-Panel, EE. UU.) y aquellas que emiten en el UVB TL40W/12 (Philips, Holanda) (figura M.4).

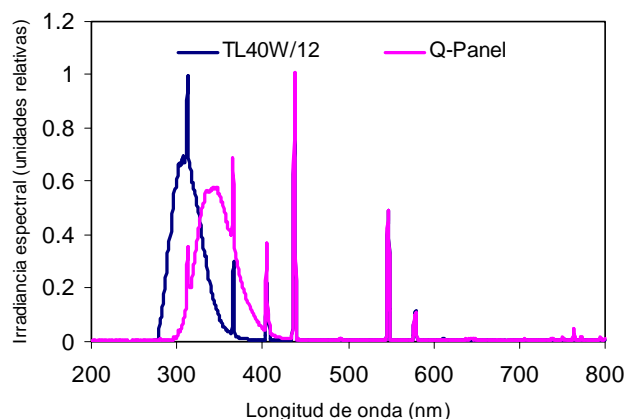


Figura M.4. Espectros de emisión de luz de las lámparas de RUV.

M.5. Dosis de radiación y espectros de acción.

La efectividad de un tipo de radiación en producir una respuesta biológica depende de su longitud de onda (Rundel, 1983). Así se puede expresar el efecto de un tipo de radiación, en un proceso biológico, mediante una función $\epsilon(\lambda)$. Esta función se normaliza asignándole el valor de 1 a la longitud de onda de mayor efectividad. A estas funciones se las conoce con el nombre de espectros de acción para una respuesta biológica, y son de gran utilidad para realizar estudios comparativos, ya que permite estandarizar medidas de radiación de distintas zonas geográficas o procedentes de distintas fuentes de radiación artificial.

Se han empleado en este trabajo los espectros de acción estimados para el daño en ADN (Setlow, 1974), para la inhibición de la fotosíntesis de cloroplastos aislados de espinaca (Jones y Kok, 1966) y el espectro de acción de la fotosíntesis de *Porphyra perforata* (Fork, 1963) (figura M.5.A.B).

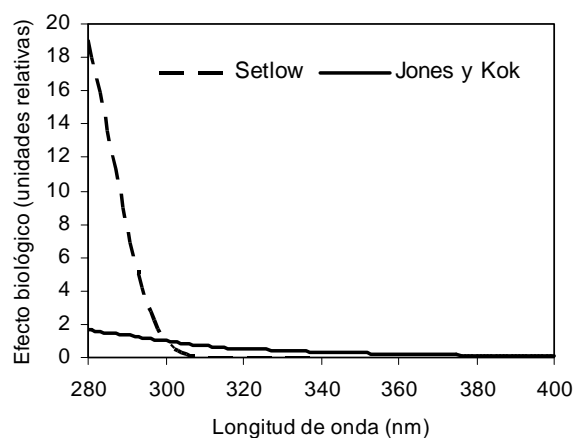


Figura M.5.A. Espectros de acción estimados para el daño en ADN (Setlow, 1974) y para la inhibición de la fotosíntesis de cloroplastos aislados de espinaca (Jones y Kok, 1966).

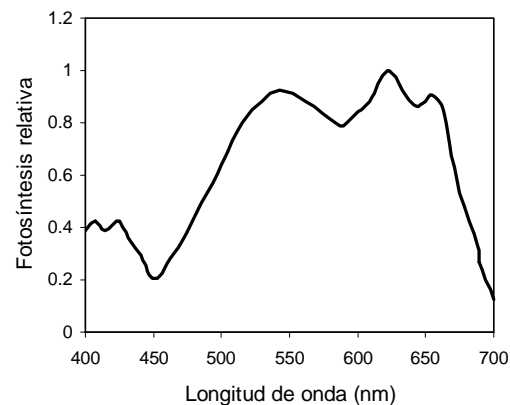


Figura M.5.B. Espectro de acción estimado para la fotosíntesis de *P. perforata* (tomado de Fork, 1963).

Cuando la irradiancia espectral se multiplica por la función que representa el espectro de acción para un proceso biológico, se obtiene la irradiancia espectral biológicamente efectiva (IBE) para ese proceso. Función que integrada en el tiempo da la dosis biológicamente efectiva de radiación.

$$DBE = \int_0^t \int_{\lambda_2}^{\lambda_1} E(\lambda) \cdot \varepsilon(\lambda) d\lambda dt$$

donde E es la irradiancia a una longitud de onda λ , $\varepsilon(\lambda)$ es el coeficiente del espectro de acción y t es el tiempo.

M.6. Tratamientos de luz.

Cuando está presente la radiación PAR en su totalidad (capítulos III, IV, V):

- Tratamiento PAB (PAR+UVA+UVB): que excluye la banda de UVC, se consigue gracias al uso de los filtros Ultraphan 295 (Digefra GmbH, Munich, Alemania) (figura M.6).
- Tratamiento PA (PAR+UVA): que excluye las bandas UVB y UVC, el filtro empleado que corta selectivamente estas bandas es el Folex 320 (Folex GmbH, Dreieich, Alemania) (figura M.6).
- Tratamiento P (PAR): que excluye toda la banda de UV, tanto A, B y C, en este caso se emplean los filtros Ultraphan 395 (Digefra GmbH, Munich, Alemania) (figura M.6).

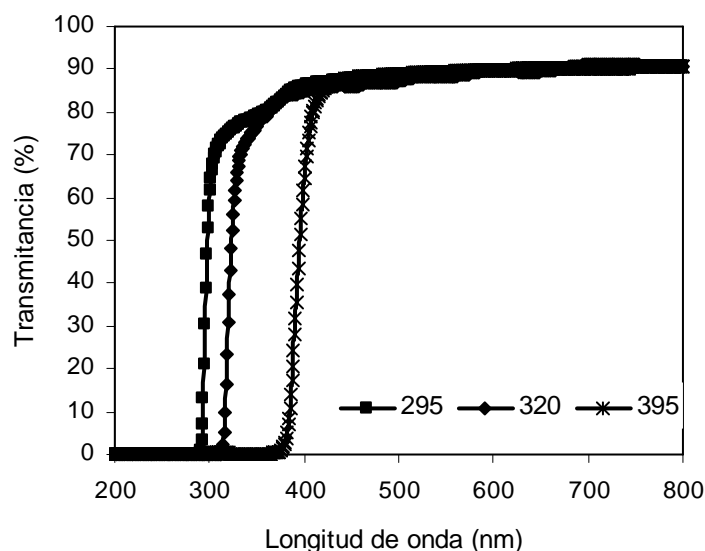


Figura M.6. Espectro de transmisión de los filtros.

Cuando se emplean bandas de PAR (capítulo IV):

- Azul: 4 lámparas fluorescentes azules Philips 20W (Holanda) filtradas con dos filtros azules de metacrilato (Plexiglas® Röhm PG627 y PG602). Estos filtros aseguran un espectro de emisión únicamente en la banda azul, con un máximo de emisión a 455 nm (figura M.7).
- Verde: 2 lámparas verdes General Electric 20W (Gran Bretaña) y otras 2 Sylvania (Alemania) filtradas con un filtro de metacrilato (Plexiglas® Röhm PG700). El máximo de emisión se sitúa a 525 nm (figura M.7).
- Amarilla: 1 Lámpara de sodio de baja presión (PHILIPS SOX 135 W, Holanda). Esta lámpara suministra luz amarilla de banda espectral estrecha (ancho de banda de 15 nm) y cuyo máximo de emisión se sitúa a 585 nm. La irradiancia de esta lámpara es mucho más alta que en los demás casos, así que se atenuó empleando 3 placas difusoras Plexiglas® gs Weiss 017 (figura M.7).
- Roja: 4 lámparas General Electric rojas 20W (Gran Bretaña) filtradas con un filtro rojo de metacrilato (Plexiglas® Röhm PG502), para eliminar la emisión del rojo lejano del tubo fluorescente que, aunque baja, puede afectar a las respuestas fisiológicas de la planta. El máximo de emisión de esta fuente de luz roja se sitúa a 655 nm (figura M.7).

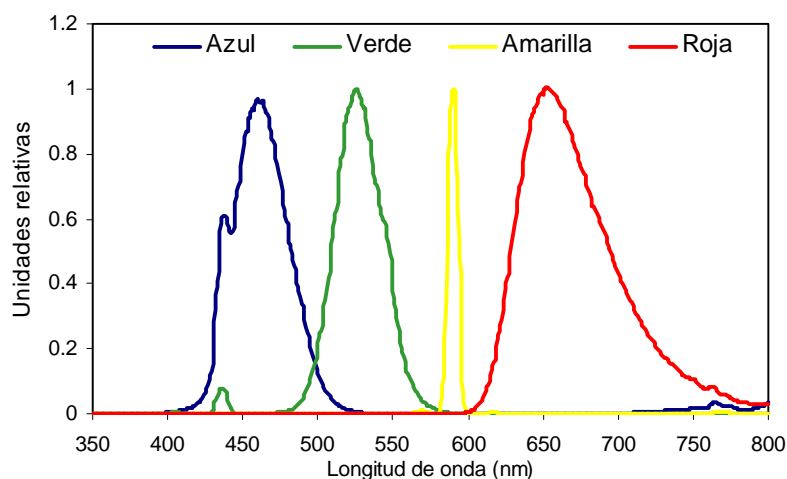


Figura M.7. Espectro de emisión de las fuentes de luz de bandas de PAR

M.7. Medios de cultivo.

M.7.1 Medio Provasoli (Provasoli, 1963) para agua de mar enriquecida, concretamente un medio de cultivo modificado (Bold y Wynne, 1978). Se añade a un litro de agua de mar, 20 mL del medio que se detalla a continuación, ajustando su pH a 8.2 y conservándolo una vez preparado a 4° C. Para preparar un litro de este medio de cultivo:

Agua destilada.....	600mL
Tris buffer (Tris (Hidroximetil) Aminometano).....	3 g
Nitrato sódico.....	2.1 g
Glicerofosfato sódico.....	0.3 g
Yoduro potásico.....	1.6 mg
Óxido de germanio.....	0.25 g
Vitamina B ₁₂ (5 mg/500mL).....	6 mL
Tiamina (100mg /100mL).....	3 mL
Biotina (5mg/500mL).....	3mL
Solución de metales P-II.....	150 mL
Solución de hierro-EDTA.....	150 mL

Solución de metales P-II, añadir a un litro de agua destilada:

Titriplex III (Ácido etilendiaminotetraacético Sal Disódica 2- H ₂ O).....	1.10 g
Ácido bórico.....	1.14 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O.....	0.049 g
MnSO ₄ ·H ₂ O.....	0.124 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.022 g
CoSO ₄ ·7H ₂ O.....	0.005 g

Solución de hierro-EDTA, añadir a un litro de agua destilada:

Titriplex III (Ácido etilendiaminotetraacético Sal Disódica 2-H ₂ O).....	0.726 g
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O.....	0.7 g

M.7.2 Agua de mar artificial.

1. Instant Ocean Salt (Aquarium System, Sarrebourg, Francia).
2. Marinemix hw-Professional (Wiegandt GmbH, Alemania).

Para preparar el agua de mar se disuelve la sal en agua destilada según la salinidad deseada, ya sea 33, 34 ó 35 mg·L⁻¹. La composición de las sales se indica en la tabla M.4.

Tabla M.4. Composición de las sales para agua de mar artificial. Para salinidad 34 ‰.

Ión	Instant Ocean Salt (mg·L⁻¹)	Marinemix hw-Professional (mg·L⁻¹)
Cloro	19251	19345
Sodio	10757	10752
Sulfato	2659	2700
Magnesio	1317	1295
Potasio	402	410
Calcio	398	431
Carbonato/bicarbonato	192	145
Estroncio	8.6	8
Boro	5.6	5
Bromo	65	72
Flúor	1.0	1.3
Yodo	0.22	0.19
Litio	0.18	0.17
Cobre	Traza(<0.03)	Traza (<0.001)
Hierro	Traza(<0.03)	Traza (<0.001)
Níquel	Traza(<0.04)	Traza (<0.001)
Zinc	Traza(<0.02)	Traza (<0.001)
Manganeso	Traza(<0.01)	Traza (<0.001)
Molibdeno	Traza(<0.01)	Traza (<0.001)
Cobalto	Traza(<0.05)	Traza (<0.001)
Vanadio	Traza(<0.04)	Traza (<0.001)
Selenio	Traza	Traza (<0.001)
Plomo	Traza(<0.005)	Traza (<0.001)
Arsénico	Traza(<0.0002)	Traza (<0.001)
Cadmio	Traza(<0.02)	Traza (<0.001)
Cromo	Traza(<0.0006)	Traza (<0.001)
Aluminio	Traza(<0.04)	Traza (<0.001)
Estaño	Traza	Traza (<0.001)
Antimonio	Traza	Traza (<0.001)
Rubidio	Traza	Traza (<0.001)
Bario	Traza(<0.05)	Traza (<0.001)
Mercurio	No	No
Nitrato	No	No
Amonio	Traza(<0.05)	No
Fosfato	No	No

La sal Marinemix hw-Professional también contiene una serie de bioelementos, como son enzimas, hormonas y vitaminas en una cantidad entre los 500 y 9 µg·L⁻¹. Entre estos encontramos vitamina E, C, A, B₁ (tiamina), B₁₂ y H (biotina), L-tirosina, nicotiamida, leucina, glicina y mesoinositol.

Se decidió emplear estas sales sintéticas ya que al conocerse el contenido de los componentes nitrogenados en cada una de ellas podíamos controlar la concentración y la composición exacta del nitrógeno en el medio de cultivo.

El empleo de una u otra sal en los distintos experimentos estuvo en función de la disponibilidad de las mismas. En España pudimos adquirir Instant Ocean Salt y en Argentina y Alemania Marinemix hw-Professional.

M.8. Medida de la tasa de fotosíntesis por fluorescencia *in vivo* de la clorofila asociada al PSII.

Para determinar la fotosíntesis *in vivo* de manera rápida y no intrusiva, se empleó la técnica de la medida de fluorescencia de la clorofila *a* asociada al PSII, mediante la que se pueden determinar los rendimientos cuánticos, la capacidad fotosintética y la cantidad de energía que se transfiere a la cadena de transporte de electrones fotosintética y la que se disipa en forma de calor (Schreiber *et al.*, 1986).

La emisión de fluorescencia de la clorofila *a* se extiende entre 660 y 760 nm, de manera que empleando longitudes de onda de excitación más cortas se consigue la separación de la fluorescencia de la luz de medida con filtros ópticos. Existen dos mecanismos que compiten durante los procesos de desexcitación, son la conversión fotoquímica de energía en los centros de reacción del PSII y los mecanismos no fotoquímicos al nivel de antena y de centros de reacción. Debido a la intervención de ambos mecanismos la eficiencia potencial de emisión de fluorescencia disminuye, se pueden definir dos mecanismos de amortiguamiento: fotoquímico y no fotoquímico (figura M.8).

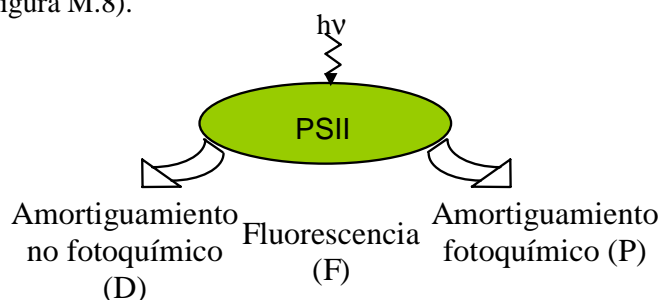


Figura M.8. Mecanismos de disipación de energía.

A temperatura ambiente la fluorescencia variable se origina casi exclusivamente por el PSII, a una temperatura muy baja, de unos 77K, se observaría fluorescencia tanto del PSII ($\lambda_{\text{máx emisión}}=690$ nm) como del PSI ($\lambda_{\text{máx emisión}}=730$ nm) (Björkman, 1987).

El fluorímetro de pulso de amplitud modulada **PAM-2000** (figura M. 9.A, Waltz, Effeltrich, Alemania) se compone de cuatro sistemas de luz, todos ellos así como la recepción de la señal

de fluorescencia se realizan a través de una fibra óptica conectada al fluorímetro. El equipo se conecta a un ordenador, donde se recogen las medidas a través del programa informático Da-2000 (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemania):

- Luz de medida: máxima emisión a 655 nm con 11 niveles de irradiancia.
- Luz actínica: para activar la fotosíntesis, puede ser lámpara halógena con transmisión de longitudes de onda menores de 710 nm con 11 niveles de irradiancia o lámpara LED con máximo de emisión a 655 nm y 11 niveles de irradiancia.
- Pulso de saturación producido por la lámpara halógena indicada anteriormente, con 10 niveles.
- Luz roja-lejana con una emisión máxima a 735 nm y también con 11 niveles. Esta lámpara se emplea para reoxidar los centros de reacción con o sin oscuridad previa.

El fluorímetro acuático **Diving-PAM** (figura M.9.B), útil para medidas *in situ* hasta de 50 m de profundidad, posee una fibra óptica flexible de 1.5 m de longitud conectada a una carcasa totalmente estanca. Este fluorímetro carece de luz roja lejana y la luz actínica la emite una lámpara halógena. Posee un sensor de temperatura, profundidad y de radiación PAR. Los datos se transfieren en su conjunto gracias a la conexión del fluorímetro a un ordenador y mediante el uso del programa informático PAMTRANS. También existe la posibilidad de emplear este fluorímetro operando por control remoto desde un ordenador con el programa WinControl.

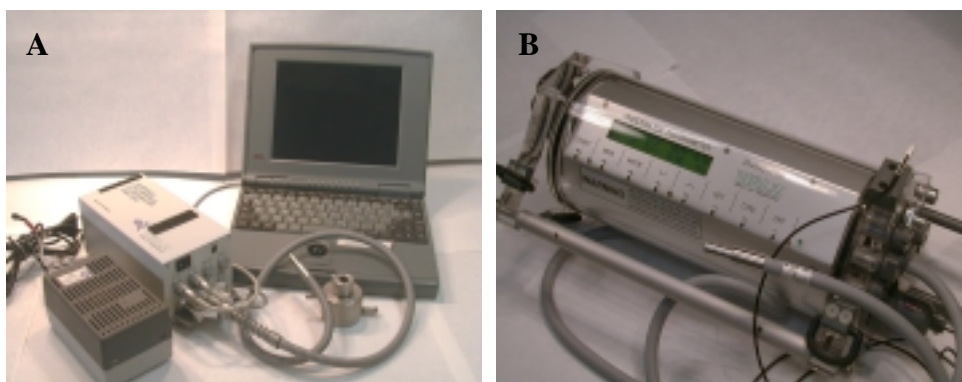


Figura M.9. Fluorímetros PAM-2000 (A) y Diving-PAM (B).

Cuando todos los centros de reacción están abiertos (Q_A completamente oxidada) se alcanza el nivel mínimo de rendimiento fluorescente F_o , cuando se aplica el pulso de saturación se alcanza el máximo rendimiento fluorescente F_m , en este punto están todos los centros de reacción cerrados (Q_A completamente reducido). La diferencia entre ambos parámetros se denomina fluorescencia variable F_v que indica el potencial de transporte electrónico del PSII

para un estado fisiológico determinado, la proporción entre F_v/F_m se denomina **rendimiento cuántico óptimo o máximo** (figura M.10), este último es un buen indicador de la eficiencia fotosintética de la planta (Genty *et al.*, 1989). Los valores de F_v/F_m para una gran variedad de plantas no estresadas adaptadas a oscuridad varían de 0.75 a 0.80 (Viñegla, 2000). En algas pardas y rojas los valores de F_v/F_m son más bajos que en algas verdes, ya que las antenas del PSII son distintas.

Cuando existe una preadaptación a unas determinadas condiciones de luz la medida instantánea de fluorescencia (F_t) refleja la existencia de un número de centros de reacción reducidos por lo que la emisión máxima de fluorescencia disminuye, reflejándose como F_m' . Así pues, se define el **rendimiento cuántico efectivo** de emisión de fluorescencia (Φ_{PSII}), análogo a F_v/F_m pero para plantas adaptadas a condiciones de luz (figura M.10) como:

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$$

donde F_m' es, como se ha indicado anteriormente, el valor máximo de emisión de fluorescencia para una planta sometida a unas determinadas condiciones lumínicas, y F_t , el valor instantáneo de emisión de fluorescencia captado por la luz de medida del fluorímetro de amplitud modulada.

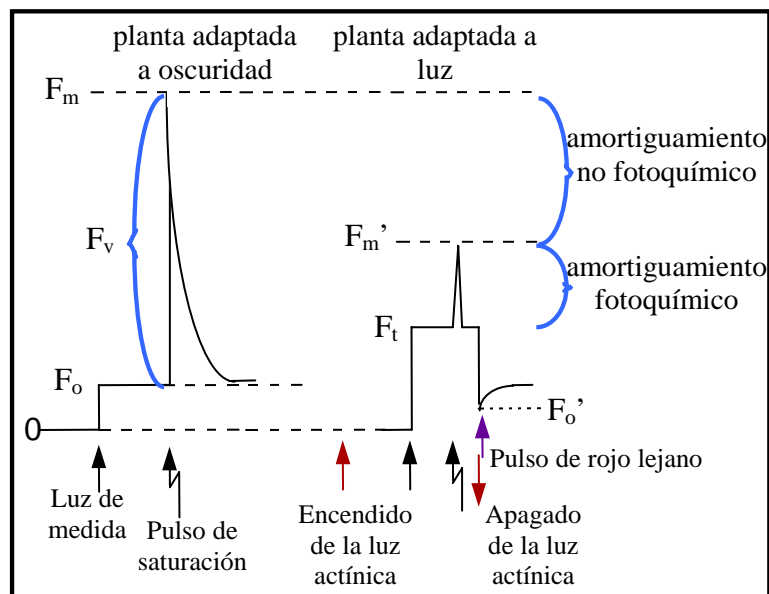


Figura M.10. Evolución temporal de emisión de fluorescencia determinada con el fluorímetro portátil PAM-2000. Las flechas negras indican el encendido de la luz de medida. Las flechas negras quebradas marcan los pulsos de saturación. Con las flechas rojas se indica el encendido y apagado de la luz actínica y la flecha morada marca el inicio del pulso de luz rojo lejano.

El **amortiguamiento no fotoquímico** (q_N) incluye los procesos de disipación de energía, que disminuyen la emisión de fluorescencia, independientemente de los procesos de conversión

fotoquímica (figura M.10). La mayor parte de la energía se disipa mediante un gradiente de pH intratilacoidal, denominado amortiguamiento de energía (qE); pero también existe un amortiguamiento debido a cambios en los estados de transición (qT) y a procesos de fotoinhibición del PSII (qI). Para la estimación de qN se empleó el PAM-2000 y el cálculo se realizó siguiendo la expresión:

$$qN=1-[(F_m'-F_o')/(F_m'-F_t)]$$

La **tasa de transporte electrónico (TTE)** representa una estimación del tránsito de electrones a través de la cadena de transporte fotosintético. Su cálculo está basado en la determinación del rendimiento cuántico efectivo de emisión de fluorescencia y en los valores de irradiancia incidente (E) sobre la muestra empleando la siguiente ecuación:

$$TTE (\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}) = \Phi_{\text{PSII}} \cdot E \cdot A \cdot 0.5$$

El rendimiento cuántico de emisión de fluorescencia del PSII (Φ_{PSII}) representa el rendimiento cuántico de fotosíntesis, como ocurre bajo condiciones de estado estacionario de emisión de fluorescencia, provocado por la irradiancia externa. Esta irradiancia incidente procede de varias vías: de la lámpara LED del PAM-2000 con 11 niveles de intensidad incubando durante 30 segundos a cada uno de ellos, de la lámpara halógena del DIVING-PAM con 10 niveles de intensidad incubando 15 segundos en cada uno de ellos, o bien de una fuente externa de luz no asociada a ninguno de los fluorímetros, como por ejemplo, las mismas lámparas empleadas para el cultivo y atenuadas para conseguir distintas intensidades lumínicas mediante filtros neutros. El factor de 0.5 se debe al hecho de que el transporte de un electrón requiere la absorción de dos cuantos de luz, ya que están involucrados dos fotosistemas, aunque únicamente se está registrando la emisión de fluorescencia del PSII.

La **absortancia (A)**, fracción de irradiancia incidente que es absorbida por el material biológico, se define como 1-T-R, siendo T la transmitancia (fracción de la irradiancia incidente que es transmitida a través del tejido) y R la reflectancia. Se han empleado dos métodos para determinar la A, según la disponibilidad de equipos en el lugar de experimentación. Una manera de estimar el valor de A para un alga laminar, como es el caso de *Porphyra*, es determinar la transmitancia del talo colocándolo sobre el sensor plano de un radiómetro, se desestima la reflectancia sin que este hecho perjudique a nuestra medida, ya que su contribución es mínima (Figuroa *et al.*, 1996). Este método se empleó para la especie *Porphyra columbina*. Otra forma más exacta que se llevó a cabo en los demás casos, es emplear la técnica del cristal de ópalo. Esta técnica consiste en colocar el talo en el cristal entre la fuente de luz y el detector de un espectrofotómetro y medir la densidad óptica (DO) a 678 nm. A partir de esta medida se

determina la absorbancia según la fórmula $A=1-10^{-DO}$ y este valor se convierte a la medida de la absorbancia total (AT) medida con una esfera integradora mediante la regresión $AT=0.074+0.642 \cdot A$ (Mercado *et al.*, 1996). En lo sucesivo, con el término A nos estaremos refiriendo a la absorbancia total.

M.9. Medida de la tasa de fotosíntesis por desprendimiento de oxígeno.

Para la medida de la tasa de fotosíntesis por desprendimiento de oxígeno se empleó un equipo OXY M5 (Real Time Computer, Erlangen, Germany) equipado con 5 electrodos tipo Clark (YSI 5331, Yellow Spring) cada uno de ellos acoplado a una cámara de incubación, con lo cual cada medida es la media de 5 réplicas. En cada cámara se introdujeron 2 discos de *Porphyra* sp. y se incubaron a irradiancias crecientes (0, 66, 90, 171 y 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 15 minutos en cada intervalo), se emplearon lámparas fluorescentes Truelite y filtros neutros para la atenuación de la cantidad de luz recibida en las cámaras de incubación (figura M.11). Dichas cámaras se encontraban en el interior de una cámara de cultivo a una temperatura de 15° C. Los parámetros fotosintéticos se estimaron ajustando los datos a una función de tipo hiperbólica (Jassby y Platt, 1976):

$$\text{TFB} = \text{TFB}_{\text{max}} \cdot (\tanh(\alpha E / \text{TFB}_{\text{max}}))$$

donde TFB es la fotosíntesis bruta, TFB_{max} la fotosíntesis bruta de saturación, \tanh es la función tangente hiperbólica, α es la eficiencia fotosintética a bajas irradiancias y E es la irradiancia incidente. La irradiancia de saturación de la fotosíntesis (E_k) se calcula del corte entre las rectas TFB_{max} y el valor de α . La respiración (R_o) se estimó como la pérdida de oxígeno en oscuridad al principio del periodo de incubación.

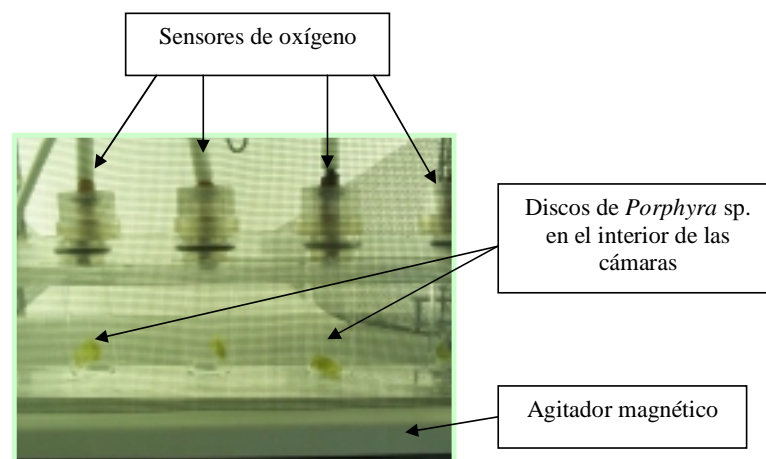


Figura M.11. Ilustración de las cámaras de incubación para las medidas de oxígeno. En el momento de la fotografía la irradiancia de incubación era de 171 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, se observa el filtro neutro empleado para atenuar la radiación.

M.10. Estimación de la relación peso fresco/peso seco.

Se tomaron 80 muestras de talos de *Porphyra* sp. crecidos bajo distintas calidades lumínicas y distintos medios de cultivo y se determinó el peso fresco (PF) de cada una de ellas empleando una balanza de precisión. El peso seco (PS) se determinó después de mantener los talos durante 24 horas a una temperatura de 60° C. Se correlacionaron los valores de peso fresco y peso seco para cada una de las muestras, no se detectaron diferencias significativas para la correlación entre las distintas condiciones de cultivo. Así las regresiones obtenidas para las especies de *Porphyra* estudiadas fueron las siguientes:

$$PF = 2 \cdot 10^{-4} + 3.43 \cdot PS \text{ (} P. \text{ leucosticta; Aguilera, 1997)}$$

$$PF = 3 \cdot 10^{-4} + 3.48 \cdot PS \text{ (} P. \text{ umbilicalis)}$$

$$PF = 2.6 \cdot 10^{-4} + 4.1 \cdot PS \text{ (} P. \text{ columbina)}$$

Desestimamos en la ecuación el valor del corte con el eje de ordenadas, por ser muy pequeño, y nos quedan unas relaciones PF/PS de 3.43, 3.48 y 4.1 para las 3 especies de estudio.

M.11. Tasa relativa de crecimiento.

Se emplearon dos métodos para el cálculo del área del talo o disco, el uso de uno u otro dependió de la disponibilidad de equipos. Para los experimentos en los que se empleó *P. columbina* y *P. umbilicalis*, se usó el primero de ellos, y para el resto, el segundo de los métodos:

M.11.1 En algunos de los experimentos en los que se emplearon discos y debido a que el alga *Porphyra* sp. crece isodiamétricamente, se midió el diámetro de los discos con una regla y a partir de este valor se calculó el área del disco $a = \pi \cdot r^2$, siendo r el radio del disco.

M.11.2 Otro método para el cálculo del área de un disco o un talo en completo consistió en el uso de un programa informático de análisis de imagen (Visilog 5.2, Noesis, Francia) conectado a unos focos de luz y a una cámara fotográfica POLAROID DMC-1E.

A partir de la medida del área de los discos se calculó la tasa relativa de crecimiento (TRC) (Evans, 1972; Lüning, 1990):

$$TRC = 100 \cdot \text{Ln} (a_2/a_1) \cdot (t_2-t_1)^{-1}$$

donde a_1 es el área en el tiempo t_1 (días) y a_2 es el área en el tiempo t_2 (días). La TRC se expresa en $\% \cdot d^{-1}$

M.12. Estimación del contenido pigmentario.

M.12.1. Clorofila a:

La clorofila *a* se extrajo mediante disolventes orgánicos, concretamente se empleó para *P. leucosticta* y *P. umbilicalis* N,N-dimetilformamida según el método de Inskeep y Bloom (1985). Para *P. columbina* se empleó metanol según el método de Wellburn (1994). En ambos casos las muestras para la determinación de clorofila *a* se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento del análisis, para el que se emplearon entre 15-20 mg de peso fresco del alga por réplica. Para cada uno de los análisis se añadió a la muestra entre 1.5-2 ml de N,N-dimetilformamida o metanol, según la especie de estudio, y se incubó, sin necesidad de triturar, durante 24 horas en oscuridad a 4° C. Transcurrido este periodo se centrifugó la muestra a 5000 g durante 10 minutos y se determinó las densidades ópticas para el cálculo de la concentración empleando un espectrofotómetro UV-visible Shimadzu UV-1603 (Tokio, Japón) en el primer caso y un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 (Hewlett-Packard, Toronto, Canadá) para el segundo.

La ecuación para el cálculo de la concentración de clorofila *a* en algas rojas según Inskeep y Bloom (1985) es la siguiente:

$$\text{Clorofila } a = 12.7 \cdot (\text{DO}_{664.5} - \text{DO}_{750})$$

La ecuación para el cálculo de la concentración de clorofila *a* en algas rojas según Wellburn (1994) es la siguiente:

$$\text{Clorofila } a = 16.72 \cdot (\text{DO}_{665.2} - \text{DO}_{750})$$

donde DO_λ es la densidad óptica del extracto a λ nm, se determinó la turbidez de las muestras a 750 nm. Las unidades de estas expresiones son $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Para expresarlo en miligramos de clorofila por gramo de peso seco, habría que multiplicar por el volumen de extracción y dividir por el peso seco de la muestra analizada.

M.12.2. Ficobiliproteínas:

Para la extracción de las ficobiliproteínas las muestras (de entre 50-20 mg de peso fresco) se trituraron en un mortero colocado sobre una base de hielo para mantener la temperatura alrededor de 4° C, al que se le añadió 2 mL de tampón fosfato 0.1M a pH=6.5. Se centrifugó el extracto hidrosoluble durante 15 minutos a 4° C y a 10000 g. Este extracto se empleó para cuantificar las ficobiliproteínas y también las proteínas solubles. Del precipitado se estimaron

las proteínas insolubles. El contenido de ficobiliproteínas se determinó según Beer y Eshel (1985):

$$FE = ((DO_{564} - DO_{592}) - (DO_{455} - DO_{592}) \cdot 0.2) \cdot 0.12$$

$$FC = ((DO_{618} - DO_{645}) - (DO_{592} - DO_{645}) \cdot 0.51) \cdot 0.15$$

donde DO_{λ} es la densidad óptica del extracto a λ nm. Se expresa de este modo el contenido de ficoeritrina y ficocianina en $mg \cdot mL^{-1}$, de manera que multiplicando por el volumen de extracción en mililitros y dividiendo entre el peso fresco de la muestra, obtendremos el contenido de ambos pigmentos en miligramos por gramo de peso fresco.

M.13. Estimación de la concentración de proteínas solubles y estructurales.

M.13.1. Las proteínas solubles se determinaron del sobrenadante del extracto anterior. Para la cuantificación del contenido en proteínas solubles se empleó el reactivo Biorad (Bio-Rad Protein Assay, GmbH, Alemania). Este método se basa en que la unión a proteínas provoca un cambio en el máximo de absorción para una solución ácida de Coomassie Brilliant Blue G-250 desde 465 nm a 595 nm, Bradford (1976) fue el primero en demostrar la utilidad de este principio para el ensayo de proteínas. Se añadió 50 μ l del extracto a 750 μ L del tampón de extracción, la reacción comienza tras completar 1 mL de reacción con 200 μ L de reactivo BIORAD. Tras agitar las muestras se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se determinó la densidad óptica a 595 nm. Para la elaboración de la recta patrón de concentraciones se empleó la albúmina bovina en un rango de concentraciones de 0 a 20 μ g mL^{-1} .

M.13.2. Para determinar las proteínas estructurales (insolubles) se añadió 1 mL de hidróxido sódico 1M al precipitado, se agitó bien y se dejó 24 h a 4° C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo se calcularon las proteínas del siguiente modo: 100 μ L del extracto al que se añadieron 300 μ L de NaOH, 400 μ L de HCL 1N (para neutralizar) y 200 μ L de Biorad. Se agitó y tras 15 minutos se midió la absorbancia a 595 nm. La recta patrón se calculó disolviendo en NaOH la albúmina bovina (10 mg en 50 mL) y haciendo un barrido entre 0 y 30 μ g mL^{-1} .

M.14. Medidas de carbono y nitrógeno total.

El contenido interno de carbono y nitrógeno total se determinó empleando un analizador elemental CNHS LECO-932 (Michigan, EE.UU.) a 1050° C, que emplea un detector de infrarrojos. Como patrón se empleó el EDTA. Se analizaron las muestras secas y se determinó

el contenido en % de peso seco o lo que es lo mismo miligramo (de C o N) por gramo de peso seco de muestra.

M.15. Método de análisis de MAAs.

Para el análisis de los aminoácidos tipo micospirinas (MAAs) se empleó como base el método de Karsten y colaboradores (1998a) aplicándole ciertas modificaciones, de modo que el protocolo a seguir fue el siguiente: se tomaron entre 10-20 mg de peso seco del alga a analizar (las muestras se mantuvieron en sílica gel hasta el momento del análisis), la extracción se realizó en un baño a 45° C durante 2 horas en 1 mL de metanol al 20%. Transcurrido ese tiempo se tomó entre 600-800 µL del sobrenadante y se llevó a sequedad en un concentrador centrífugo al vacío (Jouan RC 10-09, Cedex, Francia). Por último, se resuspendió el pellet en el mismo volumen retirado (600-800 µL) pero en esta ocasión de metanol (calidad cromatografía líquida) al 100% con el fin de eliminar sales y proteínas. Esta muestra se analizó en un equipo Waters 600 (Waters Cromatografía S.A., Barcelona, España) de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (figura M.12), antes de ser inyectada había que filtrarla por 0.2 µm, para eliminar posibles residuos que podrían afectar al equipo.

La columna empleada para la separación de los MAAs en el HPLC fue una C₈ (Sphereclone™, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania) con un material de relleno esférico de 5 µm de diámetro, el tamaño de dicha columna fue de 250x4.6 mm; se empleó una precolumna (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania) afín a la columna empleada.

La fase móvil fue una solución acuosa con un 2.5% de metanol y un 0.1% de ácido acético, filtrada y desgasificada. Se usaron condiciones de bajo pH porque en estas condiciones los MAAs presentan una carga positiva y se comportan por tanto, como cationes muy débiles. Se inyectó un volumen de muestra de 10 µL, que pasaba a un flujo isocrático de 0.5 mL·min⁻¹. El tiempo de elución fue de 15-20 minutos.

Se empleó un detector de UV y visible (detector de fotodiodos 996) que hacía un barrido para cada muestra entre 290 y 400 nm, tomando datos cada segundo para cada longitud de onda de entre este rango seleccionado. Los datos fueron recogidos y analizados empleando el programa informático Millennium 3.2.

Una vez extraído el cromatograma a 330 nm, se identificaron los picos por co-cromatografía según sus espectros y tiempos de retención. Para ello se compararon con los estándares extraídos de los siguientes organismos marinos (entre paréntesis se indica el tipo de MAA del estándar): *Mastocarpus stellatus* (shinorine), *Porphyra yezoensis* (porphyra-334), *Bostrychia scorpioides* (palythine) y los ojos de la trucha del coral *Plectropomus leopardus* (asterina-330).

El profesor Dr. Ulf Karsten (Universidad de Rostock, Alemania) nos proporcionó estos estándares.



Figura M.12. Equipo de HPLC empleado con todos sus componentes.

Para el cálculo de la concentración en $\mu\text{g MAA}\cdot\text{g}^{-1}$ PS se empleó la siguiente fórmula, basada en una extensión de la Ley de Lambert-Beer:

$$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ PS} = \frac{\text{Área}(\mu\text{V}\cdot\text{seg}) \cdot \text{Flujo}(\text{mL min}^{-1})}{\varepsilon'(\text{g}^{-1} \cdot \text{L}) \cdot V_{\text{inyección}}(\text{mL}) \cdot \text{PS}(\text{mg}) \cdot 60}$$

En la fórmula se han tenido en cuenta los cambios de unidades, por lo tanto, introduciendo los valores para cada parámetro en las unidades indicadas entre paréntesis, se llega al resultado final de la concentración en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PS. Esta fórmula sólo es válida cuando la extracción se realiza en 1ml de metanol al 20%, si se variase esta condición la fórmula habría que multiplicarla por el volumen de extracción expresado en mililitros.

Desarrollo de la ecuación para el cálculo del contenido de una sustancia dada correspondiente a un pico en un cromatograma:

Un pico cromatográfico puede asimilarse a un triángulo isósceles con altura H y base W (H: altura del pico y W: ancho de la base del pico) (figura M.13). En este caso el área del pico (S) sería: $S = \frac{H \cdot W}{2}$ [1] las unidades son S: UA·seg, H: UA, W: seg (UA: unidades de absorbancia).

El área del pico según la ecuación [1] puede asimilarse también a un rectángulo de base W/2 y altura H (figura M.14). Esta apreciación del pico cromatográfico es más conveniente para el posterior desarrollo del proceso deductivo, ya que la altura es constante a lo largo de toda la base y por tanto, durante toda la elución del pico en cuestión.

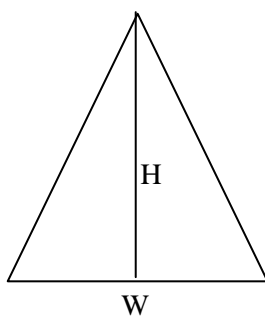


Figura M.13

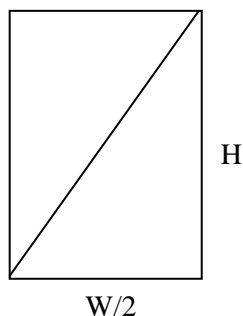


Figura M.14

La concentración de una sustancia puede determinarse a partir de la absorbancia medida como altura del pico cromatográfico mediante la Ley de Lambert-Beer, esto es: $[\text{sustancia}] = \frac{A}{\epsilon}$ [2] unidades: concentración: $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, A: UA, ϵ : $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$; o bien puede medirse la concentración en $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y sustituirse el coeficiente de extinción molar (ϵ) por el coeficiente de extinción específico (ϵ') dado en $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}$.

La cantidad de sustancia contenida en el volumen que ha eluído durante el desarrollo del pico cromatográfico vendrá dada por la ecuación [3]: $\text{gramos sustancia} = \frac{A \cdot V}{\epsilon'}$, donde V: volumen que ha eluído durante el tiempo W/2 (en L).

El volumen (V) puede determinarse a partir del flujo de elución (F, en $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), según la ecuación [4]: $V = \frac{W}{2} \cdot F \cdot \frac{1}{60 \cdot 10^3}$, los factores 60 y 10^3 resultan de la conversión de minutos a segundos y de mL a L, para mantener la homogeneidad dimensional en la ecuación.

Sustituyendo la absorbancia A por la altura H en la ecuación [3], y el volumen por su equivalente en la ecuación [4] resulta:

$$\text{gramos sustancia} = \frac{H \cdot W \cdot F}{2 \cdot \epsilon' \cdot 60 \cdot 10^3} \quad [5]$$

Sustituyendo la ecuación [1] llegamos a la ecuación [6]:

$$\text{gramos sustancia} = \frac{S \cdot F}{\epsilon' \cdot 60 \cdot 10^3}$$

Para determinar la concentración ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dividiremos el resultado de la ecuación [6] por el volumen de inyección (V_i ; μL) en el cual iban contenidos los gramos de sustancia que dan lugar al pico cromatográfico, resulta la ecuación [7]:

$$\text{mg sustancia} \cdot \text{mL}^{-1}_{\text{extracto}} = \frac{S \cdot F}{\epsilon' \cdot V_i \cdot 60}$$

Debe tenerse en cuenta si se usa el sistema Millenium 3.2 que la altura de pico viene dada en microvoltios (μV) y que el sistema tiene establecido que 1 Voltio=1 UA.

M.16. Determinación de aminoácidos libres.

Se homogeneizaron unos 30 mg de peso fresco en 2 mL de metanol al 80% y se centrifugó el extracto (10000 g durante 15 minutos). El pellet, que contiene entre otros compuestos las proteínas precipitadas, se desechó. Para eliminar la mayor parte de los pigmentos del sobrenadante, el extracto se llevó a sequedad y se resuspendió en el mismo volumen de agua. Este extracto se filtró y se analizó el contenido de aminoácidos empleando un equipo de HPLC 1100-Series-System de Hewlett Packard, cuyo degasificador fue G1322A, la bomba QuatPump G1311A y el detector de fluorescencia Waters 474 se excitó a 340 nm y se recogió la emisión a 455 nm. Se empleó el reactivo orto-phthalaldehído (OPA) para la derivatización de los aminoácidos (Fluoraldehyde™ reagent solution, Pierce), la reacción se produjo durante 20 minutos y transcurrido este tiempo el producto de la reacción se detectó por fluorescencia a nivel de picomol. Se empleó la columna RP-C18-OPA Knauer (Berlín, Alemania) longitud de 25 cm, ID 4 mm, tamaño de partículas 5 μm , con una precolumna de 5 mm. El tiempo de retención fue de 40 minutos a un flujo de 0.8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, las fases móviles fueron A: metanol:agua 9:1, B: Tampón 0.1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ a pH 6.8 + 1.25% tetrahidrofurano (THF). El gradiente empleado fue: a los 0 min 30% A, 3 min 30% A, 18 min 40% A, 40 min 100% A. Se inyectó un volumen de 15 μL de muestra que reaccionaron con otros 15 μL del reactivo OPA (figura M.15). Se empleó una mezcla estándar comercial de aminoácidos de Sigma (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Alemania) para la identificación y cuantificación de los picos cromatográficos (figura M.16). Para la monitorización de los resultados se empleó el programa informático HP ChemStation.

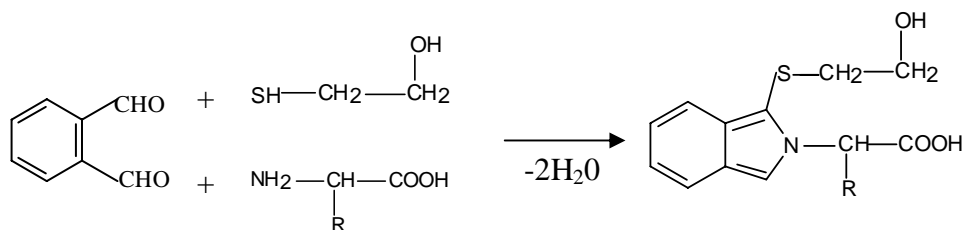


Figura M.15. Reacción del OPA para la derivatización de aminoácidos.

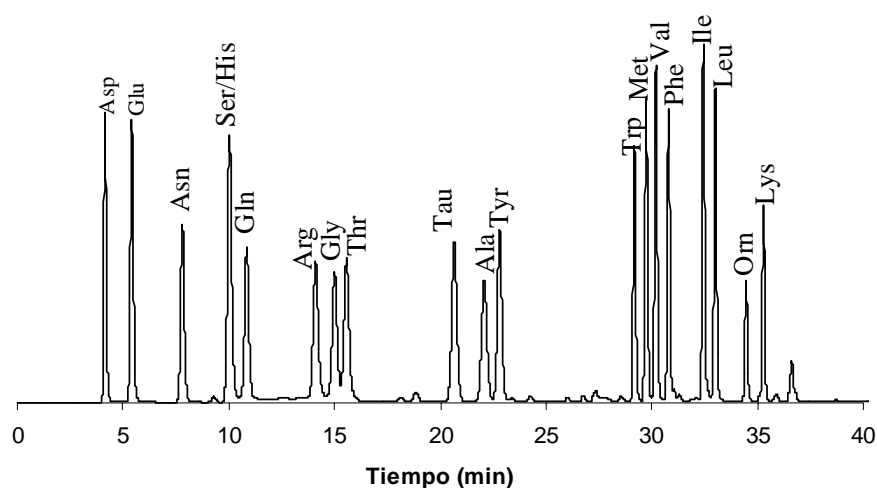


Figura M.16. Cromatograma del estándar comercial para los aminoácidos analizados.

M.17. Estadística.

Los resultados se presentan como el valor medio y la desviación típica de las muestras respecto a ese valor medio, el número de réplicas fue de 3 para el análisis de pigmentos, proteínas, aminoácidos, MAAs y C/N total; de 5 para la evolución de oxígeno y las tasas de transporte electrónico, y de 12 para las medidas de rendimientos cuánticos de fluorescencia. La significación estadística de las medias fue contrastada mediante un Análisis de la Varianza (ANOVA) de uno o dos factores (según el caso), seguido de un test de comparaciones múltiples de Tukey. El nivel de significación fijado en todos los casos fue del 95% ($p < 0.05$). Para calcular el grado de correlación entre variables y/o factores se empleó el coeficiente de correlación de Pearson. La base teórica de estos análisis estadísticos se recoge en Sokal y Rohlf (1995). Se empleó el programa informático SPSS 11.0 para Windows.

CAPÍTULO I

Técnica de extracción e identificación de los MAAs. Estabilidad de la porphyra-334 frente a cambios de pH y temperatura. Fluorescencia de la porphyra-334. Estudio preliminar sobre la biosíntesis de los MAAs en *Porphyra umbilicalis*.

En este capítulo se abordará el desarrollo del método empleado para la extracción e identificación de los MAAs. Teniendo en cuenta las distintas opciones encontradas en la literatura, se realizaron pruebas comparativas con el fin de optimizar cada uno de los pasos a seguir y así obtener en lo sucesivo mejores y más fiables resultados.

Puesto que se plantea el uso potencial de los MAAs como moléculas fotoprotectoras a incluir en las cremas solares de uso humano; junto a una elevada capacidad de absorción, una buena molécula fotoprotectora debe caracterizarse además por poseer una gran estabilidad. Por lo tanto, también se analizará el efecto de la temperatura y del pH en la estabilidad de las moléculas de MAAs.

Por otro lado se evaluará la fluorescencia de la molécula una vez excitada alrededor de su máximo de absorción y la posibilidad de localizar los MAAs en las células empleando la técnica de epifluorescencia. Además se analizará en un estudio preliminar la ruta biosintética de los MAAs en el alga roja *P. umbilicalis*, empleando un inhibidor de la ruta del ácido chiquímico, el glifosato (Herrmann y Weaver, 1999).

I.1. Extracción e identificación de los MAAs.

Hay gran cantidad de trabajos en los que se analizan e identifican los MAAs de distintas macroalgas y otros organismos marinos, en esta variedad de artículos se emplean a su vez una variedad de métodos de extracción y análisis que en la mayoría de los casos derivan de unos pocos métodos a los que se le aplican ciertas modificaciones.

Se ensayaron distintas opciones para fijar el método de extracción e identificación de los MAAs. En la extracción se emplearon distintas concentraciones de los solventes, distintas temperaturas y tiempos para la extracción, además de algunos métodos que facilitasen la extracción de los MAAs de las células. En la identificación se analizó el uso de distintas fases móviles y distintos flujos de elución, además de dos tipos de columnas cromatográficas.

I.1.1. Extracción de los MAAs:

Se eligieron distintas especies de algas rojas sobre las que realizar las pruebas de extracción, el motivo de emplear algas de este grupo fueron los datos preliminares encontrados, en los que se indicaba que este grupo de algas contenía las mayores concentraciones de MAAs. Concretamente se emplearon talos de *Porphyra leucosticta*, *Gelidium latifolium* y *Corallina elongata*; el lugar de recolección para la primera especie fue Lagos (Málaga) y el de las dos últimas fue la Isla de las Palomas (Tarifa, Cádiz). Los ejemplares se conservaron desde el momento de su recolección en seco. Se seleccionó *P. leucosticta* debido a que se apuntaba que

este género presentaba una alta concentración de MAAs, además contenía entre 4 y 5 tipos distintos de MAAs. Debido a que esta especie contiene una sola capa de células y su talo es plano, se decidió analizar además *G. latifolium* y *C. elongata*, especies más rígidas y ramificadas, para verificar que la extracción era correcta también en éstas, además *C. elongata* posee ejes calcificados por lo que se podría pensar que la extracción de MAAs se vería dificultada.

Como se ha apuntado con anterioridad, en la literatura se encontraron distintos métodos para la extracción de los MAAs, en todos ellos se empleaba etanol o, más común y recientemente, metanol, como disolvente orgánico. Sin embargo, no en todos ellos la proporción metanol:agua era la misma, se había empleado metanol en concentraciones de entre el 20% al 100% (Karsten *et al.*, 1998a; Carroll y Shick 1996; Banaszak *et al.*, 1998). Por ello, se hizo un barrido para analizar en cuál de ellas la extracción era mejor. Se emplearon concentraciones del 20%, 50%, 75% y 100% de metanol (v:v) para extraer los MAAs en cada una de las especies de algas rojas enumeradas anteriormente. Se analizó qué concentración de metanol proporcionaba una mejor extracción del contenido de MAAs. La extracción se llevó a cabo durante 2 horas en un baño a 45° C (tabla I.1).

Tabla I.1. Concentración de MAAs (mg·g⁻¹PS) en *P. leucosticta*, *G. latifolium* y *C. elongata* empleando como solvente para la extracción 20%, 50%, 75% y 100% de metanol (v:v).

	20% metanol	50% metanol	75% metanol	100% metanol
<i>P. leucosticta</i>	6.9±0.31	5.5±0.35	4.9±0.42	2.1±0.29
<i>G. latifolium</i>	2.34±0.15	1.95±0.19	1.51±0.21	0.78±0.18
<i>C. elongata</i>	1.40±0.10	1.15±0.12	0.89±0.11	0.45±0.14

Otro aspecto que se tuvo en cuenta fue la temperatura a la que realizar la extracción, Neale y colaboradores (1998) realizaron la extracción a 4° C, sin embargo, en los trabajos de Karsten y colaboradores (1998a), se empleaba una temperatura de extracción de 45° C. Ambas temperaturas fueron ensayadas realizando la extracción con metanol 20% (v:v) durante 2 horas (tabla I.2).

Tabla I.2. Concentración de MAAs (mg·g⁻¹PS) en *P. leucosticta*, *G. latifolium* y *C. elongata* realizando la extracción a 4° C y a 45° C empleando como solvente para la extracción 20% de metanol (v:v) durante 2 horas.

	4° C	45° C
<i>P. leucosticta</i>	4.2±0.35	6.9±0.31
<i>G. latifolium</i>	1.51±0.24	2.34±0.15
<i>C. elongata</i>	0.94±0.14	1.40±0.10

El tiempo de extracción fue otra de las variables que se tuvo en cuenta, previamente se habían empleado tiempos desde 30 minutos hasta 72 horas (Shick *et al.*, 1992, Bandaranayake y Rocher, 1999). Se ensayaron tiempos de extracción de 2 horas, 12 horas, 24 horas y 48 horas, empleando metanol 20% a una temperatura de 45° C (tabla I.3).

Tabla I.3. Concentración de MAAs ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$) en *P. leucosticta*, *G. latifolium* y *C. elongata* empleando como solvente para la extracción 20% de metanol (v:v) a una temperatura de 45° C y con tiempos de extracción de 2, 12, 24 y 48 horas.

	2 horas	12 horas	24 horas	48 horas
<i>P. leucosticta</i>	6.9±0.31	7.1±0.24	6.7±0.34	7.21±0.29
<i>G. latifolium</i>	2.34±0.15	2.28±0.22	2.51±0.18	2.33±0.25
<i>C. elongata</i>	1.40±0.10	1.35±0.15	1.45±0.20	1.39±0.18

También se abordó la posibilidad de aplicar ultrasonido a las muestras durante unos minutos antes de la extracción, para facilitar la extracción gracias a la ruptura de las células. Por último, también se probó el macerado del extracto de metanol con el talo algal en un mortero y el realizar 3 extracciones consecutivas. No se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de MAAs entre las muestras tras la maceración que sin ser maceradas, lo mismo ocurría con la aplicación del ultrasonido y con las extracciones sucesivas (datos no mostrados). Por lo tanto, se decidió obviar estos pasos que complicarían el proceso de extracción.

Del análisis de todas las opciones de extracción detalladas con anterioridad, se estandarizó el método en función a aquellas opciones que brindaron mejores resultados, en términos de una mayor eficacia de extracción. A partir de este momento se emplearía metanol al 20%; ya que con el empleo de una concentración mayor de metanol para realizar la extracción de MAAs, además de que la extracción era menor, se extraía también gran cantidad de clorofila que podría interferir en el análisis afectando a la columna cromatográfica, que era de uso exclusivo para el análisis de MAAs. Y sin necesidad de aplicar ultrasonido, ni macerar, ni de realizar extracciones consecutivas, la extracción tendría lugar en un baño a 45° C durante un periodo de 2 horas.

Tartarotti y Sommaruga (2002) analizaron distintos métodos de extracción de MAAs en algas y zooplancton. Analizaron el método de extracción para *Porphyra* sp. y llegaron a similares conclusiones que las obtenidas en este trabajo; empleando una concentración alta de metanol y una baja temperatura de extracción se subestimaban las concentraciones de MAAs. Sin embargo, estos autores determinaron que después de 6 minutos de ultrasonidos la extracción era significativamente superior, al contrario de los resultados obtenidos en este trabajo.

1.1.2. Identificación de los MAAs:

Transcurridas las 2 horas de extracción, las muestras se llevaron a sequedad, gracias al empleo de un concentrador centrífugo a vacío (Jouan RC 10-09, Cedex, Francia), y posteriormente, se resuspendían en metanol 100% (grado para cromatografía líquida), de este modo, se conseguiría retirar del extracto otros compuestos que no se solubilizaban en metanol, como proteínas y sales y también restos de membranas y tejidos, con el fin de evitar que se introdujesen en la columna de separación del equipo de HPLC pudiendo dañarla y/o saturarla más rápidamente.

Para la separación y cuantificación de los MAAs, los extractos resuspendidos en metanol 100% se inyectaron en la columna de un equipo de HPLC de fase reversa y fueron analizados isocráticamente.

En esta fase de análisis también se analizaron varias opciones, el tipo de columna para la separación, la fase móvil a emplear y el flujo de la misma.

Se probaron dos tipos de columnas para la separación de los MAAs: una C₈ (Sphereclone™, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania) con un material de relleno de silica de 5 µm de diámetro, la superficie del silica estaba derivatizada con una cadena alifática de 8 átomos de carbono (octadecyl silano), el tamaño de dicha columna fue de 250x4 mm; y una columna C₁₈ (Symmetry®, Waters, EE. UU.) empaquetada con un relleno de silica de 5 µm de diámetro derivatizado con una cadena alifática de 18 carbonos (octyl silano), el tamaño de dicha columna fue de 150x4.6 mm. La primera de ellas fue empleada en el trabajo de Tartarotti y Sommaruga (2002) y la segunda fue empleada por el grupo de la Universidad de Erlangen (Alemania) para la separación de MAAs (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1>), y también se empleó en el trabajo de Oren (1997), entre otros.

La hidrofobicidad de la columna aumenta fundamentalmente con el tamaño de la cadena alifática, es decir, la columna C₁₈ presentaba una mayor hidrofobicidad que la C₈. El silanol (SiOH) interacciona con la parte polar del soluto, y la actividad de este grupo era mayor en la C₈ que en la C₁₈. Pero sólo con el contenido de carbono no se tiene una verdadera medida de la retención y selectividad de la columna. Otra variable más importante aún a tener en cuenta, en este sentido, es el tamaño de los poros, normalmente con un tamaño menor de poro la columna posee una mayor capacidad para la separación, siempre que las moléculas sean lo suficientemente pequeñas para penetrar en los pequeños poros. El tamaño de poro para la columna C₈ fue de 80 Å y el tamaño de poro para la C₁₈ fue de 90 Å. Por lo tanto, teniendo en cuenta que la columna C₈ presentaba una menor hidrofobicidad y que además el tamaño de poro

era menor, sería ésta la que teóricamente nos proporcionaría mejores resultados. Se corroboró tras analizar una misma muestra con ambas columnas y los resultados se reflejan en las figuras I.1 y I.2.

La eficiencia de la columna es directamente proporcional a la longitud de la misma e inversamente proporcional al tamaño de las partículas. En nuestro caso, al ser el tamaño de las partículas el mismo en ambos casos, se supondría que la mayor eficiencia en el análisis la se obtendría con la columna C₈ que era la de mayor longitud. Para probar esta asunción, se analizaron en ambas columnas cromatográficas dos extractos de MAAs obtenidos de dos de los pasos de purificación que se detallan en el apartado I.2., concretamente después del lavado del carbono activado (extracto A) y tras la elución de la columna Dowex (extracto B). Ambos extractos se analizaron con dos fases móviles distintas, 2.5% y 25% de metanol, siempre con 0.1% de ácido acético (tabla I.4).

Tabla I.4. Área de los picos de shinorine y porphyrin-334 ($\mu\text{V}\cdot\text{seg}$), empleando como fase móvil en el análisis con el equipo de HPLC un 2.5% y un 25% de metanol, ambos con 0.1% de ácido acético. Y como fase estacionaria las columnas C₈ y C₁₈.

2.5%	A		B		25%	A		B	
	Áreas SH/PR		Áreas SH/PR			SH+PR		SH+PR	
C ₈	304.608	2.667.191	467.269	3.832.591	C ₈	3.038.273	4.380.902		
C ₁₈	289.020	2.629.255	456.104	3.747.348	C ₁₈	2.999.572	4.360.950		

Aunque las diferencias no eran muy grandes, en el mayor de los casos de 85.000 $\mu\text{V}\cdot\text{seg}$, se corrobora que con la columna C₈ se obtiene una mayor eficiencia en el análisis.

El volumen de la columna, que viene dado por la longitud y el diámetro de la misma, 3.142 mL para la C₈ y 2.49 mL para la C₁₈, es muy importante para la sensibilidad del análisis, las columnas con un volumen menor dan una mayor sensibilidad que las columnas con un mayor volumen. Pero en nuestro caso al tener unas concentraciones de MAAs altas se podrían usar columnas con una menor sensibilidad por estar muy por encima del límite de detección del equipo.

Para un mismo flujo y tipo de fase móvil, se inyectaron varios extractos con MAAs en el equipo de HPLC Waters 600, empleando los dos tipos de columnas cromatográficas indicados anteriormente. Los resultados se muestran en los cromatogramas adjuntos, los MAAs, que eluían de mayor a menor polaridad, eran menos retenidos en la columna C₁₈ (fase estacionaria) y por lo tanto eluían antes que en la columna C₈, en la que los tiempos de retención fueron superiores para cada uno de los tipos de MAAs. Esto ocurría únicamente cuando la proporción de metanol en la fase móvil era del 25%. Debido a que la separación de los picos era menor

empleando la columna C₁₈, y al ser la shinorine y la porphyra-334 de una polaridad similar, los picos para ambos aparecían solapados en el cromatograma. Incrementando la polaridad de la fase móvil se conseguiría una mejor separación, debido a que de este modo se incrementarían los tiempos de retención (figuras I.1 y I.2).

Se ensayaron distintas polaridades de la fase móvil, 25%, 5% y 2.5% de metanol. Junto al metanol en todos los casos se añadía un 0.1% de ácido acético, al tener los MAAs en un medio ligeramente ácido se conseguiría que las moléculas no estuviesen cargadas iónicamente. Al disminuir la polaridad se observó que la separación de shinorine y porphyra-334 no fue correcta con ninguna de las columnas cromatográficas. Sin embargo, con el empleo de un 2.5% de metanol en la fase móvil se obtuvieron los mejores resultados, la separación de estos dos picos fue idónea con ambas columnas (tabla I.5).

Tabla I.5. Tiempo de retención de los picos de shinorine y porphyra-334 (minutos), empleando como fase móvil en el análisis con el equipo de HPLC un 2.5%, 5% y un 25% de metanol, siempre con 0.1% de ácido acético. Y como fase estacionaria las columnas C₈ y C₁₈. Flujo: 0.7 mL·min⁻¹.

Shinorine	C ₈	C ₁₈
2.5% metanol	3.5	5.1
5% metanol	3	4.6
25% metanol	2.8	2.4

Porphyra-334	C ₈	C ₁₈
2.5% metanol	4.5	8.2
5% metanol	3.4	5.3
25% metanol	3	2.4

Analizando los resultados obtenidos hasta este momento se decidió emplear la columna C₈ con una fase móvil del 2.5% de metanol (figura I.3). Se descartó el uso de la C₁₈ porque aunque con un 2.5% de metanol la separación de shinorine y la porphyra-334 era correcta, los tiempos de retención fueron muy elevados, casi el doble que empleando la columna C₈. Por lo tanto, para la elución de todos los MAAs de un solo extracto se necesitaría mucho tiempo. Además de necesitar mucho más tiempo en el análisis, se necesitaría más cantidad de fase móvil y más horas de funcionamiento del equipo de HPLC, con el consecuente gasto energético y desgaste de la lámpara UV del detector.

El flujo para la fase móvil con el que se obtenía una mejor separación de los picos, fue de $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, aunque también se probaron otros flujos que se citaban en la literatura, $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

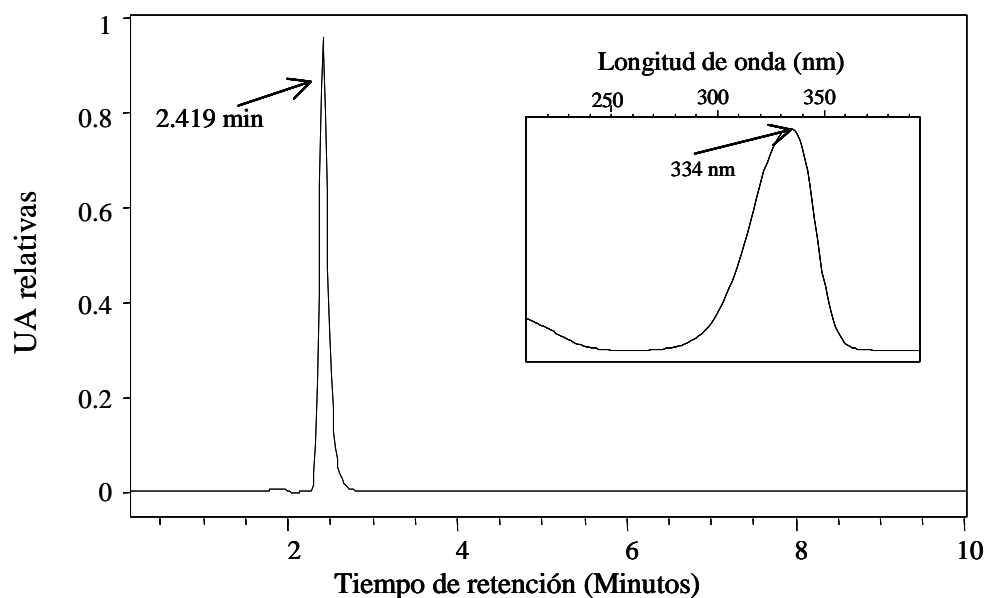


Figura I.1. Cromatograma y espectro de absorción de los picos de shinorine y porphyra-334, se observa una mala separación de ambos, el pico se corresponde con la suma de ambos MAAs. Columna C_{18} , fase móvil de 25% metanol (v:v) y 0.1% ácido acético y flujo de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

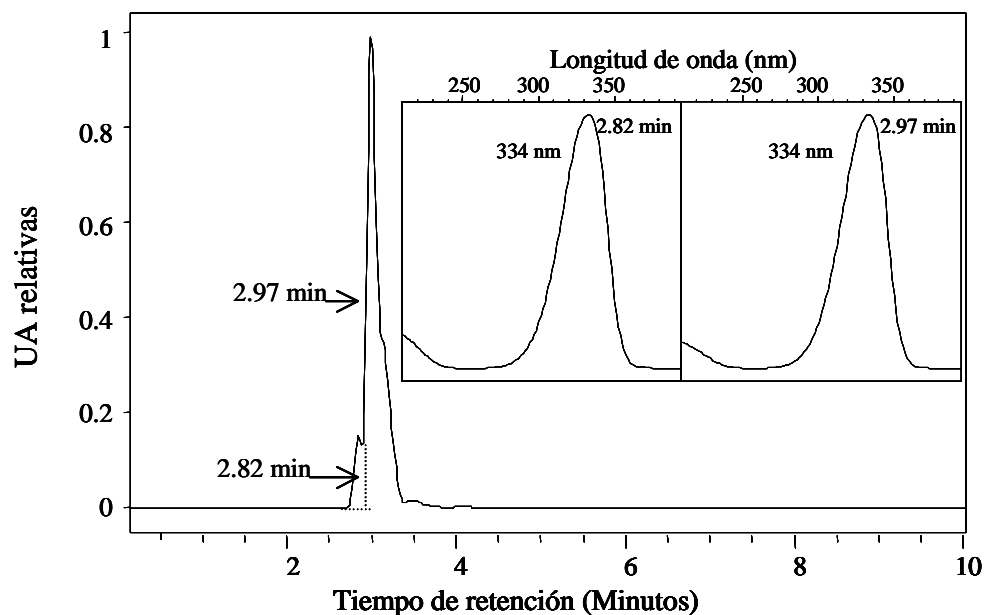


Figura I.2. Cromatograma y espectro de absorción de los picos de shinorine y porphyra-334, mejor separación, aunque no óptima respecto a la figura I.1. Columna C_8 , fase móvil de 25% metanol (v:v) y 0.1% ácido acético y flujo de $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

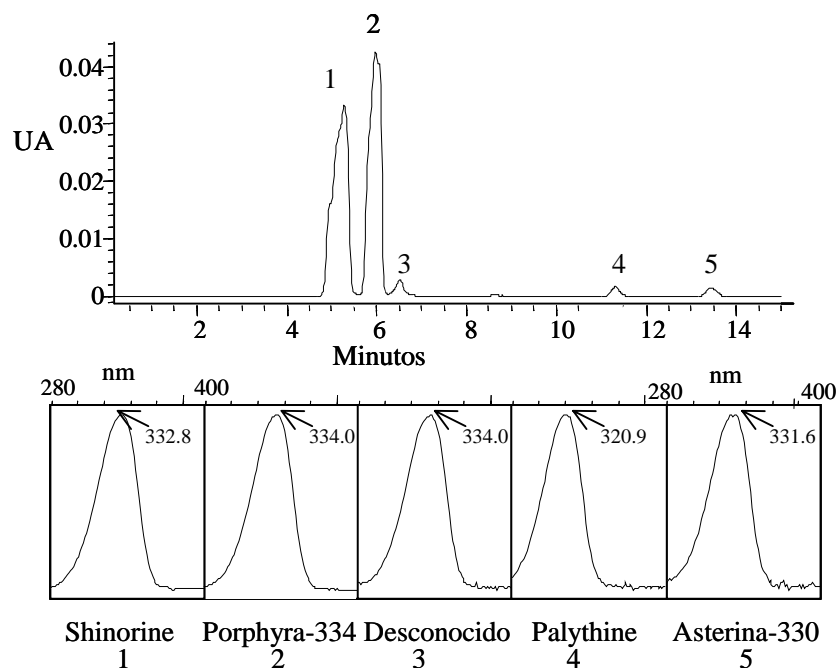


Figura I.3. Cromatograma y espectro de absorción de distintos MAAs (shinorine, porphyra-334, palythine y asterina-330) de un extracto de *P. leucosticta*. Columna C₈, fase móvil de 2.5% metanol (v:v) y 0.1% ácido acético y flujo de 0.5 mL·min⁻¹

I.2. Purificación de un extracto de MAAs.

Para obtener un extracto purificado de MAAs, concretamente un extracto de porphyra-334 y shinorine, se extrajeron los MAAs de 25 gramos de *P. leucosticta* empleando 1 L de metanol al 20% en un baño a 45° C con agitación constante. La extracción transcurrió durante 24 horas. Pasado este tiempo se filtró el extracto, se calculó la concentración y se identificaron los picos de MAAs en el equipo de HPLC.

En el volumen de 1 L se obtuvieron 58 mg de MAAs, el 85% era porphyra-334 y aproximadamente el 15% era shinorine, se observaron también trazas de palythine y asterina-330 que no llegaron a un 5% del total de concentración.

El siguiente paso fue la concentración del extracto mediante el empleo de un concentrador centrífugo a vacío, hasta aproximadamente 100 mL del extracto en agua. Este volumen se pasó por carbono activado (Merck, Alemania) agitando la mezcla en un matraz Erlenmeyer durante 5 ó 10 minutos (figura I.4). La cantidad óptima de carbono activado necesario para obtener una buena eficiencia en el proceso, es decir, para que los MAAs se adsorbieran en un gran porcentaje al carbono activado fue de 1g de carbono activado por cada 10g de MAAs. Una vez transcurrido el tiempo indicado, se centrifugaba y se analizaban los restos de MAAs que quedaban en el extracto acuoso. Se confirmó que un 95% de los MAAs se adsorbieron al

carbono y en el volumen de agua estaban presentes otros muchos compuestos que se desecharon.

Nos quedamos con el precipitado, donde se había adsorbido la mayor parte de los MAAs y se lavó el carbono activado con metanol al 50% para que liberara las moléculas de MAAs. Se lavaba dos veces sucesivas empleando 500 mL de metanol 50% en ambos casos. La eficacia de este paso fue aproximadamente del 80%, es decir, se perdía aproximadamente un 20% de MAAs que no se conseguía liberar del carbono activado. Se volvía a concentrar el volumen de metanol al 50%, empleando el concentrador centrífugo a vacío, hasta quedarnos con unos 100 ó 200 mL (extracto acuoso).

El siguiente paso en la purificación de MAAs consistió en pasar este nuevo extracto acuoso por una columna que se empaquetó con una resina de intercambio catiónico fuertemente acídica Dowex 50Wx8-100 (Sigma-Aldrich Chemie, GmbH, Alemania), la forma iónica de la resina es el protón de hidrógeno, la columna se preparaba con agua destilada (figura I.4). Una vez que se pasaba el extracto, aproximadamente el 100% de los MAAs quedaban adsorbidos en la columna, para recuperarlos de nuevo se eluía la misma con agua destilada. No hizo falta eluir la columna con un medio ácido o básico, ya que las moléculas de MAAs están cargadas muy débilmente y resultó sencillo extraer los MAAs adsorbidos empleando un medio neutro, como es el agua destilada. Se iban recogiendo alícuotas de 50 mL tras pasar por la columna, hasta llegar a un punto en el que se recuperaba de nuevo un 80% de lo que se puso en un principio en esta columna. Se desechaban las primeras alícuotas que apenas contenían MAAs y al final del proceso se unieron todos los extractos que presentaron una concentración considerable de MAAs y se concentró este nuevo extracto hasta un volumen de unos 100 mL.

Tras el desarrollo de estos pasos se analizó el extracto resultante en términos de MAAs y se comprobó que la mayoría eran moléculas de porphyra-334, aunque también se encontró una pequeña proporción de shinorine. Durante el proceso se eliminaron gran cantidad de macromoléculas y pigmentos, entre otros compuestos (figura I.5).

Este extracto purificado de MAAs fue el que se empleó para el estudio de los distintos métodos de identificación de MAAs en un equipo de cromatografía líquida y también en el estudio de la estabilidad de estas moléculas frente a cambios de temperatura y de pH.

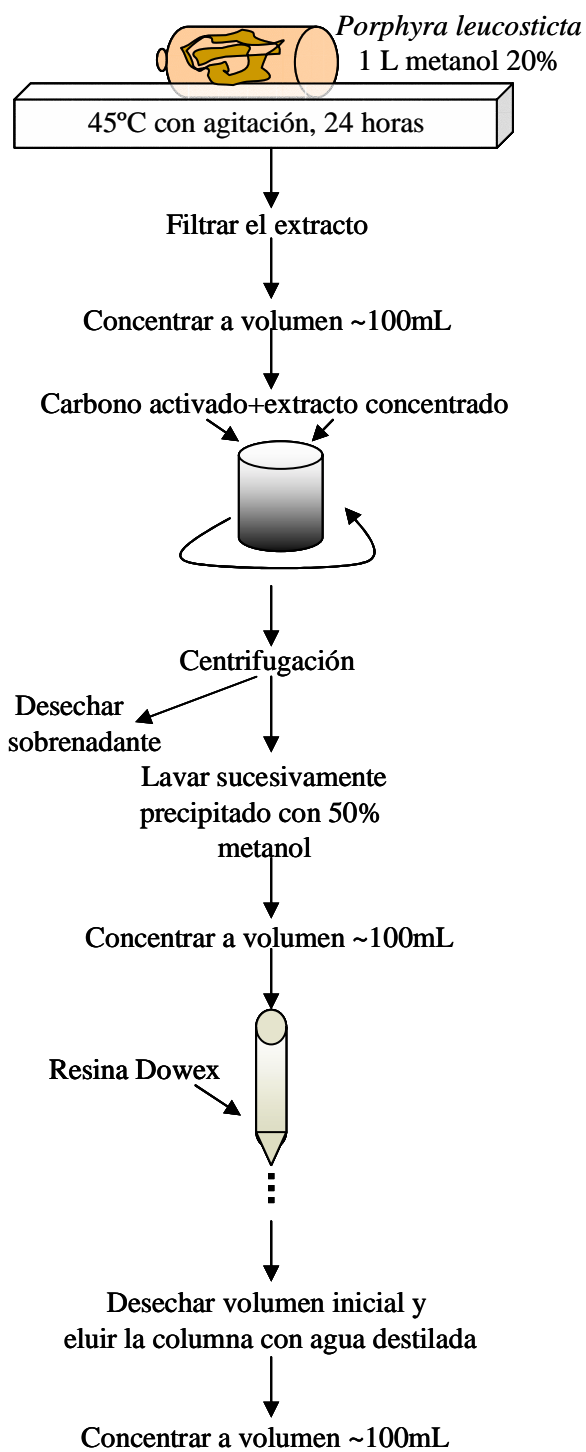


Figura I.4. Esquema del proceso de purificación de un extracto de MAAs.

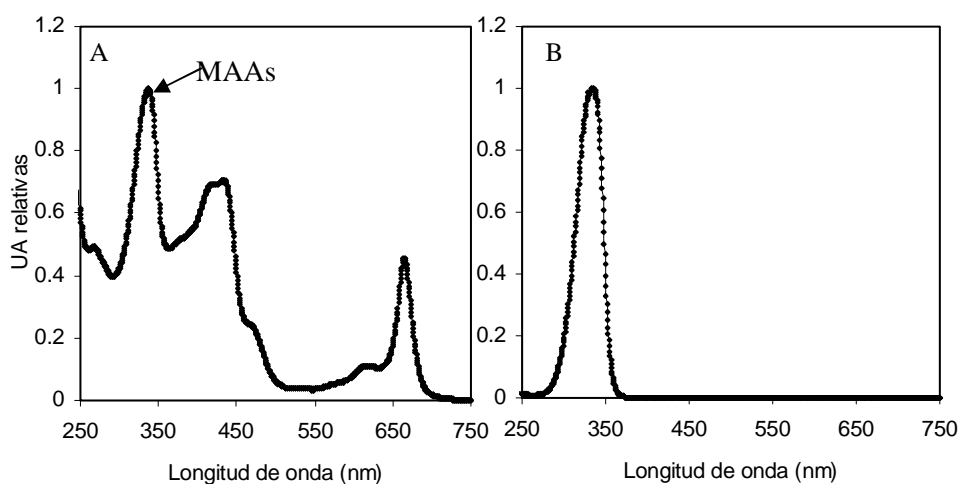


Figura I.5. Espectro de absorción de un extracto de *Porphyra leucosticta* en metanol 100% (A) y del extracto purificado de MAAs (B).

I.3. Efecto de la temperatura en la estabilidad de los MAAs.

Una molécula fotoprotectora debe ser estable frente a cambios de temperatura, para comprobar esta característica se expusieron muestras del extracto de MAAs purificado durante un periodo de 6 horas a temperaturas de 50, 70 y 100° C en tubos sellados para evitar pérdidas de volumen. Transcurrido ese tiempo se analizaron los extractos en el equipo de HPLC, y se comprobó que la concentración de los MAAs no cambió y además que los espectros de absorción de los MAAs sometidos a estas altas temperaturas eran los mismos que el extracto del inicio de la prueba (figura I.6).

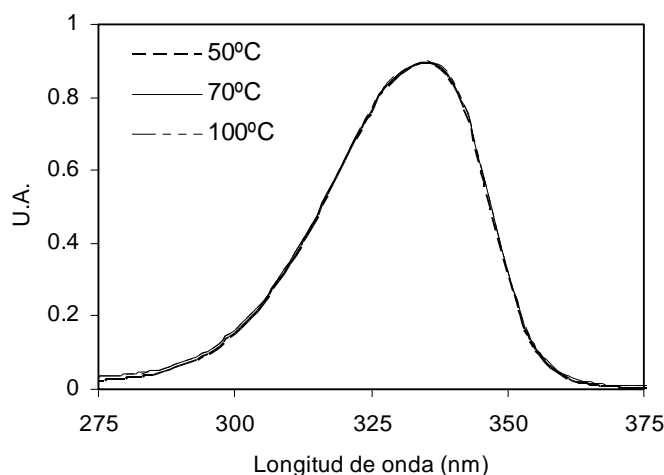


Figura I.6. Espectro de absorción de porphyra-334 en extractos acuosos después de someterlos durante 6 horas a temperaturas de 50, 70 y 100° C.

Se puede concluir, por lo tanto, que los MAAs son moléculas estables frente a cambios de temperatura, al menos a temperaturas de hasta 100° C durante periodos de tiempo cortos. Resultado similar al que obtuvieron para un extracto purificado de MAAs extraído del alga roja

Gracilaria cornea (también compuesto por porphyra-334 y/o shinorine) que permaneció invariante en términos de concentración después de 6 horas a $75\pm 2^\circ\text{C}$ (Sinha *et al.*, 2000).

I.4. Efecto del pH en la estabilidad de los MAAs.

Se tomaron muestras del extracto purificado de MAAs y se les añadió ácido clorhídrico 1M e hidróxido sódico 1M, según los casos, y en distinta cantidad para estabilizar los extractos a distintos niveles de pH, 3, 5, 7, 8.75 y 10.5. Transcurrida 1 hora se analizó el contenido de MAAs. No se observaron diferencias significativas en la concentración ni el espectro de absorción de los MAAs entre los pH analizados. Sin embargo, en un medio con pH 3 el máximo de absorción de la porphyra-334 se situó unos 4 ó 5 nm desplazado hacia la izquierda, es decir, en este caso el máximo se encontró alrededor de 330 nm (figura I.7).

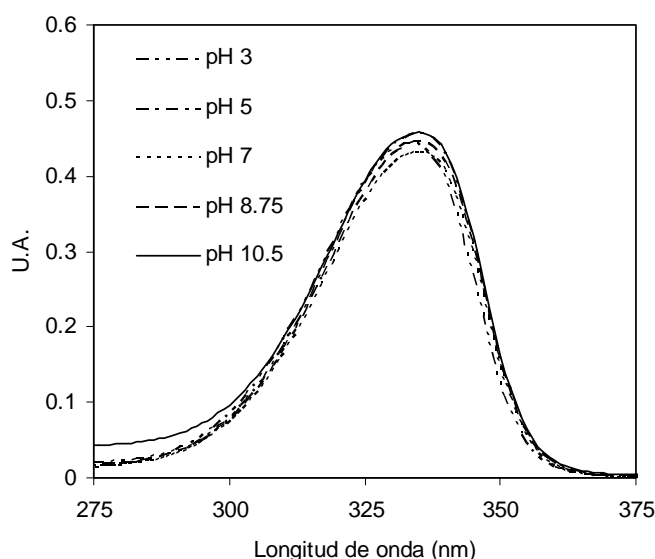


Figura I.7. Espectro de absorción de porphyra-334 en extractos acuosos con pH de 3, 5, 7, 8.75 y 10.5.

Se concluye que los MAAs, son estables frente a cambios de pH del medio en el que se encuentran. El extracto purificado de la sustancia 334 (que posteriormente se identificó como un MAA, en concreto porphyra-334) del alga roja *Porphyra yezoensis*, también mostró la misma estabilidad en medio ácido y neutro, pero sin embargo, en medio básico (pH 11) determinaron que la molécula era inestable, volviendo de nuevo e inmediatamente a su estado original cuando el medio se tornaba a pH neutro (Sivalingam *et al.*, 1976a). Y al igual que ocurría con el extracto purificado de *P. leucosticta*, estos autores determinaron que a pH 2 el máximo de absorción se desplazaba ligeramente a 329 nm (Sivalingam *et al.*, 1976a).

Con los resultados obtenidos, los MAAs superan las primeras pruebas que se les realiza a una molécula para estudiar su potencial uso como molécula fotoprotectora. A raíz de estos resultados se avanzará en el estudio de la acumulación de MAAs en macroalgas, con el fin de

proporcionar las condiciones en las que deberían cultivarse los talos con el fin de potenciar la acumulación de MAAs, todo ello con vistas a futuras aplicaciones de estas moléculas en fotoprotección.

I.5. Fluorescencia de porphyra-334.

Para estudiar la emisión de fluorescencia de los MAAs se empleó un espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2000 (Hitachi, Japón). Se detectó emisión de fluorescencia cuando se excitaba el extracto purificado de MAAs a 368 nm. Sin embargo, cuando se excitaba el extracto a otras longitudes de onda más próximas a las del máximo de absorción de esta molécula, no se observó emisión de fluorescencia. El solvente empleado fue metanol 100% y la concentración de este extracto fue de 2.4 mM. Se empleó una cubeta de 2 mL. El espectro de fluorescencia se caracterizó por una banda de 100 nm de ancho con un máximo de fluorescencia a 450 nm (figura I.8).

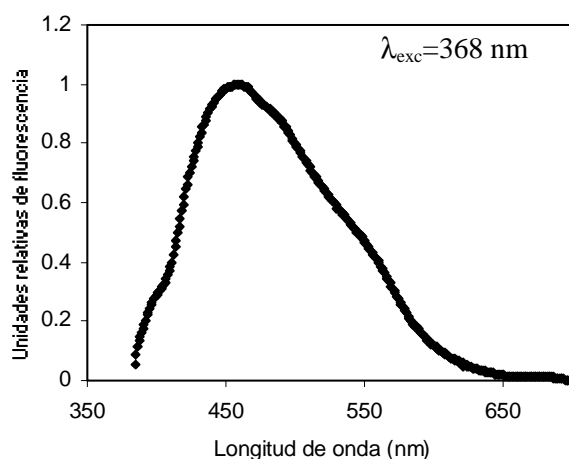


Figura I.8. Espectro de fluorescencia del extracto purificado de porphyra-334 (2.4 mM). Excitación a 368 nm.

Este resultado coincidió con aquel que obtuvieron para el extracto purificado de la sustancia 334 extraída de *P. yezoensis* al 0.43%, estos autores excitaron la molécula a 368 nm y obtuvieron un espectro de fluorescencia con un máximo de emisión a 430 nm, con un ancho de banda muy similar al que se obtuvo en este trabajo (Sivalingam *et al.*, 1976a).

Conociendo el espectro de fluorescencia para la porphyra-334 nos planteamos si sería posible localizar los MAAs en las células aprovechando esta característica. Sivalingam y colaboradores (1976b) realizaron un gradiente de sacarosa con la sustancia 334 purificada, y llegaron a la conclusión de que estas moléculas se encontraban en la fracción soluble de los cloroplastos.

Se trató de localizar los MAAs en las células de *P. leucosticta*, aprovechando que se trata de un alga laminar con una sola capa de células y con una alta concentración de MAAs. Se colocaron talos de esta alga en portaobjetos y se empleó un microscopio óptico invertido Leitz Fluovert-FU (Leitz, Wetzlar, Alemania) que llevaba acoplado un sistema de epifluorescencia. Sin embargo, la excitación de los talos no llevaba asociada la emisión de fluorescencia alrededor de 450 nm característica de los MAAs.

La imposibilidad de detectar la fluorescencia de los MAAs en las células de *P. leucosticta*, podría relacionarse con una baja emisión de fluorescencia, se necesitaría una concentración muy elevada para su detección. Por lo tanto, no sería posible su detección en las células con esta técnica, en las que se encuentran los MAAs a una menor concentración. El extracto purificado tenía una concentración de 2.4 mM, debido a que se emplearon cubetas de 2 mL, había en la cubeta 4.8 μ moles de MAAs. Partiendo de un máximo de concentración de MAAs en un talo de *P. leucosticta* de 10 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ y conociendo que la relación PF/Área ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$) es de 5.5 para un talo recolectado de su medio natural (Figueroa *et al.*, 1995a), se tienen 1.53 $\mu\text{mol MAAs}\cdot\text{cm}^{-2}$ (el peso molecular de porphyra-334 es 346.336), además como el talo posee 5684 células $\cdot\text{mm}^{-2}$ (Figueroa *et al.*, 1995a), se llegaría a $2.68\cdot 10^{-8}$ $\mu\text{mol MAAs}\cdot\text{célula}^{-1}$. Se corrobora que el contenido de MAAs en la célula es mucho menor (del orden de 10^{-8}) que el que se tenía en el extracto puro para la determinación de la fluorescencia.

Existen referencias recientes en las que se apunta a que cuando son excitadas estas moléculas la emisión de fluorescencia de la porphyra-334 (6 μM) es muy débil (Conde *et al.*, 2000) e incluso no detectable en shinorine (17 μM) (Shick *et al.*, 2000).

I.6. Biosíntesis de los MAAs en *Porphyra umbilicalis*.

I.6.1. Introducción:

La biosíntesis de los MAAs se relaciona con la ruta del ácido chiquímico, tal y como se apuntó en la introducción (apartado 1.1.2). Esta ruta une el metabolismo de carbohidratos a la biosíntesis de compuestos aromáticos, es decir, el metabolismo primario y el secundario. En una secuencia de siete pasos metabólicos, el fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-P se convierten en corismato, que es el precursor de los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) y de otros muchos metabolitos aromáticos secundarios (figura I.9). Cada uno de los intermediarios de esta ruta puede considerarse también como una rama de compuestos que pueden servir como sustratos de otras rutas metabólicas. Se ha descrito que la RUV deriva las sustancias sintetizadas en el metabolismo primario hacia el secundario, observaron la inducción de la codificación de ARN_m para ciertas enzimas que proporcionan los intermediarios para la síntesis de metabolitos secundarios (entre ellas la DAHP sintasa, primera enzima de la ruta del

ácido chiquímico), concretamente estudiaron la inducción de la síntesis de flavonoides en perejil (Logemann *et al.*, 2000).

El glifosato (N-(fosfonometil)-gly) es un herbicida que actúa principalmente inhibiendo la penúltima enzima de la ruta del ácido chiquímico, la EPSP sintasa (5-enolpiruvilshikimate-3-P sintasa) (Steinrücken y Amrhein, 1980). Pero el glifosato también puede inhibir otras enzimas de la ruta del ácido chiquímico debido a sus propiedades quelantes, estas otras enzimas que necesitan cationes para ser activas son, la DAHP sintasa (1ª enzima de la ruta) y la deshidroquinato sintasa (2ª enzima de la ruta) (Herrmann y Weaver, 1999) (figura I.9). Se ha descrito que el glifosato también puede inhibir o reprimir la acción de otras dos enzimas involucradas en otros pasos de la síntesis de los aminoácidos aromáticos, la corismato mutasa y la prefrenato hidratasa (Cox, 1995a). De este modo, el proceso mediante el que se produce la clorosis y posterior muerte de la planta derivaría de la falta de aminoácidos aromáticos necesarios para la síntesis de proteínas; además de que estos aminoácidos son los precursores de lípidos y flavonoides, entre otros compuestos.

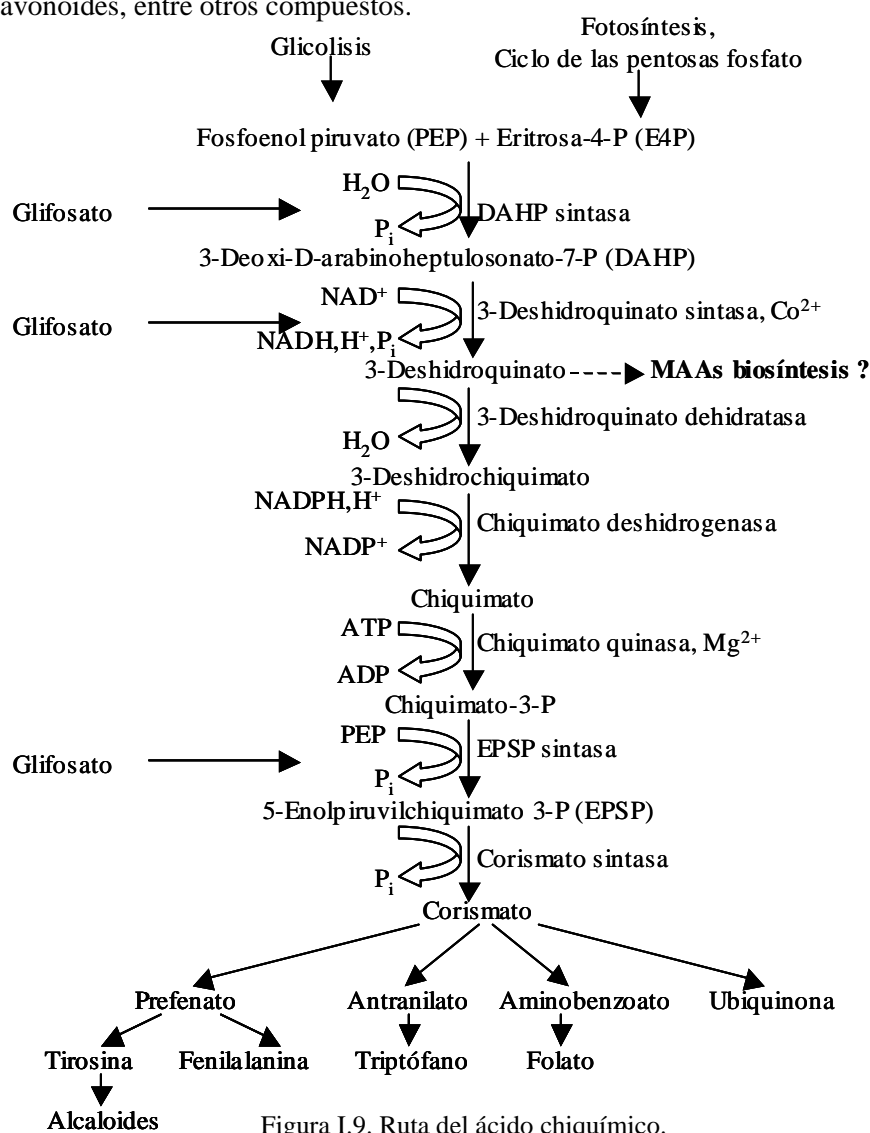


Figura I.9. Ruta del ácido chiquímico.

Pero también se ha descrito que la acción herbicida del glifosato puede localizarse a nivel de otras enzimas no relacionadas con la ruta del ácido chiquímico. En caña de azúcar se ha observado que reduce la actividad de una de las enzimas involucradas en el metabolismo del azúcar, la ácido invertasa. En animales y humanos también afecta a sistemas enzimáticos. En ratas, cuando se les inyectó glifosato en el abdomen, disminuyó la actividad de dos enzimas detoxificantes, el citocromo P-450 y una monooxigenasa; también disminuyó la actividad intestinal de otra enzima detoxificante, la aril hidrocarbano hidroxilasa (Cox, 1995b).

Se asume que a partir del 3-deshidroquinato mediante una serie de reacciones se llega a la molécula precursora de los MAAs, el gadusol o deoxigadusol (Favre-Bonvin *et al.*, 1987). Con la adición de glicina a estas moléculas se llegaría a la mycosporine-gly (oxo-MAA monosustituído) y a partir de este MAA y con la adición de un nuevo aminoácido se sintetizarían los imino-MAAs (figura I.10). Por ejemplo, si se adicionase serina se llegaría a la shinorine y si se adicionase treonina a la porphyra-334 (MAA bisustituídos).

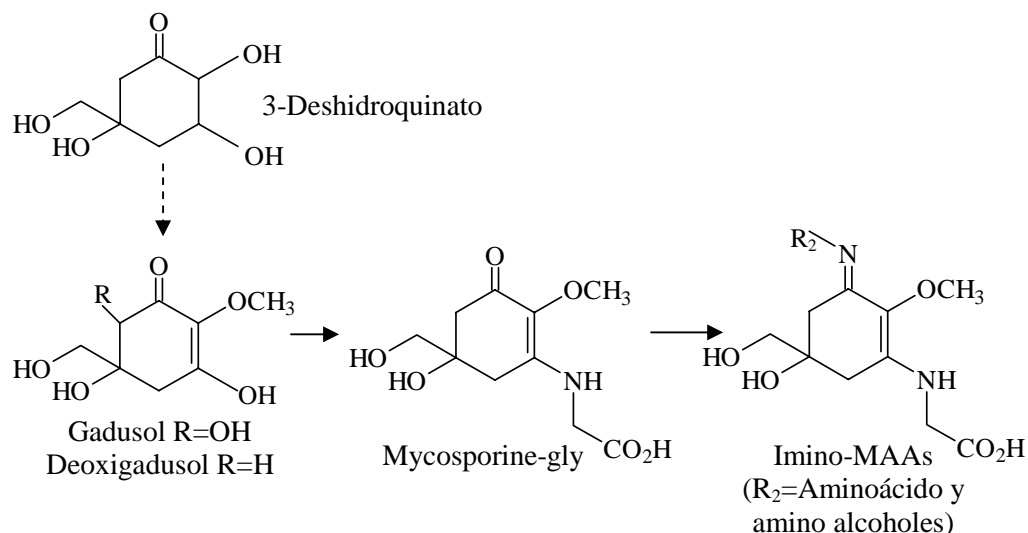


Figura I.10. Posible ruta biosintética del precursor y de los MAAs.

Basándose en los coeficientes estequiométricos y el acople con las moléculas de ATP, Haslam (1993) determinó que se necesitaban 60 equivalentes de ATP para sintetizar un mol de corismato. Si es cierto que los MAAs derivan del 3-deshidroquinato el requerimiento energético para sintetizar un mol de MAAs sería similar, aunque con el coste adicional de tener que condensar aminoácidos al anillo. Este gasto energético es aproximadamente el doble que el de la síntesis de aminoácidos no aromáticos (Shick y Dunlap, 2002). Se necesitarían 300 moles de fotones capturados en la fotosíntesis para sintetizar un mol de MAAs (Raven, 1991), es aproximadamente el mismo coste que para sintetizar clorofila y una décima parte que para producir un complejo recolector de luz, proteínas y pigmentos accesorios (Raven, 1984). Como los MAAs pueden estar entre 5 y 10 veces a mayor concentración que las moléculas de

clorofila, el coste para sintetizar MAAs sería muy elevado. Este coste anabólico haría competir con otras demandas de energía y material por parte de las células. Además para la síntesis de nuevas moléculas de MAAs se necesita nitrógeno, para lo que debe desviarse este nutriente desde el crecimiento y la reproducción. Aún así, cuando las condiciones lumínicas y nutricionales del medio en el que habita el organismo son óptimas, de modo que todo el aparato fotosintético y demás procesos bioquímicos funcionan adecuadamente, no habría ningún impedimento para la síntesis de MAAs.

1.6.2. Diseño experimental:

En un estudio preliminar sobre la posible vía de síntesis de los MAAs siguiendo la ruta del ácido chiquímico, se analizó el efecto de un inhibidor de esta ruta, el glifosato (N-(fosfonometil)-gly, Fluka Chemie GmbH, Alemania), en la acumulación de MAAs y en el metabolismo fotosintético en el alga roja *P. umbilicalis* recolectada de la isla de Helgoland el 24 de octubre de 2002. Se mantuvieron los talos durante 12 días en precultivo a 15° C en cilindros de vidrio, empleando agua de mar artificial (Marinemix hw-Professional) a 35‰ con adición de fosfato (10 µM) y sin nitrógeno, con burbujeo de CO₂ constante y a 40 µmol·m⁻²·s⁻¹ de radiación PAR (lámparas fluorescentes Osram) con un fotoperiodo de 16h luz:8h oscuridad. Se cambió el medio cada 6 días durante el precultivo. El experimento se llevó a cabo durante 7 días en recipientes de vidrio PYREX de 1 litro en la cámara de cultivo a 15° C bajo un fotoperiodo de 16:8 y con una irradiancia de 150 µmol·m⁻²·s⁻¹ de PAR, 13 W·m⁻² de UVA y 0.6 W·m⁻² de UVB. La radiación PAR se consiguió con lámparas fluorescentes Osram y la RUV se consiguió empleando 2 lámparas Q-Panel. La concentración de amonio durante el experimento fue de 300 µM. Se cultivaron los talos en cuatro tratamientos distintos, que se diferenciaron únicamente en la concentración de glifosato, 0 µM, 500 µM, 1000 µM y 1500 µM. Esta última concentración resultó letal en aproximadamente un día de experimentación (figura I.11.B). Se cambió el medio, renovando el contenido de glifosato y amonio a los 3 días de cultivo. Se tomaron medidas, al iniciar el experimento y tras los 7 días de experimentación, del rendimiento cuántico óptimo y curvas TTE-E (Diving-PAM), pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y ficobiliproteínas), proteínas solubles, aminoácidos libres y MAAs (figura I.11.A). Se analizaron, con el fin de obtener información sobre los mecanismos de acción del herbicida glifosato, para estimar la evolución de los procesos fotosintéticos y de las posibles vías de utilización del nitrógeno inorgánico.

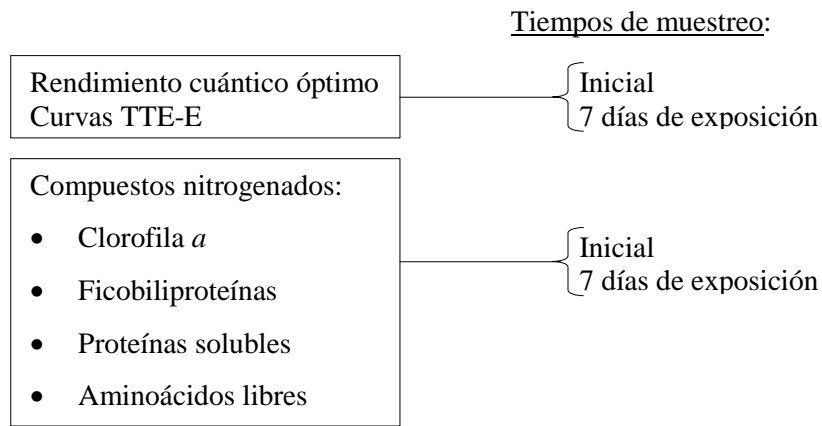


Figura I.11.A. Variables medidas y tiempos de muestreo.

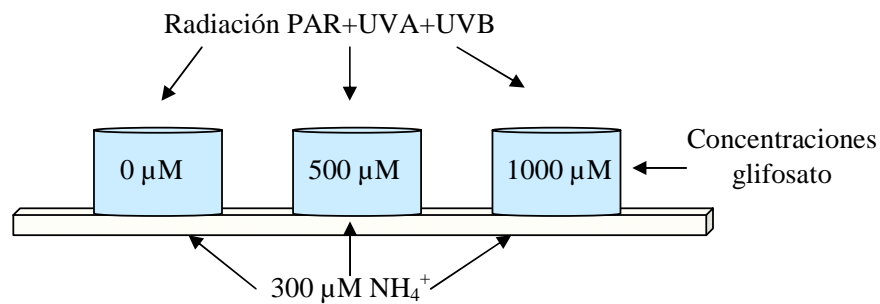


Figura I.11.B. Esquema del diseño experimental.

1.6.3. Resultados:

Respuesta fotosintética:

Se produjo una caída significativa del rendimiento cuántico óptimo después de los 7 días de cultivo en todos los tratamientos respecto al inicial, la caída fue de igual magnitud en los tratamientos de 0 y 500 µM de glifosato (23% del inicial) y mayor en el tratamiento de 1000 µM de glifosato (74% del inicial) ($p < 0.05$) (figura I.12).

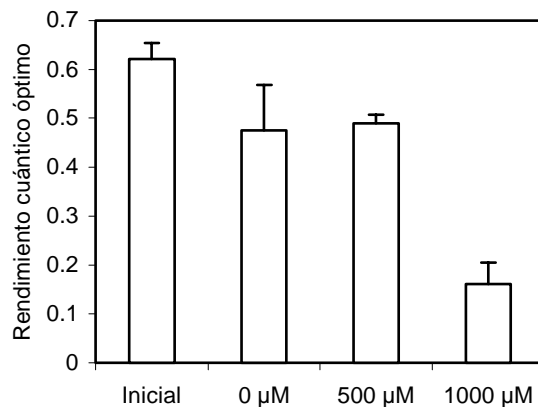


Figura I.12. Rendimiento cuántico óptimo al inicio y después de 7 días de cultivo en 3 concentraciones de glifosato (0, 500 y 1000 µM) en *P. umbilicalis*.

Tabla I.6. Ajuste de las curvas tasa de transporte electrónico vs irradiancia (TTE-E). TTE_{\max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y pendiente inicial ($\mu\text{mol e}^{-}\cdot(\mu\text{mol fotones})^{-1}$).

	TTE_{\max}	Pendiente inicial
Inicial	37.5±3.7	0.11±0.03
0 μM glifosato	36.0±5.0	0.12±0.03
500 μM glifosato	34.1±6.6	0.12±0.04
1000 μM glifosato	10.9±1.3	0.03±0.007

En los tratamientos de 0 y 500 μM de glifosato no se detectaron diferencias significativas a lo largo del tiempo de experimentación ni en el valor de TTE_{\max} ni en la pendiente inicial de la curva TTE-E ($p>0.05$). Sin embargo, en el tratamiento con una concentración de glifosato de 1000 μM se detectó una caída significativa de ambos parámetros ($p<0.05$). Fijando el tiempo, a los 7 días de cultivo el tratamiento con la concentración mayor de inhibidor presentó un valor para la TTE_{\max} y para la pendiente inicial de la curva TTE-E inferior significativamente que en los otros dos tratamientos ($p<0.05$) (tabla I.6).

Contenido pigmentario (clorofila y ficobiliproteínas):

La concentración de clorofila *a* no varió significativamente a lo largo del periodo de experimentación en ninguno de los tratamientos respecto al valor inicial ($p>0.05$) (figura I.13).

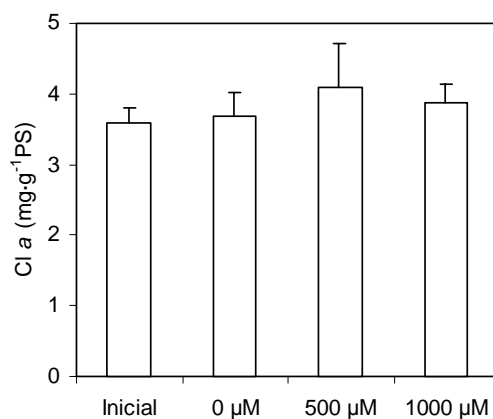


Figura I.13. Concentración de clorofila *a* al inicio y después de 7 días de cultivo en 3 concentraciones de glifosato (0, 500 y 1000 μM) en *P. umbilicalis*.

La concentración de ficocianina no varió significativamente a lo largo del experimento ($p>0.05$) (figura I.14.A), sin embargo, la de ficoeritrina se incrementó significativamente después de los 7 días de cultivo en el tratamiento de mayor concentración de glifosato (figura I.14.B). Este incremento también se reflejó en el contenido total de ficobiliproteínas y en la relación FE/FC ($p<0.05$) (datos no mostrados).

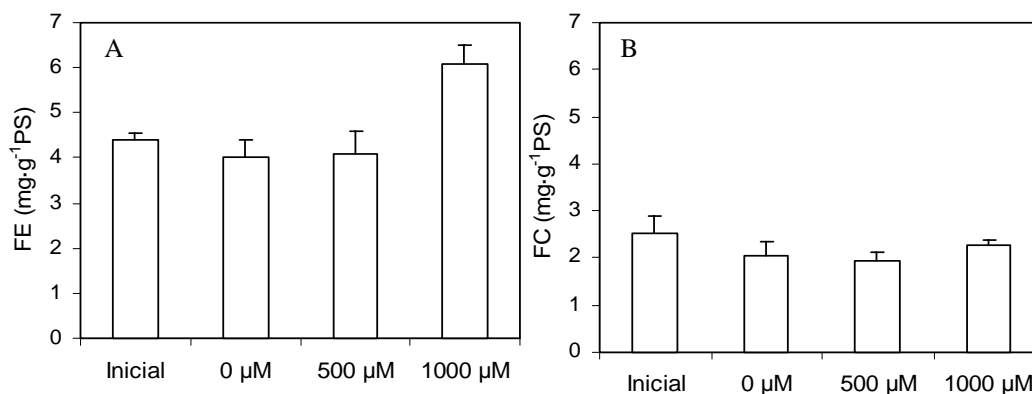


Figura I.14. Concentración de ficoeritrina (A) y ficocianina (B) al inicio y después de 7 días de cultivo en 3 concentraciones de glifosato (0, 500 y 1000 µM) en *P. umbilicalis*.

El contenido de proteínas solubles no varió significativamente a lo largo del periodo de experimentación, la concentración se mantuvo a aproximadamente 32 mg·g⁻¹PS ($p > 0.05$) (datos no mostrados).

Contenido en aminoácidos libres:

La concentración de aminoácidos libres no varió significativamente en los tratamientos de 0 y 500 µM de glifosato después del cultivo, se mantuvo en torno a 150 µmol·g⁻¹PS ($p > 0.05$). Sin embargo, en el tratamiento con la concentración mayor del inhibidor el contenido de aminoácidos cayó bruscamente hasta los 44 µmol·g⁻¹PS (caída del 71% del valor inicial) ($p < 0.05$) (figura I.16).

Se detectaron todos los aminoácidos presentes en el estándar comercial (ver material y métodos), pero en distinta proporción. El más abundante fue taurina (40%), seguido de alanina (24%) y de glutamato (13%). Estos tres aminoácidos variaron su proporción a lo largo del experimento, taurina incrementó significativamente su proporción respecto al inicial a un 44% cuando se cultivaron los talos en 500 µM de glifosato ($p < 0.05$), alanina disminuyó su proporción significativamente en 0 y 500 µM en igual magnitud (aproximadamente a un 13%) y por último, el glutamato incrementó significativamente su proporción cuando se cultivaron los talos en 0 y 500 µM de glifosato hasta un 18% aproximadamente ($p < 0.05$) (figura I.15).

Debido a que se empleó un herbicida cuyo mecanismo de acción principal es la inhibición de algunas de las enzimas de la ruta del ácido chiquímico, se analizó el comportamiento de los aminoácidos aromáticos en los distintos tratamientos, aunque su proporción relativa sea mucho inferior. Estos aminoácidos aromáticos son fenilalanina, triptófano y tirosina, los dos primeros poco solubles en agua y este último con un poco más de solubilidad. La proporción de

triptófano fue la única que varió significativamente a lo largo del experimento respecto al valor inicial, se produjo una caída significativa de la misma en todos los tratamientos ($p < 0.05$).

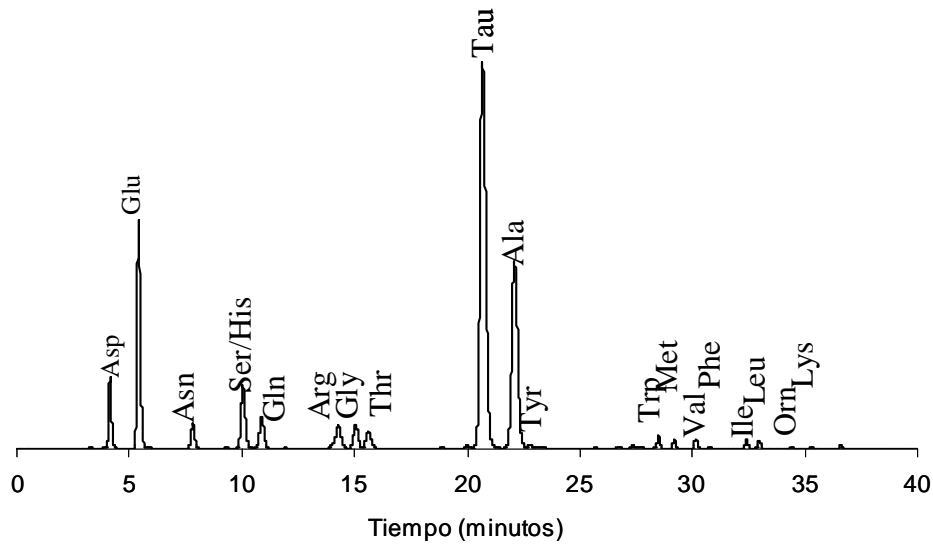


Figura I.15. Cromatograma donde se refleja la composición de aminoácidos libres al inicio del experimento en *P. umbilicalis*.

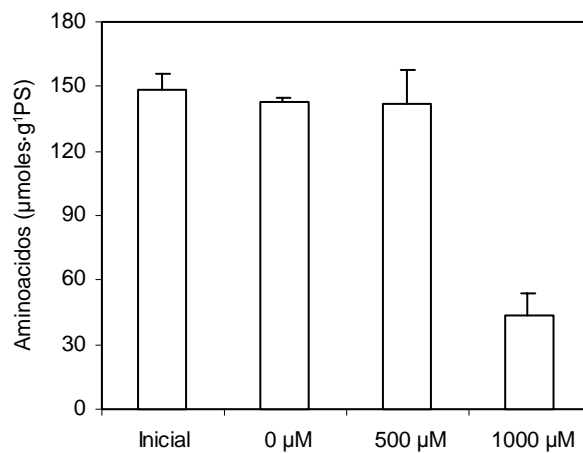


Figura I.16. Concentración del total de aminoácidos libres al inicio y tras 7 días de cultivo en 3 concentraciones de glifosato (0, 500 y 1000 µM) en *P. umbilicalis*.

Contenido de MAAs:

Se observó una caída significativa de la concentración de MAAs después de los 7 días de cultivo respecto al valor inicial en los talos que habían estado cultivados con 1000 µM de glifosato (caída del 30% del valor inicial) ($p < 0.05$) (figura I.17).

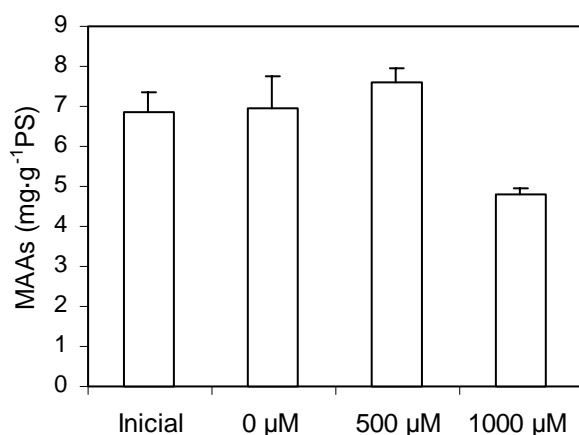


Figura I.17. Concentración de MAAs al inicio y tras 7 días de cultivo en 3 concentraciones de glifosato (0, 500 y 1000 μM) en *P. umbilicalis*.

El total de MAAs, estuvo compuesto por un 90% aproximadamente de porphyra-334 y un 10% de shinorine. Después de los 7 días de cultivo la proporción de shinorine fue ligeramente superior en 1000 μM que en ausencia del inhibidor y la de porphyra-334 fue ligeramente inferior, aproximadamente un 2% en ambos casos ($p < 0.05$).

Relación MAAs-ficobiliproteínas (MAAs/FB):

Se produjo una caída significativa respecto al valor inicial en la relación MAAs/FB después de 7 días de cultivo en 1000 μM de glifosato ($p < 0.05$) (figura I.18).

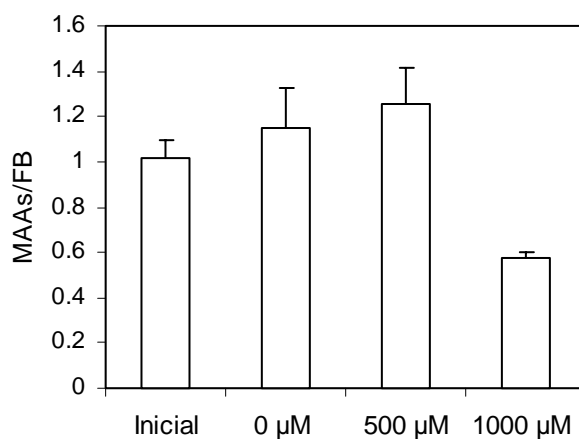


Figura I.18. Relación MAAs/FB al inicio y tras 7 días de cultivo en 3 concentraciones de glifosato (0, 500 y 1000 μM) en *P. umbilicalis*.

1.6.4. *Discusión:*

Los aminoácidos mayoritarios en *P. umbilicalis*, coincidieron con aquellos encontrados también mayoritariamente en *Laminaria japonica*, glutamato+glutamina (Glu+Gln) y alanina (Oishi y Kunisaki, 1970; Mizuta *et al.*, 1994), aunque dichos autores no identificaron grandes cantidades de taurina, pero tampoco se indicó si este aminoácido se detectaba con la técnica empleada por los mismos, ya que únicamente se reflejaba en una tabla los 8 aminoácidos mayoritarios. En *P. umbilicalis* (posteriormente descrita como *P. leucosticta*), también se encontraron grandes cantidades de Glu+Gln y de alanina, aunque al contrario que en este capítulo y al igual que en *L. japonica*, el contenido del segundo era inferior que el de los primeros. El contenido de taurina era pequeño y muy próximo a los demás aminoácidos identificados, sin embargo, encontraron grandes cantidades de cisteína sin hallar explicación para ello (Hernández *et al.*, 1993a). No se encontró ninguna explicación a las grandes cantidades de taurina (aminoácido no proteico) encontradas en *P. umbilicalis*. Aunque también fue uno de los aminoácidos más abundantes en *Platymonas subcordiformis* (Qafaiti y Stephens, 1989).

El glifosato a concentraciones de 1500 μM provocaba la muerte de los talos de *P. umbilicalis*, los talos se decoloraban y posteriormente se desintegraban en un par de días de cultivo. Una concentración de 500 μM de glifosato no afectaba a nivel fotosintético, ni al contenido pigmentario y tampoco a la acumulación de proteínas solubles, aminoácidos ni MAAs. Por lo tanto, se sugiere que esta concentración estaría por debajo de la dosis efectiva de glifosato para *P. umbilicalis*. Sin embargo, una concentración de 1000 μM , si bien no llega a ser letal para esta especie, sí le afecta, sobre todo a nivel fotosintético. La actividad fotosintética caía bruscamente y al no haber un aporte energético suficiente para mantener el metabolismo basal de los talos, parece ser que se podrían estar catabolizando los aminoácidos libres (también los MAAs) para mantener dicho metabolismo basal durante el cultivo a esa concentración de glifosato. Todo ello, a pesar de que se suplementó el medio con cloruro amónico, para evitar un déficit de este nutriente. Además se empleaba parte de la energía en la acumulación de una mayor cantidad de ficoeritrina, quizá con el fin de captar más fotones y así intentar compensar la caída en la actividad fotosintética, aunque finalmente no se consigue. Hay autores que han descrito que los talos de *P. leucosticta* con más ficobiliproteínas se veían más afectados por la RUV debido a que la absorción de esta banda era también superior que con un contenido menor de estos pigmentos (Aguilera *et al.*, 1999a).

Debido a que no se observó una caída selectiva de los aminoácidos aromáticos y MAAs en presencia de glifosato, ambos sintetizados a partir de la ruta del ácido chiquímico. Se concluye que probablemente el efecto de este herbicida en la disminución de MAAs, no sería la causa de

una inhibición específica del glifosato hacia alguna de las enzimas de la ruta del ácido chiquímico, sino quizá por la inhibición de la actividad y/o síntesis de alguna otra enzima relacionada con otro proceso bioquímico, muy probablemente a nivel fotosintético.

Portwich (2000) observó que en presencia de glifosato se reducía un 30% el contenido de MAAs en *Chlorogloeopsis* PCC 6912 bajo RUV pero no observó reducción de la concentración de MAAs en estrés salino. Concluyó que la presencia de la RUV cuando se realizan experimentos con inhibidores podría enmascarar los verdaderos resultados de la inhibición. En el trabajo de Shick y colaboradores (1999) en el que también estudiaron el efecto del glifosato en la síntesis de MAAs en el coral *S. pistillata*, no se hizo referencia al estado metabólico y funcional del mismo. En la cianobacteria *Nostoc commune* se describió que no sólo el glifosato hacía disminuir el contenido de MAAs, sino que también otros inhibidores de la fotosíntesis (DCMU) y de la síntesis de proteínas (cloranfenicol), hacían disminuir el contenido interno de MAAs en similar magnitud siempre en presencia de la RUV (Sinha *et al.*, 2003).

Se concluye que el empleo del inhibidor glifosato en *P. umbilicalis* no nos proporciona evidencias fiables de que los MAAs se sintetizan a partir de uno de los intermediarios de la ruta del ácido chiquímico en este alga, habría que recurrir a otra técnica como la incorporación de marcadores radiactivos, para verificar esta hipótesis que ya ha sido demostrada en otros organismos marinos.

CAPÍTULO II

Distribución taxonómica, espacial (latitudinal y batimétrica) y temporal (escala diaria y estacional) de los MAAs en macroalgas marinas.

II.1. Lugares de muestreo. Zonación.

Se describen a continuación los lugares en los que se recolectaron ejemplares de más de cinco especies de macroalgas marinas a las que se analizó el contenido interno de MAAs.

II.1.1. Isla de las Palomas, Tarifa (Cádiz, España).

Situada en el Estrecho de Gibraltar. La construcción de un istmo artificial permitió que lo que era antes una isla se comunique actualmente con el pueblo de Tarifa. Las coordenadas geográficas de este punto son 36°N 5°38'O. La franja litoral de la isla la constituye una plataforma rocosa con cubetas de profundidad variable (entre 20-200 cm) que quedan totalmente al descubierto en marea baja, esta plataforma puede tener un ancho de hasta 10 metros. El estrecho de Gibraltar se caracteriza por ser una zona de fuertes vientos y corrientes oceánicas, cuya temperatura del agua del mar oscila entre unos 21°C en agosto y unos 14°C en febrero, siendo su salinidad media de 36.5‰.

El punto exacto de muestreo se localizó en la parte Sur de la isla, justo frente al faro, en la plataforma de esta franja sur cabe distinguir varias regiones a simple vista según la exposición y altura de las olas, caracterizadas cada una de ellas por un grupo de macroalgas marinas.

En un transecto horizontal desde la zona más expuesta al oleaje hacia el faro se encuentran en primer lugar poblaciones de algas rojas de pequeño porte formando manchas de carácter cespitoso en una zona fundamentalmente horizontal, entre ellas principalmente *Gelidium pusillum* y *Laurencia pinnatifida* aunque también aparece *Gelidium latifolium*; bajo estas especies se pueden encontrar, formando un substrato, algunas algas verdes y algunas especies del género *Ceramium* como epífitos de las mismas. En esta misma zona de exposición pero en zonas de grietas se encuentran especies del género *Gelidium* (*G. sesquipedale* y *G. latifolium*). Y en cubetas intermareales se encuentran ejemplares de las especies *Pterocladia capillacea*, *Ceramium rubrum*, *Bryopsis plumosa*, y *Ulva* sp. Siguiendo el transecto horizontal, hay rocas emergidas de hasta 60 cm de altura donde se encuentra la especie *Fucus spiralis*. A continuación, una serie de cubetas generalmente poco profundas cuyas paredes están tapizadas principalmente por dos especies *Ulva* sp. y *Corallina elongata*, aunque también en esta zona se encuentran algunos ejemplares de *Enteromorpha* spp., *Jania rubens*, *Cystoseira compressa* y *Valonia utricularis*. En la parte del transecto más cercana al faro de la isla hay dos tipos de cubetas, ambas poco renovadas, con macroalgas características, unas de ellas con alta insolación y otras protegidas por unas rocas emergidas, las primeras de ellas están colonizadas por dos especies que se alternan en función de la estación del año, son *Chaetomorpha* sp. (en otoño e invierno) y *Cladophora* spp. (en primavera y verano), en las segundas se encuentran ejemplares

de *Laurencia papillosa*, *Dictyota dichotoma*, *Dictyopteris membranacea*, *Gracilaria foliifera* y tapizando el fondo *Corallina elongata* y *Jania rubens* escasamente pigmentadas.

II.1.2. Cabo de Gata-Níjar (Almería, España) 36°51'N 2°6'O.

Parque Natural del sureste andaluz. En la playa “El playazo” se recolectaron del intermareal rocoso ejemplares de las especies *Laurencia obtusa*, *Corallina elongata*, *Jania rubens*, *Chondracanthus* sp., *Peyssonnelia* sp., *Plocamium cartilagineum* y *Pterocladia capillacea*. Éstas habitaban con otras especies fotófilas como *Cystoseira tamariscifolia*, *Cystoseira compresa*, *Dictyota dichotoma*. Además de las praderas de la angiosperma marina *Posidonia oceanica*.

II.1.3. Las Palmas de Gran Canaria y Arucas (Gran Canaria, España) 27°56'N 15°23'O.

En las playas del norte de la Isla de Gran Canaria, concretamente en las playas de Las Canteras (Las Palmas de Gran Canaria) y Bañaderos (Arucas) se recolectaron ejemplares de las especies de algas rojas: *Asparagopsis taxiformis*, *Corallina elongata*, *Feldmannophycus rayssiae*, *Gelidium arbuscula*, *Gelidium canariense*, *Gelidium latifolium*, *Gracilaria* sp., *Grateloupia dichotoma*, *Jania rubens*, *Laurencia* sp., *Pterocladia capillacea*. Entre las algas pardas se recolectó: *Dictyopteris membranacea*, *Dictyota dichotoma*, *Halopteris scoparia*, *Lobophora variegata*; y entre las algas verdes: *Caulerpa* sp., *Cymopolia barbata*, *Dasycladus vermicularis* y *Enteromorpha* sp.

II.1.4. Albufeira (Algarve, Portugal) 36°59'N 8°O.

Localidad del sur de Portugal en cuya franja intermareal dominan ejemplares de *Corallina* sp., *Jania rubens*, *Plocamium cartilagineum*, *Caulacanthus* sp., *Gelidium* sp., *Gelidiella* sp. y *Asparagopsis* sp., entre otras especies. En las zonas más expuestas también se pueden encontrar ejemplares de *Corallina* sp., que junto con otras algas rojas incrustantes (como *Litophyllum* sp.) forman una banda rosada en la zona más baja de la orilla.

II.1.5. Isla de Chiloé (Chile).

En el Océano Pacífico hacia el sur de Chile y próxima a su costa se sitúa la isla de Chiloé (41°S 73°O). Se muestreó en esta isla en el mes de noviembre de 1999. El rango de marea durante el periodo de estudio fue de 1.7 m (entre 0.6-2.3 m). Las macroalgas se recolectaron de la plataforma rocosa en la zona intermareal. La zona supralitoral estaba caracterizada por la presencia de ejemplares de *Porphyra columbina*, inmersas únicamente en los periodos de mareas muy altas. Entre las macroalgas rojas que dominaban en la zona mediolitoral se encuentra *Mazzaella laminarioides*, también se podían encontrar ejemplares de *Gelidium*

lingulatum en las pozas que estaban en la sombra y entre las grietas de rocas. En el mediolitoral inferior se podían encontrar en los bordes de grietas profundas ejemplares de *Sarcothalia crispata*. La zona más profunda de la plataforma rocosa estaba colonizada por un grupo heterogéneo de algas, entre las que se encontraban *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Callophyllis variegata*, *Dendrymenia skottsbergii*, *Grateloupia doryphora*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Laingia hookerii* y un complejo de especies de la familia Ceramiaceae (p.e. *Ceramium* sp.). También se encontraron algunos ejemplares de la especie *Gracilaria chilensis* a pesar de que esta especie es característica de fondos suaves.

II.1.6. Camarones (Argentina) 44°33'S 65°22'O.

Localidad de Argentina con similares características a la playa de Barrancas Blancas en Playa Unión (descrita en el apartado M.2.3). Se recolectaron ejemplares de las especies de algas rojas: *Porphyra columbina*, *Antithamnion simile*, *Callithamnion gaudichaudii*, *Ceramium nodulosum*, *Ceramium strictum*, *Heterosiphonia merenia*, *Myriogramme multinervis*, *M. smithii*, *Polysiphonia* sp., *Corallina officinalis*, *Jania rubens*, *Nothogenia fastigiata* y *Lomentaria clavellosa*.

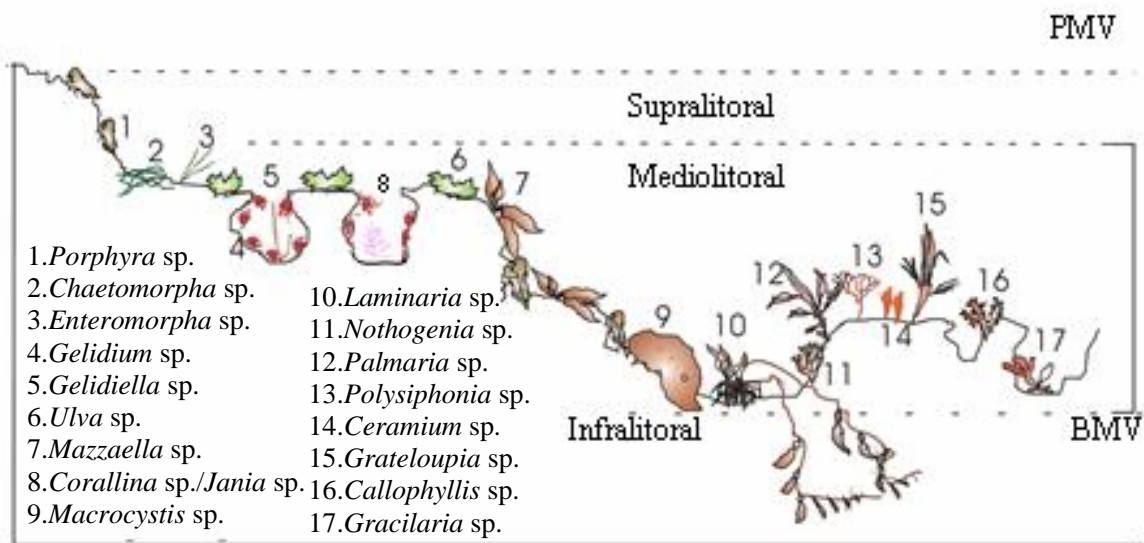


Figura II.1.1. Esquema general de la zonación de una franja litoral.

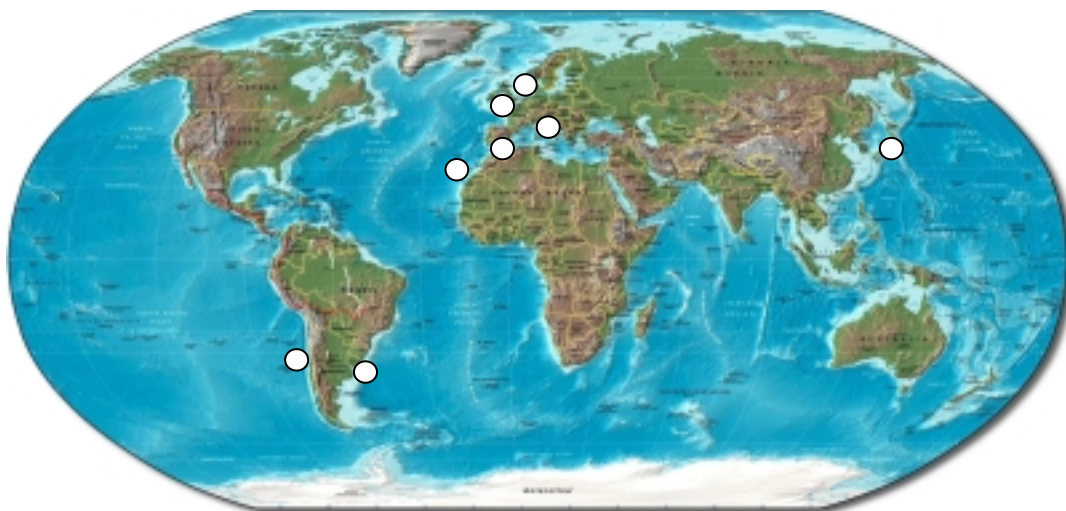


Figura II.1.2. Localización geográfica de algunos de los lugares de recolección (puntos blancos) de las macroalgas marinas analizadas (mapa mundi tomado de Internet).

II.2. Dosis anuales de radiación (PAR, UVA y UVB): Recogidas en la tabla II.2.1.

Tabla II.2.1. Dosis anuales de radiación en $\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$, datos extraídos de Lebert y colaboradores (2002); excepto para los datos del Sur de América (Playa Unión) obtenidos por comunicación personal con Walter Helbling. Todas las medidas de radiación tomadas con el radiómetro ELDONET.

	PAR ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	UVA ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	UVB ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$)
Sur de América (43° S)	2439	339	7.6
Islas Canarias (27° N)	2250	410	3.6
Andalucía (36° N)	2000	320	2.4
Centro de Europa (45° N)	1250	180	1.5
Norte de Europa (54° N)	1000	135	1.3
Norte de Europa (63° N)	1000	135	0.8

Las mayores dosis anuales de radiación solar se observaron en la latitud austral. Se dispone además de las dosis anuales para Valdivia (39°48'S, Chile) que fueron de $2802 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ para PAR (400-700 nm), y de $313 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ y $14.6 \text{ MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ para UVA (320-400 nm) y UVB (290-320 nm), respectivamente (datos de la Prof. Charlotte Lovengreen). Estos datos fueron recogidos por el espectrorradiómetro SUV-100 (Biospherical Instruments Inc., San Diego, California, EE.UU.) que recogía en continuo las medidas de la banda PAR, y por el radiómetro multicanal GUUV-511 (Biospherical Instruments Inc., San Diego, California, EE.UU.) que tomaba las medidas en la banda de RUV cada 15 minutos mediante 4 canales centrados en 305, 320, 340 y 380 nm. Las dosis de radiación para las latitudes del hemisferio norte disminuyen a medida que nos aproximamos al polo. A partir de los 50° N las dosis anuales de radiación se mantienen aproximadamente invariantes.

II.3. Distribución taxonómica, espacial y temporal de los MAAs en distintos grupos de macroalgas marinas.

II.3.1. Abreviaturas:

<u>Lugares de recolección/latitud:</u>	<u>Hábitat</u>	<u>MAAs:</u>
A (E): Cabo de Gata, Almería (España) 36°51'N	Ciclo: media±desviación típica del ciclo	MAAs: concentración total (mg·g ⁻¹ PS)
A (P): Albufeira (Portugal) 36°59'N	estacional (apartado II.4.)	MG: mycosporine-gly (% del total)
B (F): Brest (Francia) 48°27'N	Inf. sup.: Infralitoral superior	SH: shinorine (% del total)
C (Ar): Camarones (Argentina) 44°33'S	Inf. infe.: Infralitoral inferior	PR: porphyra-334 (% del total)
C (E): Gran Canaria (España) 27°56'N	Inf sup griet: Infralitoral superior en grietas	PNE: palythine (% del total)
Ca (E): Cádiz (España) 36°19'N	Mediolit: Mediolitoral	AS: asterina-330 (% del total)
Ch: Isla de Chiloé (Chile) 41°S	Med infe.: Mediolitoral inferior	
G (I): Giglio (Italia) 42°21'N	Med Infe.-Inf. Sup.: Mediolitoral Inferior-	
H (A): Helgoland (Alemania) 54°11'N	Infralitoral superior	
K (J): Kobe (Japón) 34°36'N	Med sup.: Mediolitoral superior	
L (E): Lagos (España) 36°28'N	Poza Inter.: Poza intermareal	
M (E): Playa Guadalmar, Málaga 36°28'N	Supr.: supralitoral	
O (E): Oviedo (España) 43°13'N		
P (E): Palmones, Cádiz (España) 36°07'N		
P (In): Plymouth (Inglaterra) 50°23'N		
S (A): Sylt (Alemania) 54°55'N		

II.3.2. División: Rhodophyta. Clase: Rhodophyceae. Orden:

II.3.2.1. BANGIALES

Fam. Bangiaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Bangia atropurpurea</i>	Supr.	L (E)	Ciclo	6.05±1.03	0.25±0.11	6.2±1.02	86.30±3.77	1.00±0.69	7.42±1.50	
<i>Porphyra columbina</i>	Supr.	Ch	Nov 99	4.49±0.15	1.46±0.53	5.77±0.15	89.14±0.67	1.39±0.19	0.68±0.08	1.56±0.36
<i>Porphyra columbina</i> sol	Supr.	C (Ar)	Nov 01	3.13±0.16	0.42±0.00	19.8±0.35	79.60±0.55	0.82±0.21	0.13±0.00	
<i>Porphyra columbina</i> sombra	Inf. sup.	C (Ar)	Nov 01	4.64±0.46	0.53±0.08	13.9±0.54	85.40±0.62	0.16±0.02	0.12±0.01	
<i>Porphyra leucosticta</i>	Supr.	L (E)	Ciclo	6.70±0.91	0.2 ±0.10	7.37±1.59	82.00±3.45	4.94±1.00	5.31±1.35	
<i>Porphyra purpurea</i>	Supr.	T (N)	Ag 99	6.88±0.60		8.86±0.85	90.58±2.59			
<i>Porphyra umbilicalis</i>	Supr.	H (A)	Oct 02	9.26±0.90		4.88±0.12	93.42±0.29	1.35±0.33	0.35±0.08	
<i>Porphyra yezoensis</i>	Supr.	K (J)	Nov 98	8.55±1.04		18.50±0.80	75.18±4.82	6.33±4.02		

II.3.2.2. BONNEMAIISONIALES

F. Bonnemaisoniaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Asparagopsis</i> sp.	Inf. sup.	A (P)	Jun 02	2.39±0.29		59.69±0.56		39.54±0.57	0.77±0.01	
<i>Asparagopsis armata</i>	Inf. sup.	T (E)	Jul 99	0.69±0.11	0.55±0.03	69.97±0.20	2.32±0.26	25.77±1.26	1.39±0.26	
<i>Asparagopsis armata</i>	Inf. sup.	T (E)	May 00	1.62±0.28		59.10±3.24	1.57±1.70	37.24±5.04	2.10±0.10	
<i>Asparagopsis armata</i>	Inf. sup.	T (E)	Oct 01	4.60±0.61		65.67±4.01	0.72±0.09	32.44±4.33	1.42±0.13	
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	Inf. sup.	C (E)	Sep 99	1.54±0.11		70.36±0.22	1.24	28.08±0.64	0.94±0.02	
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	Inf. sup.	C (E)	Feb 01	0.40±0.09		67.92±2.98		30.63±2.92	1.45±0.13	
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	Inf. sup.	C (E)	Oct 01	2.52±0.43		62.49±4.80		35.97±4.49	1.54±0.36	

II.3.2.3. CERAMIALES

Fam. Ceramiaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Antithamion simile</i>	Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	0.09		100.00				
<i>Callithamion gaudichaudii</i>	Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	2.49		2.53	92.65	3.53	1.30	
<i>Ceramium</i> sp.	Inf. sup.	Ch	Nov 99	2.15±0.32		80.21±1.37	0.46±0.11	11.62±0.21	1.40±0.12	6.31±1.37
<i>Ceramium nodulosum</i>	Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	0.60±0.02	6.00±5.85	37.71±1.86	2.13±1.33	53.73±8.99	0.43±0.04	

<i>Ceramium nodulosum</i>	Med Infe.	H (A)	Jul 99	0.13		63.60	33.86	2.53	
<i>Ceramium strictum</i>	Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	1.77±0.35	1.00±1.15	72.90±3.99	1.62±0.19	23.89±2.47	0.60±0.18

Fam. Dasycaceae		Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Heterosiphonia merenia</i>		Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	0.22±0.05		96.66±0.34	3.34±0.34			

Fam. Delesseriaceae		Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Myriogramme multinervis</i>		Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	0.07±0.00		93.55±9.12	12.89			
<i>Myriogramme smithii</i>		Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	0.04±0.00		78.54±19.95	26.70	8.11±1.07		

Fam. Rhodomelaceae		Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Bostrychia</i> sp.		Epífita	Ch	Nov 99	4.73±0.01	14.18±3.60	75.43±3.52	2.03±1.56	7.82±1.62	0.53±0.02	
<i>Bostrychia scorioides</i>		Mediolit	P (E)	Sept 99	1.65±0.54		0.51±0.01	86.94±1.26	4.82±0.96	7.72±0.31	
<i>Laurencia</i> sp.		Inf. sup.	C (E)	Sep 99	0.30±0.03		17.51±5.66	30.11±4.28	44.78±2.04	7.60±0.39	
<i>Laurencia</i> sp.		Inf. sup.	C (E)	Feb 01	0.83±0.09	23.36±4.31		45.18±4.38	23.70±1.89	7.76±0.67	
<i>Laurencia</i> sp.		Inf. sup.	C (E)	Oct 01	1.25±0.23	27.83±2.09	3.56±1.31	39.89±1.32	23.16±1.87	5.56±0.23	3.23±1.08
<i>Laurencia obtusa</i>		Inf. sup.	A (E)	Oct 00	0.70±0.28		9.41±2.92	59.18±6.41	12.69±1.54	12.52±2.16	5.62±1.5
<i>Laurencia obtusa</i>		Inf. sup.	A (E)	Jun 01	0.68±0.17		7.14±2.18	58.67±4.76	13.02±2.04	14.33±2.11	3.49±0.29
<i>Laurencia pinnatifida</i>		Med inf.	T (E)	Jul 99	0.32±0.02		8.95±0.11	82.43±4.88		8.62±0.49	
<i>Laurencia pinnatifida</i>		Med inf.	T (E)	May 00	0.98		15.15	60.60	6.69	6.96	10.59
<i>Laurencia pinnatifida</i>		Med inf.	T (E)	Oct 01	2.73±0.40		4.85±0.12	45.85±2.60	14.65±1.15	10.13±0.76	24.52±0.57
<i>Polysiphonia</i> sp.		Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	0.07±0.01		92.20±2.19		7.80±2.19		
<i>Polysiphonia lanosa</i>		Inf. sup.	P (In)	Mar 99	1.06±0.55	1.03±0.22	9.34±3.62	78.70±2.32	6.15±0.80	1.06	4.26±0.03
<i>Polysiphonia stricta</i>		Med infe.	S (A)	Sep 98	0.09		61.06	33.35	5.59		
<i>Streblocladia corymbifera</i>		Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	2.81±0.15	0.12±0.02	10.55±0.09	61.03±1.59	22.78±0.92	5.51±0.56	

II.3.2.4. CORALLINALES

Fam. Corallinaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Amphiroa rigida</i>	Inf sup.	G (I)	Ab 98	0.03		88.98		11.02		
<i>Corallina</i> sp.	Inf. sup.	A (P)	Jun 02	0.15±0.06		91.72±2.80		8.28±2.80		
<i>Corallina</i> sp.	Med Infe.	L (E)	Ciclo	0.60±0.16		66.63±8.40	5.41±1.30	27.4±5.48	2.6±1.25	
<i>Corallina elongata</i>	Poza Inter.	T (E)	Jul 99	0.75±0.30		70.16±0.46	3.51±0.58	26.33±4.13		
<i>Corallina elongata</i>	Poza Inter.	T (E)	May 00	0.46±0.05		69.82±0.31	0.55±0.77	26.91±1.24	2.73±0.16	
<i>Corallina elongata</i>	Poza Inter.	T (E)	Oct 01	0.49±0.08		71.09±6.11	2.20±0.30	24.54±5.98	2.17±0.50	
<i>Corallina elongata</i>	Inf. sup.	A (E)	Oct 00	0.22±0.06		75.59±5.68		24.01±6.13	0.60±0.84	
<i>Corallina elongata</i>	Inf. sup.	A (E)	Jun 01	0.27±0.12		66.08±5.75	1.73±0.78	30.01±4.31	2.76±0.58	
<i>Corallina elongata</i>	Inf. sup.	C (E)	Feb 01	0.36±0.05		87.80±3.77	1.83	10.69±2.11	1.35±0.51	
<i>Corallina officinalis</i>	Med Infe.- Inf. sup.	C (Ar)	Nov 01	0.72±0.28		71.34±10.50		26.56±10.05	2.10±0.45	
<i>Jania rubens</i>	Inf. sup.	C (Ar)	Nov 01	0.73±0.11		70.85±2.82	1.71	26.17±1.40	2.12±0.21	
<i>Jania rubens</i>	Poza Inter.	T (E)	May 00	0.43±0.08		79.30±0.53		18.46±0.46	2.25±0.07	
<i>Jania rubens</i>	Inf. sup.	A (E)	Oct 00	0.59±0.07	3.84±0.29	58.96±0.34	2.37	33.53±1.63	2.88±0.31	
<i>Jania rubens</i>	Inf. sup.	A (E)	Jun 01	0.60±0.08		76.86±8.49	0.46±0.10	21.59±8.07	1.09±0.33	
<i>Jania rubens</i>	Inf. sup.	A (P)	Jun 02	0.19±0.04		51.96±7.77	45.88±8.21	2.16±0.46		
<i>Jania rubens</i>	Med Infe.- Inf. sup.	C (E)	Sept 99	0.60±0.06		40.69±2.16	1.06±0.11	55.22±2.01	3.03±0.04	
<i>Jania rubens</i>	Med Infe.- Inf. sup.	C (E)	Feb 01	0.08±0.00		82.88±6.12	1.25±2.16	15.10±2.66	0.78±1.36	
<i>Litophyllum</i> sp.	Poza Inter.	A (P)	Jun 02	0.17±0.05		98.89±0.43		1.11±0.43		
<i>Litophyllum expansum</i>	Poza Inter.	T (E)	May 00	0.35±0.06		63.43±12.69	5.80±1.34	1.20±0.32	29.58±13.71	
<i>Litophyllum expansum</i>	Inf. Infe.	G (I)	Ab. 98	0.04±0.01		93.19±9.62	13.61			

II.3.2.5. GELIDIALES

Fam. Gelidiaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Gelidiella</i> sp.	Inf. sup.	A (P)	Jun 02	0.88±0.14		99.46±0.23		0.54±0.23		
<i>Gelidiella nigrescens</i>	Mediolit	T (E)	Jul 99	2.42±0.45		99.03±0.57	0.48±0.11	0.33±0.05	0.42±0.15	
<i>Gelidium arbuscula</i>	Med infe.	C (E)	Feb 01	3.08±0.59		99.33±0.09		0.37±0.06	0.30±0.03	
<i>Gelidium canariense</i>	Med infe.	C (E)	Sep 99	1.35±0.11		80.72±1.09	0.97±0.04	15.71±0.94	2.60±0.11	
<i>Gelidium canariense</i>	Med infe.	C (E)	Feb 01	1.50±0.30		99.44±0.58		0.54±0.43	0.30±0.03	
<i>Gelidium latifolium</i>	Grietas	T (E)	Jul 99	2.34±0.15		98.16±2.35		1.37±0.36	0.47±0.15	
<i>Gelidium latifolium</i>	Grietas	T (E)	May 00	1.56±0.70		98.29±0.31	0.76±0.42	0.49±0.06	0.47±0.06	
<i>Gelidium latifolium</i>	Grietas	T (E)	Oct 01	3.13±0.27		99.03±0.35	0.56	0.38±0.02	0.40±0.03	
<i>Gelidium latifolium</i>	Grietas	C (E)	Feb 01	0.45±0.00		96.62±1.45		2.41±1.41	0.96±0.04	
<i>Gelidium pusillum</i>	Med infe.	T (E)	Ciclo	5.00±1.10		79.00±8.95	1.32±0.85	16.74±5.14	2.94±1.04	
<i>Gelidium pusillum</i>	Inf. sup.	P (P)	Sept 98	1.13±0.16		88.47±2.89		10.54±0.58	1.77±0.47	
<i>Gelidium sesquipedale</i>	Inf sup griet	T (E)	Jul 99	1.27±0.13		14.35±0.06		0.55±0.01	85.10±2.65	
<i>Gelidium sesquipedale</i>	Inf sup griet	T (E)	May 00	2.73±1.22		15.06±0.48	0.56±0.42	15.43±0.19	68.95±1.09	
<i>Gelidium sesquipedale</i>	Inf sup griet	T (E)	Oct 01	1.63±0.21		3.14±0.72	0.26±0.08	21.16±0.78	75.43±0.07	
<i>Gelidium sesquipedale</i>	Inf. sup.	A (P)	Jun 02	0.50±0.07		9.46±0.35		21.50±0.53	69.05±0.75	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Inf. sup.	A (P)	Jun 02	0.94±0.19		99.10±0.19		0.56±0.16	0.34±0.06	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Inf. sup.	A (E)	Oct 00	1.49±0.55		79.74±4.41		15.66±3.36	4.61±1.06	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Inf. sup.	A (E)	Jun 01	1.30±0.52		79.74±4.41		15.66±3.36	4.61±1.06	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Inf. sup.	C (E)	Sep 99	0.73±0.09		85.42±2.56	1.76±1.53	10.89±0.95	1.93±0.16	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Inf. sup.	C (E)	Feb 01	0.52±0.11		54.60±9.47	0.66	39.97±7.94	5.21±1.42	
<i>Pterocladia capillacea</i>	Poza inter.	T (E)	Jul 99	0.54±0.05		93.35±2.00	1.63±0.26	5.02±0.26		

II.3.2.6. GIGARTINALES

Fam. Kallymeniaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Callophyllis variegata</i>	Med infe.	Ch	Nov 99	0.05±0.00		100.00				

Fam. Gigartinaeae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Chondracanthus</i> sp.	Mediolit	A (E)	Oct 00	1.74±0.55		97.09±0.37	0.71±0.41	2.44±0.44		

<i>Chondracanthus</i> sp.	Mediolit	Ch	Nov 99	0.13±0.01		42.70	52.78	2.45	2.07
<i>Chondrus crispus</i>	Med infe.	H (A)	Jun 98	0.85±0.10		2.79±0.13	1.08±0.09	65.91±3.49	30.22±2.49
<i>Gigartina</i> sp.	Mediolit	Ch	Nov 99	0.20		17.01	3.21	0.91	78.87
<i>Mazzaella laminarioides</i>	Mediolit	Ch	Nov 99	2.48		66.56	0.92	28.96	3.56

Fam. Cystocloniaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Cystoclonium purpureum</i>	Mediolit	H (A)	Jun 98	0.04		100.00				

Fam. Dumontiaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Dumontia incrassata</i>	Med infe.	H (A)	Jun 98	0.12		69.03	25.92	3.09	1.96	

Fam. Caulacanthaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Caulacanthus</i> sp.	Med infe.	L (E)	Ciclo	1.70±0.43	1.3±0.58	52.6±8.25	4.2±1.54	40.8±4.87	1.5±0.87	
<i>Caulacanthus</i> sp.	Mediolit	A (P)	Jun 02	0.29		19.88	72.77	7.34		
<i>Feldmannophycus</i> sp.	Mediolit	T (E)	Mayo 00	0.90±0.23		49.51±7.62		48.63±7.26	1.87±0.37	
<i>Feldmannophycus</i> sp.	Mediolit	T (E)	Oct 01	2.70±0.51	1.41±0.14	42.44±3.23	0.42±0.14	53.86±3.25	1.86±0.02	
<i>Feldmannophycus rayssiatae</i>	Mediolit	C (E)	Feb 01	1.25±0.16	0.75±0.33	41.42±11.94	0.81±0.26	55.79±11.44	1.23±0.42	

Fam. Phylloporaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Gymnogongrus devoniensis</i>	Inf. sup.	T (E)	Jul 99	2.77±0.05		99.32±3.00			0.68±0.15	
<i>Gymnogongrus devoniensis</i>	Inf. sup.	T (E)	May 00	1.53±0.11		99.13±0.04		0.39±0.03	0.47±0.01	
<i>Gymnogongrus devoniensis</i>	Inf. sup.	T (E)	Oct 01	2.37±0.55		99.17±0.22		0.35±0.20	0.47±0.02	
<i>Gymnogongrus furcellatus</i>	Inf. sup.	Ch	Nov 99	2.07±0.20		68.22±2.11	2.23	28.73±0.78	1.75	
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Med sup.	H (A)	Jun 98	3.87±0.75		99.50±7.59		1.20±0.45	1.02±0.36	

Fam. Peyssonneliaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Peyssonnelia</i> sp.	Inf. sup.	A (E)	Oct 00	2.28±0.19		99.64±0.03		0.36±0.03		
<i>Peyssonnelia</i> sp.	Inf. sup.	A (E)	Jun 01	1.83±0.95		97.83±0.09	2.10±0.08	0.22		

Fam. Halymeniaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Grateloupia dichotoma</i>	Mediolit	C (E)	Oct 01	0.92±0.14		43.54±10.3		52.20±9.56	4.26±0.70	
<i>Grateloupia dichotoma</i>	Cultivo alto NH ₄ ⁺	C (E)	Marz 03	3.08±0.30		89.46±3.66		9.61±3.34	0.93±0.30	
<i>Grateloupia doryphora</i>	Cultivo alto NH ₄ ⁺	C (E)	Marz 03	2.86±0.66		19.64±0.26	80.1±0.24	0.22±0.02		
<i>Grateloupia turuturu</i>	Mediolit	B (F)	Ab 03	2.46±0.29		88.3 ±0.67		11.00±0.62	0.65±0.10	
<i>Grateloupia lanceolata</i>	Mediolit	M (E)	May 02	1.09±0.57		27.91±3.31	71.44±3.37	0.65±0.20		

Fam. Risoellaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Risoella verruculosa</i>	Med sup.	L (E)	Feb 01	2.63±0.18		99.40	0.33±0.01		0.27±0.01	

II.3.2.7. GRACILARIALES

Fam. Gracilariaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Gracilaria</i> sp.	Inf. Sup.	C (E)	Feb 01	1.06±0.40		38.80±0.71	54.50±0.25	6.13±0.58	0.57±0.03	
<i>Gracilaria</i> sp.	Inf. Sup.	C (E)	Oct 01	1.81±0.42		39.41±1.64	56.29±1.81	3.74±0.36	0.55±0.06	
<i>Gracilaria</i> sp.	Poza inter.	T (E)	May 00	1.61±0.77	0.49±0.15	88.31±2.14		11.09±2.13	0.22	
<i>Gracilaria gracilis</i>	Inf. sup.	Ca (E)	Feb 01	0.74±0.13		99.64±0.63	1.09±0.36			
<i>Gracilaria chilensis</i>	Mediolit	Ch	Nov 99	1.51±0.36		12.47±0.63	43.33±5.88	27.20±4.43	14.75±2.87	3.39±0.07

II.3.2.8. NEMALIALES

Fam. Galaxauraceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Nothogenia lanosa</i>	Inf sup.	C (Ar)	Nov 01	2.51±0.00	0.31±0.01	6.27±0.07	93.17±0.05	0.11±0.00	0.14±0.01	

II.3.2.9. PALMARIALES

Fam. Palmariaaceae										
	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Palmaria palmata</i>	Mediolit	O (E)	Nov 99	0.49±0.10		15.00±3.25	62.00±8.66	17.00±3.15	3.00±0.48	

II.3.2.10.PLOCAMIALES

Fam. Plocamiaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Plocamium cartilagineum</i>	Inf. Infe.	T (E)	May 00	0.98±0.12		80.68±6.07	6.06±0.47	11.76±4.88	1.49±0.72	
<i>Plocamium cartilagineum</i>	Inf. Infe.	A (P)	Jun 02	1.14±0.18		99.69±0.07		0.31±0.07		
<i>Plocamium cartilagineum</i>	Inf. Infe.	A (E)	Oct 00	1.29±0.32		95.82±1.18		4.18±1.18		

II.3.2.11.RHODYMENIALES

Fam. Lomentariaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Lomentaria clavellosa</i>	Poza Inter.	C (Ar)	Nov 01	1.41±0.02		48.56±1.17	39.61±0.36	11.51±0.81	0.32±0.01	

II.3.3. División: Phaeophyta*. Clase: Phaeophyceae. Orden:

II.3.3.1. DICTYOTALES

Fam. Dictyotaceae	Hábitat	Lugar	Fecha	MAAs	MG	SH	PR	PNE	AS	POL
<i>Lobophora variegata</i>	Inf. sup.	C (E)	Feb 01	0.14±0.02		57.53±7.11		38.89±7.20	3.58±0.23	

* De todas las algas verdes y pardas analizadas (las que se recogen en las tablas M.2 y M.3, material y métodos) la única que presentó una concentración detectable de MAAs fue *Lobophora variegata*.

II.4. Estacionalidad en la acumulación de MAAs en *Bangia atropurpurea*, *Porphyra leucosticta*, *Caulacanthus* sp., *Corallina* sp. y *Gelidium pusillum*.

II.4.1. Especies recolectadas en Lagos (Málaga): *Bangia atropurpurea*, *Porphyra leucosticta*, *Caulacanthus* sp. y *Corallina* sp.

A lo largo de los meses de noviembre de 2000 a abril de 2001 se tomaron muestras mensualmente de estas especies para estudiar la variación en el contenido y tipos de MAAs. Las muestras se tomaron en la localidad de Lagos (Málaga) a las horas centrales del día y el tercer viernes del mes correspondiente.

II.4.1.1. Medidas de radiación con el radiómetro ELDONET:

Las dosis diarias medias para cada uno de los meses del periodo de estudio, tanto de radiación PAR, como UVA y UVB, se reflejan en la tabla II.4.1. También se muestra en la tabla la equivalencia de las dosis de radiación con DBE para el daño en ADN (Setlow, 1974) y para la inhibición de la fotosíntesis en cloroplastos aislados (Jones y Kok, 1966). Se han calculado las relaciones entre las dosis de UVB/UVA, UVA/PAR y UVB/PAR (figura II.4.1). En la figura II.4.2 se representa la variación diaria de la irradiancia en un día del mes de marzo.

Tabla II.4.1. Dosis medias diarias de PAR, UVA y UVB; y DBE para daño en ADN (Setlow, 1974) e inhibición de la fotosíntesis en cloroplastos aislados (Jones y Kok, 1966). Todas expresadas en $\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$.

	PAR ($\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	UVA ($\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	UVB ($\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	DBE Setlow ($\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$)	DBE Jones y Kok ($\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$)
Nov-00	4597.3	416.0	7.6	0.8	102.7
Dic-00	3239.5	287.4	4.5	0.6	70.7
Ene-01	2524.6	233.1	4.2	0.5	57.5
Feb-01	2223.0	264.0	6.0	0.5	65.4
Mar-01	4748.8	553.9	15.0	1.1	137.9
Abr-01	10027.1	1014.5	27.1	2.0	252.5

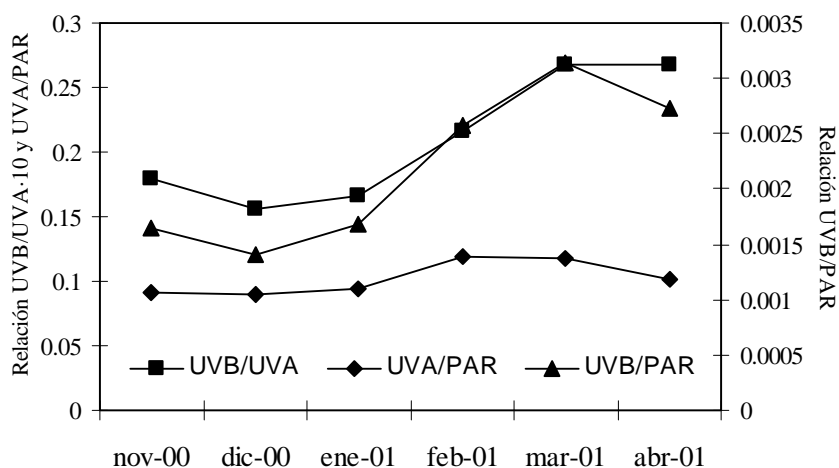


Figura II.4.1. Relación entre las dosis de UVB/UVA (x10), UVA/PAR y UVB/PAR para el periodo de estudio entre los meses de noviembre de 2000 y abril de 2001.

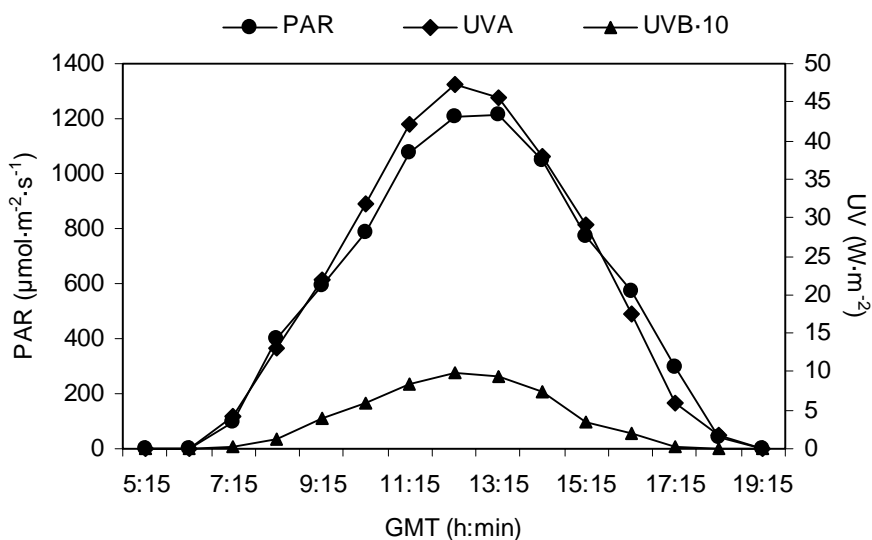


Figura II.4.2. Medidas del radiómetro ELDONET de las bandas PAR, UVA y UVB (x10) el día 27 de marzo de 2001.

II.4.1.2. Contenido total de MAAs:

Las mayores concentraciones de MAAs se observaron en las dos especies pertenecientes al orden Bangiales (*B. atropurpurea* y *P. leucosticta*), en estos casos el contenido interno de estos aminoácidos estuvo en torno a $6.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$. Las concentraciones menores de MAAs se encontraron en *Corallina* sp., en torno a $0.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ (figura II.4.3). En general, se encontraron menores concentraciones de MAAs asociadas al mes de marzo.

En el mes de abril no se encontraron ejemplares de la fase gametofítica de la especie *B. atropurpurea*, el contenido de MAAs en los demás meses de muestreo no varió significativamente ($p > 0.05$). La concentración total rondó los $6.1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$. Aunque se observó

una caída significativa de la concentración en el mes de marzo respecto al mes de febrero ($p < 0.05$) (figura II.4.3).

En la especie *P. leucosticta* la concentración de MAAs fue significativamente inferior en el mes de marzo que en los meses de noviembre, diciembre, enero y febrero ($p < 0.05$). La concentración total estuvo en torno a $6.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ (figura II.4.3).

La concentración de MAAs en *Caulacanthus* sp. en el mes de marzo de 2001 fue significativamente inferior que en el resto de los meses. Además en diciembre de 2000 y en abril de 2001 la concentración interna fue superior que en los demás meses de muestreo ($p < 0.05$). La concentración total estuvo en torno a $1.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ (figura II.4.3).

En la especie *Corallina* sp. no se detectaron diferencias significativas entre los meses de muestreo en el contenido total de MAAs que estuvo en torno a $0.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ (figura II.4.3).

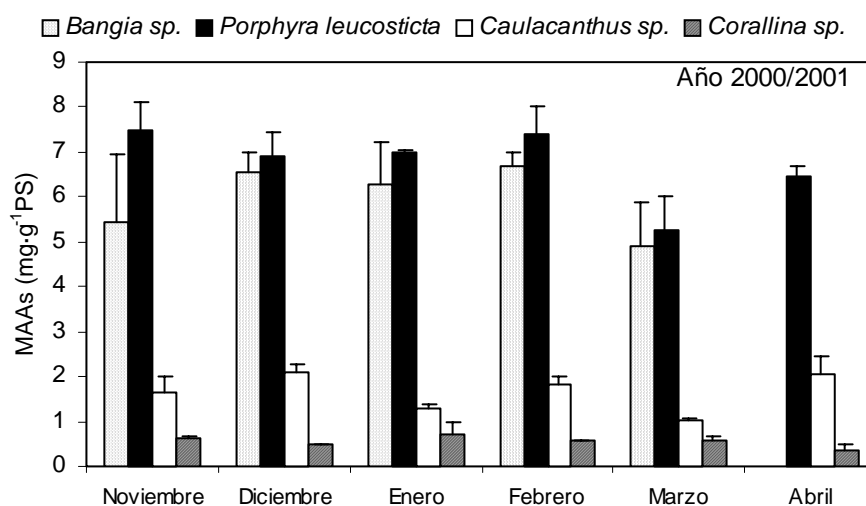


Figura II.4.3. Concentración interna de MAAs en las especies de algas rojas *Bangia atropurpurea*, *Porphyra leucosticta*, *Caulacanthus* sp. y *Corallina* sp. recolectadas en Lagos (Málaga) entre noviembre de 2000 y abril de 2001.

II.4.1.3. Tipos de MAAs:

La especie *B. atropurpurea* se caracterizó por poseer una elevada proporción de porphyra-334, acompañada de shinorine, palythine y asterina-330 en unos porcentajes muy inferiores. La proporción relativa de shinorine fue significativamente inferior en febrero y en marzo. La proporción de porphyra-334 fue significativamente inferior en los meses de diciembre y marzo, y fue significativamente superior en febrero ($p < 0.05$). La proporción relativa de palythine no varió significativamente entre los meses de muestreo ($p > 0.05$). La proporción de asterina-330 en *B. atropurpurea* fue significativamente inferior en noviembre de 2000 y significativamente

superior en los meses de diciembre y marzo respecto a los meses de enero y febrero ($p < 0.05$) (figura II.4.4.A).

Si se asigna el valor de 1 al mes en el que cada MAA estaba presente mayoritariamente, y se calculan las proporciones relativas a este valor para los demás meses de muestreo, en *B. atropurpurea* se observó una caída de shinorine en el mes de enero y sobre todo febrero, recuperándose en marzo. La proporción relativa de porphyra-334 no presentó grandes cambios a lo largo del periodo. Los mayores valores para palythine y asterina-330 se observaron en los meses de diciembre y marzo (figura II.4.4.B).

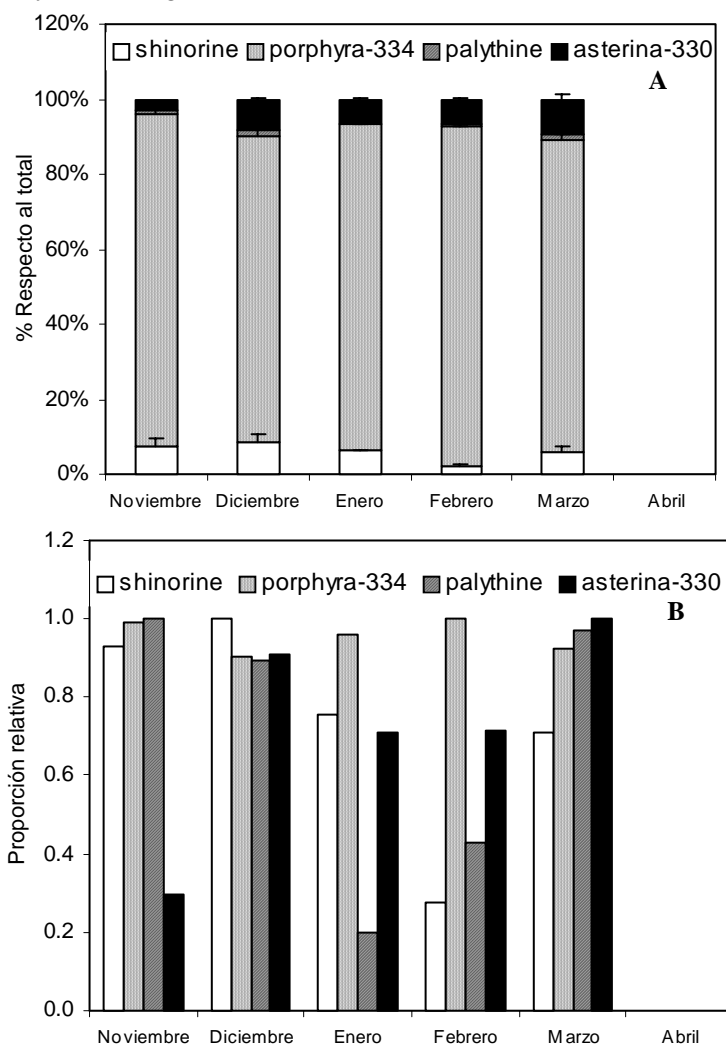


Figura II.4.4. (A) Porcentaje respecto al total y (B) proporción relativa de los tipos de MAAs, asignándole el valor de 1 al mes en el que el MAA estaba presente mayoritariamente, a lo largo de los meses de muestreo en *Bangia atropurpurea*.

La especie *P. leucosticta* se caracterizó por tener una composición de MAAs muy similar a *B. atropurpurea*, una gran cantidad de porphyra-334 y en menor porcentaje estaba presente shinorine, palythine y asterina-330. La proporción relativa de shinorine fue significativamente inferior en el mes de abril de 2001 y significativamente superior en el mes de marzo de 2001.

Además la proporción de shinorine fue superior significativamente en el mes de noviembre de 2000 que en el de diciembre. La proporción relativa de porphyra-334 en esta especie fue significativamente inferior en el mes de marzo de 2001 y significativamente superior en los meses de enero y abril de 2001 ($p < 0.05$). La proporción relativa de palythine fue inferior en enero de 2001 y superior en diciembre de 2000 ($p < 0.05$). La proporción relativa de asterina-330 fue inferior significativamente en los meses de noviembre de 2000, enero y febrero de 2001, y significativamente superior en marzo ($p < 0.05$) (figura II.4.5.A).

Se observa en la figura II.4.5.B se extrae que en *P. leucosticta* la caída de shinorine se produjo en el mes de diciembre y fue de menor magnitud que en *B. atropurpurea*, fluctuando desde diciembre hasta final del periodo de estudio. La proporción relativa de porphyra-334 tampoco presentó grandes variaciones a lo largo del periodo, aunque en ambas especies se produjeron caídas en marzo, coincidiendo con las menores concentraciones internas de MAAs.

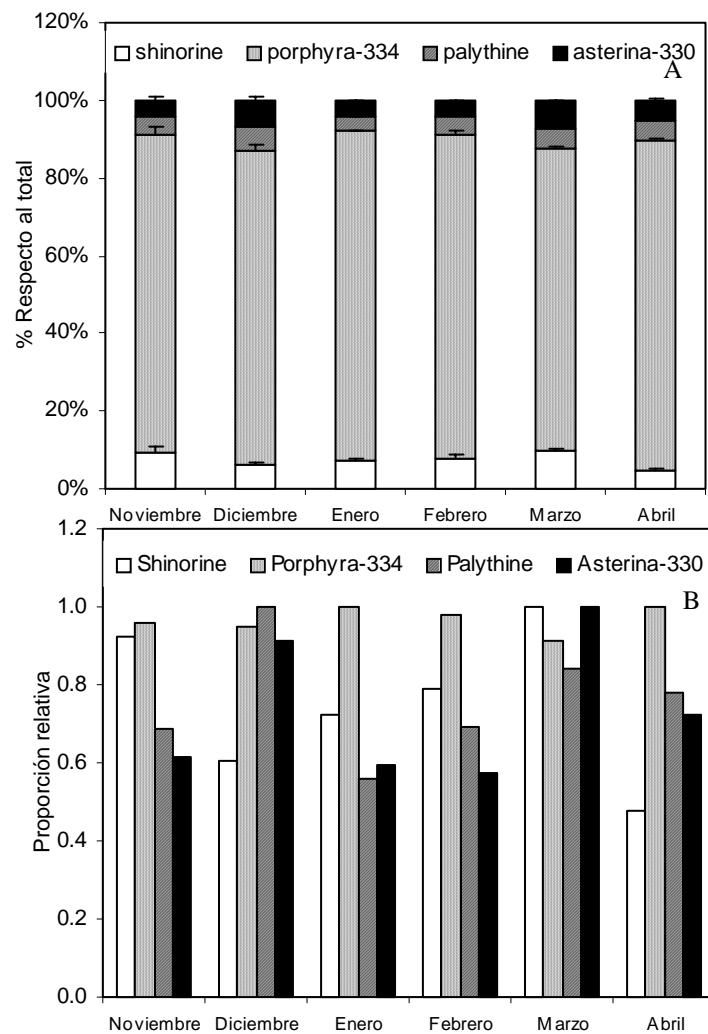


Figura II.4.5. (A) Porcentaje respecto al total y (B) proporción relativa de los tipos de MAAs, asignándole el valor de 1 al mes en el que el MAA estaba presente mayoritariamente, a lo largo de los meses de muestreo en *Porphyra leucosticta*.

La especie *Caulacanthus* sp. se caracterizó por poseer como MAAs mayoritarios, shinorine y palythine, aunque también se detectó la presencia de porphyra-334, y una pequeña cantidad de asterina-330. La proporción de shinorine fue inferior significativamente en el mes de marzo y en enero fue significativamente superior. En diciembre la proporción de shinorine fue superior que en los meses de noviembre y febrero ($p < 0.05$). En esta misma especie la proporción de porphyra-334 fue superior significativamente en el mes de noviembre de 2000 que en enero, febrero, marzo y abril de 2001 ($p < 0.05$). Y la proporción de palythine fue superior en marzo que en los demás meses de muestreo, además, en los meses de diciembre y enero dicha proporción fue inferior significativamente que en el resto de los meses ($p < 0.05$) (figura II.4.6.A).

Se observa en la figura II.4.6.B que porphyra-334 en *Caulacanthus* sp. cayó a lo largo de los meses de estudio. Mientras shinorine iba aumentando su proporción hasta el mes de febrero momento en el que empezó a decrecer, recuperándose de nuevo en abril.

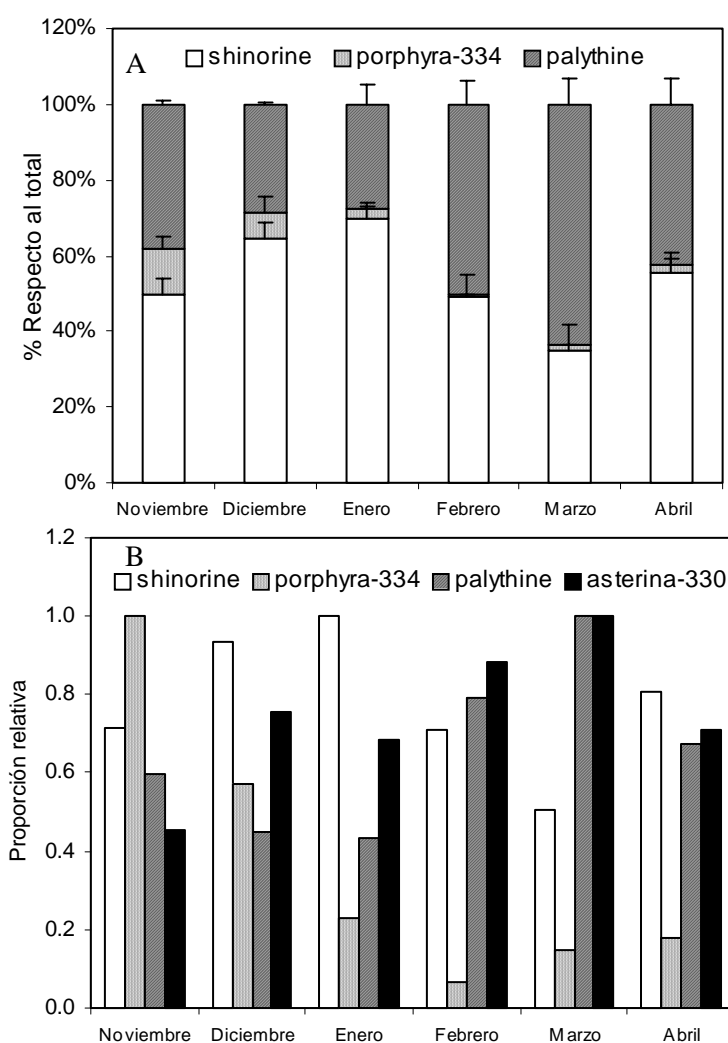


Figura II.4.6. (A) Porcentaje respecto al total de los tipos mayoritarios de MAAs (shinorine, porphyra-334 y palythine) y (B) proporción relativa de los tipos de MAAs, asignándole el valor de 1 al mes en el que el MAA estaba presente mayoritariamente, a lo largo de los meses de muestreo en *Caulacanthus* sp.

La especie *Corallina* sp. poseía como MAA mayoritario shinorine, seguido de palythine y por último se observó una pequeña cantidad de asterina-330. La proporción relativa de shinorine fue inferior significativamente en el mes de diciembre de 2000 y en abril de 2001 fue significativamente superior ($p < 0.05$). La proporción relativa de palythine fue significativamente inferior en abril de 2001, y en los meses de enero y febrero de 2001 fue significativamente superior. Por último, la proporción relativa de asterina-330 en *Corallina* sp. fue significativamente superior en el mes de diciembre de 2000 ($p < 0.05$) (figura II.4.7.A).

Se observa en la figura II.4.7.B que en *Corallina* sp. el comportamiento de los MAAs difirió respecto a las especies anteriores, la proporción relativa de palythine y asterina-330 varió siguiendo una curva normal con su máximo desviado hacia la izquierda, concretamente se situó en el mes de diciembre para asterina-330 y en el mes de enero para palythine. La proporción de shinorine no varió en gran medida, pero sí estuvo presente mayoritariamente en abril, coincidiendo con los mínimos en los otros dos MAAs. En el mes de enero asterina-330 decreció a expensas de un incremento en la proporción de palythine y la de shinorine (figura II.4.7.B).

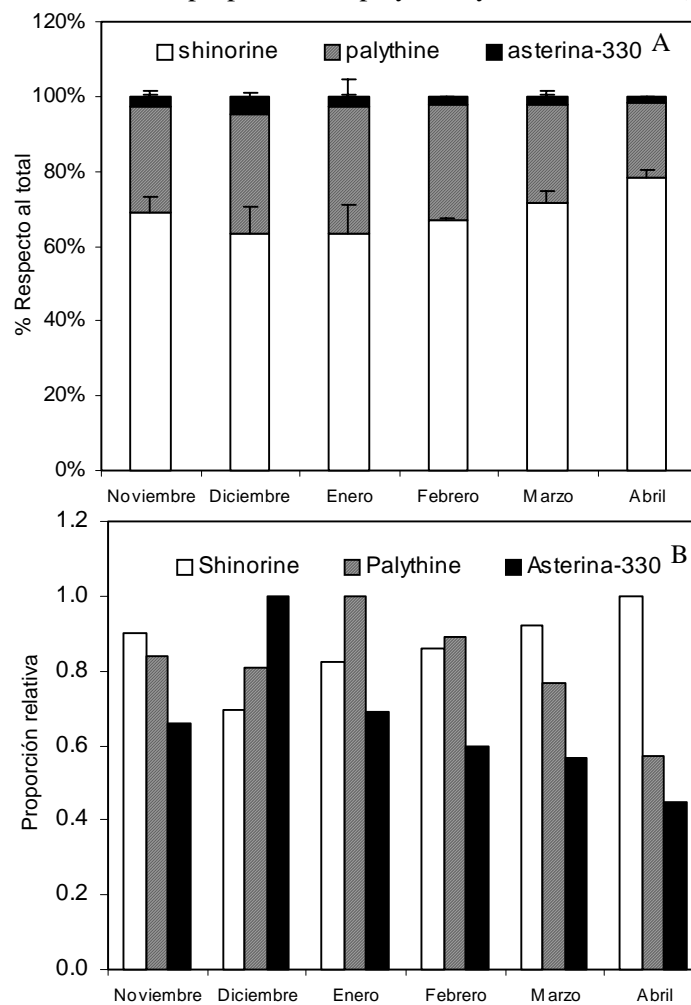


Figura II.4.7. (A) Porcentaje respecto al total y (B) proporción relativa de los tipos de MAAs, asignándole el valor de 1 al mes en el que el MAA estaba presente mayoritariamente, a lo largo de los meses de muestreo en *Corallina* sp.

II.4.1.4. Correlación entre MAAs y dosis de radiación:

Tabla II.4.2. Coeficientes de correlación de Pearson correspondientes al análisis de correlación entre la concentración y tipo de MAAs en *B. atropurpurea* y las dosis medias mensuales recibidas (n=14). ** Correlación significativa p<0.01. * Correlación significativa p<0.05.

	PAR	UVA	UVB	MAAs	SH	PR	PNE
MAAs	-0.594*	-0.609*	-0.553*				
SH	-0.075	-0.416	-0.624*	0.194			
PR	-0.235	-0.230	-0.220	0.046	-0.352		
PNE	0.589*	0.513	0.376	-0.330	0.162	-0.423	
AS	0.865**	0.774**	0.671*	-0.620*	-0.077	-0.648*	0.454

Tabla II.4.3. Coeficientes de correlación de Pearson correspondientes al análisis de correlación entre la concentración y tipo de MAAs en *P. leucosticta* y las dosis medias mensuales recibidas (n=15). ** Correlación significativa p<0.01. * Correlación significativa p<0.05.

	PAR	UVA	UVB	MAAs	SH	PR	PNE
MAAs	-0.268	-0.368	-0.441				
SH	-0.476	-0.428	-0.403	-0.155			
PR	0.311	0.263	0.247	0.528*	-0.602*		
PNE	0.072	0.069	0.051	-0.329	-0.283	-0.575*	
AS	0.074	0.112	0.131	-0.698**	-0.053	-0.736**	0.857**

Tabla II.4.4. Coeficientes de correlación de Pearson correspondientes al análisis de correlación entre la concentración y tipo de MAAs en *Caulacanthus* sp. y las dosis medias mensuales recibidas (n=17). ** Correlación significativa p<0.01. * Correlación significativa p<0.05.

	PAR	UVA	UVB	MAAs	SH	PR
MAAs	0.294	0.244	0.193			
SH	-0.152	-0.243	-0.285	0.220		
PR	-0.057	-0.156	-0.264	0.169	-0.006	
PNE	0.180	0.302	0.381	-0.247	-0.926**	-0.371

Tabla II.4.5. Coeficientes de correlación de Pearson correspondientes al análisis de correlación entre la concentración y tipo de MAAs en *Corallina* sp. y las dosis medias mensuales recibidas (n=17). ** Correlación significativa p<0.01. * Correlación significativa p<0.05.

	PAR	UVA	UVB	MAAs	SH	PNE
MAAs	-0.567*	-0.555*	-0.529*			
SH	0.638**	0.685**	0.708**	-0.300		
PNE	-0.744**	-0.752**	-0.733**	0.752**	-0.629**	
AS	-0.513*	-0.580*	-0.629**	0.164	-0.955**	0.473*

El contenido total de MAAs en *B. atropurpurea* y en *Corallina* sp. se correlacionó de forma negativa con las dosis de radiación solar recibidas. En la primera de las especies se determinó además, una correlación positiva entre la dosis y el contenido de asterina-330 y palythine, sin embargo, el contenido de shinorine se relacionó de forma contraria a la dosis de radiación UVB (tabla 4.1.2). Lo contrario ocurría en *Corallina* sp (tabla II.4.5). En las dos especies del orden Bangiales existió una correlación negativa entre el contenido total de MAAs y el porcentaje que representaba asterina-330. Y en *Corallina* sp., especie en la que no se observaron diferencias en la concentración total de MAAs a lo largo del periodo de estudio, la correlación entre MAAs y palythine fue positiva. También fue positiva la correlación del contenido total de MAAs con el porcentaje de porphyra-334 en la especie *P. leucosticta* (tabla II.4.3).

El grado de asociación entre los MAAs se caracterizó, en general, por la existencia de una correlación positiva entre el contenido de asterina-330 y palythine, sin embargo, la correlación entre el MAA mayoritario para cada especie (ya sea shinorine o porphyra-334) con los anteriores MAAs (palythine y asterina-330) fue negativa. Y en el orden Bangiales se determinó una correlación negativa entre el contenido de shinorine y porphyra-334 (tablas II.4.2, 3, 4, 5).

II.4.2. Estacionalidad en la acumulación de MAAs en *Gelidium pusillum* recolectado en Tarifa (Cádiz).

II.4.2.1. Medidas de radiación con el radiómetro ELDONET (tabla II.4.6):

Tabla II.4.6. Dosis medias diarias de PAR, UVA y UVB; y DBE para daño en ADN (Setlow, 1974) e inhibición de la fotosíntesis en cloroplastos aislados (Jones y Kok, 1966). Todas expresadas en KJ·m⁻².

	PAR	UVA	UVB	Setlow	Jones y Kok
may-00	8935	871.9	24.7	1.8	217.3
oct-00	6059	571.8	13.1	1.2	141.8
dic-00	3239	287.4	4.5	0.6	70.8
mar-01	4749	553.9	15	1.1	137.9
jun-01	12297	1194	34.7	2.4	297.8
oct-01	5826	557	13.8	1.1	138.4

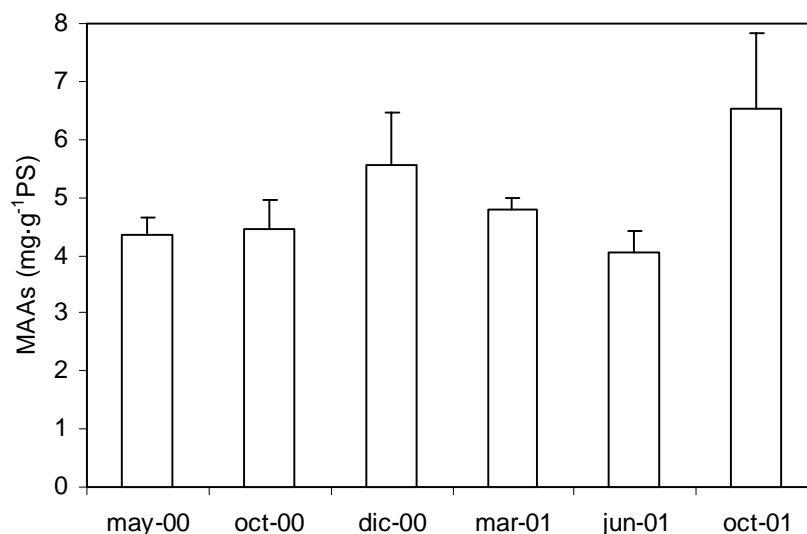
II.4.2.2. Contenido total de MAAs:

Figura II.4.8. Concentración total de MAAs en ejemplares de *Gelidium pusillum* recolectados en Isla de las Palomas (Tarifa) entre los meses de mayo de 2000 y octubre de 2001.

La concentración total de MAAs en *Gelidium pusillum* fue significativamente inferior en junio que en octubre de 2001 ($p < 0.05$). En los demás meses de muestreo no se detectaron diferencias significativas en el contenido total de MAAs ($p > 0.05$) (figura II.4.8).

II.4.2.3. Tipos de MAAs:

La especie *G. pusillum* se caracterizó por poseer un gran porcentaje de shinorine, seguido de palythine, y por último, se detectaron pequeñas cantidades de porphyra-334 y asterina-330. El porcentaje de shinorine fue significativamente inferior en junio de 2001, seguido de octubre de 2000, además en este último mes de muestreo la proporción relativa fue inferior significativamente al resto de meses de muestreo. El porcentaje de porphyra-334 en el mes de marzo de 2001 fue inferior significativamente que en los meses de mayo y octubre de 2000. El porcentaje de palythine fue inferior significativamente en octubre de 2001, y superior en junio de 2001. Además la proporción de palythine fue significativamente inferior en mayo de 2000 que en los meses de octubre de 2000 y marzo de 2001. Por último, el porcentaje de asterina-330 en *G. pusillum* fue superior significativamente en junio de 2001 e inferior en los meses de mayo de 2000, marzo y octubre de 2001, todo ello respecto al mes de octubre de 2000 ($p < 0.05$) (figura II.4.9.A).

Se observa en la figura II.4.9.B que la menor concentración de MAAs en el mes de junio de 2001 en *G. pusillum* coincidió con una mayor proporción relativa de palythine y asterina-330. En octubre de 2000 todos los MAAs presentaron una proporción relativa muy próxima al máximo del periodo de estudio, excepto shinorine, que junto con los talos recolectados en junio

de 2001, presentaron una proporción relativa inferior que en el resto de los casos. Estos menores porcentajes de shinorine respecto al total de MAAs coincidieron, en ambos casos, con las mayores proporciones relativas de palythine y asterina-330 (figura II.4.9.B).

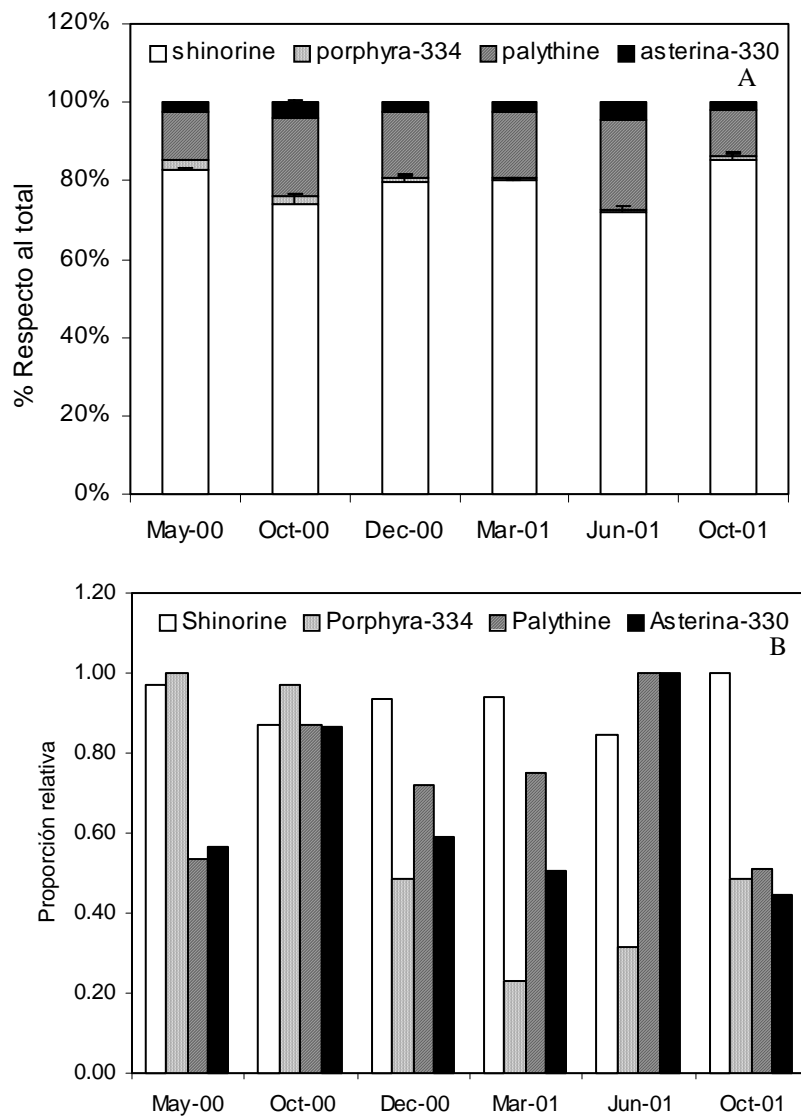


Figura II.4.9. (A) Porcentaje respecto al total y (B) proporción relativa de los tipos de MAAs, asignándole el valor de 1 al mes en el que el MAA estaba presente mayoritariamente, a lo largo de los meses de muestreo en *Gelidium pusillum*.

II.4.2.4. Correlación entre MAAs y dosis de radiación:

Tabla II.4.7. Coeficientes de correlación de Pearson correspondientes al análisis de correlación entre la concentración y tipo de MAAs en *Gelidium pusillum* y las dosis medias mensuales recibidas (n=15). ** Correlación significativa $p < 0.01$. * Correlación significativa $p < 0.05$.

	PAR	UVA	UVB	MAAs	SH	PR	PNE
MAAs	-0.514*	-0.532*	-0.522*				
SH	-0.730**	-0.716**	-0.688**	0.480			
PR	0.404	0.341	0.294	-0.244	-0.181		
PNE	0.690**	0.683**	0.658**	-0.466	-0.996**	0.095	
AS	0.789**	0.768**	0.737**	-0.478	-0.990**	0.242	0.976**

El contenido total de MAAs en *G. pusillum* se correlacionó de forma negativa con las dosis de radiación solar recibidas. Se determinó además, una correlación positiva entre la dosis y el contenido de asterina-330 y palythine, sin embargo, el contenido de shinorine se relacionó de forma contraria a la dosis de radiación (tabla II.4.7).

El grado de asociación entre los MAAs se caracterizó por la existencia de una correlación positiva entre el contenido de asterina-330 y palythine, sin embargo, la correlación entre el MAA mayoritario, shinorine, con los anteriores MAAs (palythine y asterina-330) fue negativa (tabla II.4.7).

II.5. Discusión.

Existen estudios previos en los que se sugirió que la acumulación de MAAs era dependiente tanto de la dosis como de la longitud de onda (Karsten *et al.*, 1998b; Franklin *et al.*, 2001). Por lo tanto, se deduce que el contenido interno de MAAs depende también de la latitud de recolección de las especies. La localización en la columna de agua también influía en la acumulación de MAAs, de manera que se encontraban mayores concentraciones de MAAs en especies que habitaban en el intermareal que en el submareal, donde la radiación solar es inferior (Karsten *et al.*, 1998b; Karsten y Wiencke, 1999; Hoyer *et al.*, 2001). A partir de estos antecedentes, se analizaron el contenido y composición de MAAs de diferentes especies de macroalgas marinas, recolectadas en distintos lugares geográficos y en distintas épocas del año; con el fin de determinar si existía un patrón taxonómico en la acumulación de MAAs, o bien, si se encontraba una correlación positiva entre el contenido interno de MAAs con la cantidad de radiación solar recibida.

En el siguiente diagrama (figura II.5.1) se recogen los órdenes de algas rojas citados en el capítulo, ordenados en función de las relaciones filogenéticas entre los mismos según la teoría cladista.

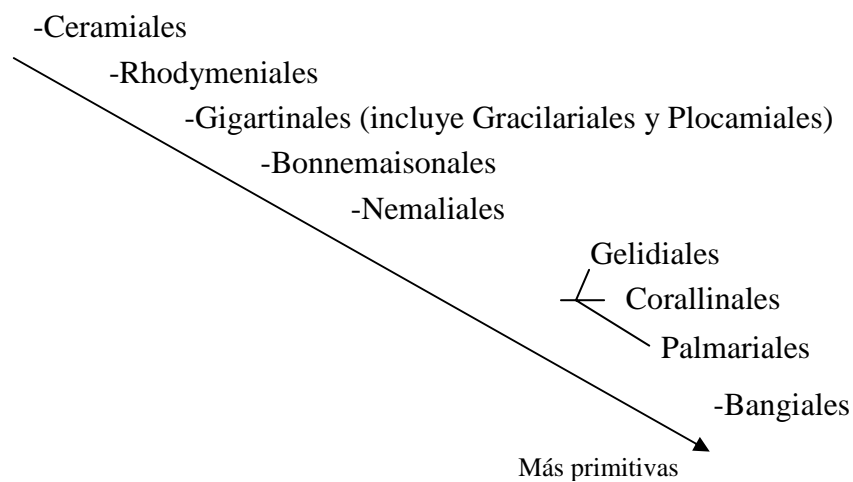


Figura II.5.1. Relaciones filogenéticas entre los órdenes de algas rojas. La distancia en la horizontal indica tiempo. Figura extraída del cladograma de Garbary y Gabrielson (1990), modificado a su vez de Grabielson y colaboradores (1985).

II.5.1. Contenido de MAAs en distintos grupos taxonómicos, latitudes y zonación.

II.5.1.1. Orden Bangiales:

Las especies pertenecientes a este grupo fueron las que presentaron mayores concentraciones de MAAs de todas las especies analizadas. Dentro del grupo, *P. columbina* se caracterizó por una concentración de MAAs inferior al resto, seguida de *P. leucosticta* y *P. purpurea*. Estas últimas con una concentración similar a *B. atropurpurea*. Las de mayor concentración fueron *P. yezoensis* y *P. umbilicalis*. Los ejemplares del hemisferio norte fueron recolectados en otoño, y aquellos pertenecientes al hemisferio sur en primavera, excepto *P. purpurea* que se recolectó en verano. No se observó una correlación positiva entre la dosis de radiación recibida en el lugar de recolección y el contenido interno en MAAs, puesto que los ejemplares de *P. columbina* estuvieron expuestos a mayores dosis (según los datos mostrados en la tabla II.2.1) y presentaron las menores concentraciones de MAAs y los ejemplares de *P. umbilicalis* que recibieron menores dosis de radiación presentaron una concentración superior de MAAs. Aunque se observó que las especies *P. leucosticta* y *P. purpurea*, con similar contenido interno de MAAs, recibieron también similares dosis de radiación, puesto que la dosis mensual de agosto en Noruega puede asimilarse a aquella recibida en otoño en Málaga (Häder *et al.*, 2001), ya que a pesar de que la irradiancia es mayor en las latitudes más bajas, el número de horas de luz es menor (Lebert *et al.*, 2002). Pero además se observó que ejemplares de *P. columbina* más expuestos a la radiación solar (tipo sol) presentaron una concentración de MAAs significativamente inferior que aquellos ejemplares menos expuestos (tipo sombra), que vivían en zonas de mayor profundidad y sombreadas. Al contrario de las conclusiones que se extraen de la literatura, donde se relaciona una mayor dosis de radiación solar recibida con una mayor concentración interna de MAAs (Karsten *et al.*, 1998b). Además los ejemplares de tipo sol se caracterizaron por poseer una menor proporción de porphyrina-334, relativa a la concentración total de MAAs, y unas proporciones relativas para shinorine y palythine mayores que en los ejemplares de sombra. En el estudio de *P. columbina* recolectada en Chile durante el verano austral, se observó una mayor concentración de MAAs cuando habitaban zonas de sol, aunque las diferencias respecto a los ejemplares de zona de sombra sólo eran significativas por la tarde (Huovinen *et al.*, en revisión), en cualquier caso, siempre fueron superiores las concentraciones de MAAs que en los ejemplares de *P. columbina* analizados en este trabajo. Además determinaron que *P. columbina* de tipo sol poseía un mayor porcentaje de asterina-330 y palythanol que los ejemplares adaptados a vivir en zonas más sombreadas (Huovinen *et al.*, en revisión).

Se puede encontrar en la literatura más referencias al orden Bangiales, en general, se apunta a que es el grupo en el que se encuentran las mayores concentraciones de MAAs. Sin embargo,

ejemplares de *P. umbilicalis* recolectados en la Isla de Appledore (Maine, Australia, 42°59'N), aún habitando en una zona templada y siendo recolectados en el mes de junio, presentaron un contenido total de MAAs (expresado como $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{proteínas}$) inferior a otras especies de algas rojas como *Cystoclonium purpureum*, *Corallina officinalis* y *Mastocarpus stellatus* (Banaszak *et al.*, 1998). Además encontraron que el contenido de mycosporine-gly fue muy superior al presentado en este capítulo, un 14% frente, a lo sumo, un 1.5% en *P. columbina* (Chile). Además las concentraciones de MAAs para *C. purpureum* y *C. officinalis* mostradas en el apartado II.3 fueron de 0.04 y de 0.7 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$, respectivamente, por lo tanto, los resultados obtenidos por aquellos autores no coinciden con los mostrados en este capítulo.

Karsten y colaboradores (1998b) determinaron que *Porphyra purpurea-violacea* de la Isla de Helgoland (recolectada en agosto de 1997) poseía la mayor concentración de MAAs respecto a las demás especies analizadas en dicha Isla ($3.4\pm 0.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$). Concentración similar a la de *P. columbina* de este trabajo. Sin embargo, en este mismo artículo también encontraron otras especies con esta misma concentración en Spitsbergen (Antártica), donde la dosis de radiación era inferior al caso de la Isla de Helgoland, estas especies fueron *Devaleraea ramentacea* y *Palmaria palmata*. También se mostraba el contenido de MAAs en especies recolectadas de la zona de Tarifa y Punta Carnero (Cádiz) y se observaba que superaban con creces estas concentraciones, llegando incluso a $7.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ en *Gymnogongrus griffithsiae* (Karsten *et al.*, 1998b). Se apuntó a que los MAAs regían la distribución biogeográfica de las especies, aquellas de zonas cálidas presentarían una mayor concentración de MAAs (Karsten *et al.*, 1998b). Frente a la concentración de MAAs no muy alta en el trabajo anterior, *P. umbilicalis* de la Isla de Helgoland recolectada en el mes de febrero poseía una concentración de aproximadamente $10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ (Gröniger *et al.*, 1999), similar a la presentada en este capítulo. También encontraron una concentración de MAAs próxima a $10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ en *Porphyra endiviifolium*, recolectada en Potter Cove, Isla Shetland (Antártica) durante el verano austral (Hoyer *et al.*, 2001), sin embargo, cuando esta especie se mantenía en cultivo durante meses la concentración caía un 50% (Hoyer *et al.*, 2001, 2002).

II.5.1.2. Orden Bonnemaisoniales:

Dentro de este grupo se estudió concretamente el género *Asparagopsis*, en el que la concentración de MAAs fue muy variada. En *A. armata* recolectada en Tarifa (Cádiz), se observó que cuánto mayor era la dosis mensual de radiación solar, menor era la concentración de MAAs. Sin embargo, en Gran Canaria (Islas Canarias) *A. taxiformis* presentó una mayor concentración de MAAs en octubre de 2001 que en febrero de 2001, correlacionándose en este caso la cantidad de radiación recibida con el contenido de MAAs. Sin embargo, en septiembre de 1999 la concentración de MAAs fue intermedia entre los dos casos anteriores, a pesar de que

se trata del mes de los tres estudiados, en el que la dosis mensuales de radiación fueron superiores. *Asparagopsis* sp. recolectada en junio de 2002 en Albufeira (Portugal) presentó una concentración total de MAAs similar a *A. taxiformis* recolectada en el mes de octubre de 2001, a pesar de que la dosis de radiación recibida en el sur de Portugal en junio era superior. Las proporciones relativas respecto a la concentración total de MAAs fueron muy similares en todos los casos, entre el 60-70% de shinorine y entre el 25-40% de palythine, principalmente. Estas proporciones fueron las mismas que en ejemplares de *A. armata* recolectados en Punta Carnero (Cádiz) en julio de 1997, sin embargo, la concentración para esta última especie fue muy superior a la que se refleja en este capítulo para julio de 1999, $4.14 \pm 0.25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$ (Karsten *et al.*, 1998b), aunque sí se asemejó a la que se había determinado para esta misma especie en octubre de 2001. *A. taxiformis* recolectada en abril de 1992 en la Isla de Hainan (China) aún tratándose de una zona tropical presentó una concentración de MAAs de $0.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$, muy inferior a la de este capítulo para esta misma especie, además la proporción de shinorine y palythine fue de un 50% cada una de ellas (Karsten *et al.*, 1998c).

II.5.1.3. Orden Ceramiales:

Dentro de la familia Ceramiaceae se encontraron distintas concentraciones de MAAs incluso dentro del mismo género, como por ejemplo, para *Ceramium* se encontraron valores entre $0.09\text{-}2.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$. Aunque la concentración de MAAs fue similar en las especies *C. strictum* y *Ceramium* sp. recolectadas durante el mes de noviembre en Argentina y Chile, también los tipos de MAAs fueron similares, aunque la especie de Chile presentó un 6% aproximadamente de palythinol, y la de Argentina un 1% de mycosporine-gly. En todos los casos de la familia la proporción de shinorine fue superior a la de palythine, excepto en *C. nodulosum* (Argentina). También dentro de la misma especie se encontraron diferencias en el contenido total de MAAs y también en la proporción de los distintos tipos, *C. nodulosum* presentó una mayor concentración en los ejemplares recolectados en Argentina que en aquellos recolectados en Alemania, a pesar de que la dosis mensual de radiación solar recibida para los primeros de ellos fue inferior a la que recibieron los segundos; concretamente la dosis de radiación solar en Argentina para noviembre fue de $255 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ para PAR, y de $37.5 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ y $0.84 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ para UVA y UVB, respectivamente; y la dosis mensual en Helgoland en julio fue de $256 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ para PAR, y de $50.5 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ y $1.5 \text{ MJ} \cdot \text{m}^{-2}$ para UVA y UVB, respectivamente. Aunque no se detectó una relación positiva del contenido de MAAs con la dosis mensual recibida, las dosis anuales sí son superiores en el Sur del continente americano (tabla II.2.1). La proporción de palythine en *C. nodulosum* de Alemania fue muy pequeña y el porcentaje de porphyra-334 respecto al total de MAAs fue del 34%, al contrario que otras especies del género que sólo tenían trazas de este MAA. *Callithamnion gaudichaudii*, a pesar de tener una

morfología similar a *Ceramium* (ambos están constituidos por talos de aspecto filamentosos finos) y de habitar zonas de similar latitud a otras especies del grupo, presentó una composición de MAAs distinta, casi la totalidad de MAAs la componía porphyra-334. En la literatura se encontró que ejemplares de *Ceramium rubrum* (sinónimo: *C. nodulosum*) recolectados en la Isla de Helgoland en septiembre de 1997 presentaron una concentración similar a la reflejada en este capítulo, sin embargo, la proporción de los MAAs fue distinta, observaron que la mayor parte del total de MAAs era shinorine, y no detectaron la presencia de porphyra-334 ni palythine como en los resultados mostrados en este capítulo (Karsten *et al.*, 1998b). *C. nodulosum* recolectado en Tarifa en noviembre de 1997, presentó una concentración de MAAs excepcionalmente superior ($7.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$) que las determinadas para las especies de este grupo, aunque las proporciones relativas de los MAAs sí coincidieron con la generalidad de los resultados para este grupo mostrados en este capítulo (Karsten *et al.*, 1998b). También se encontraron otras referencias a este grupo de macroalgas en la tabla de la página web <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/rhodophyta.htm>, sin embargo, para muchas de las especies no se muestran los resultados, únicamente se enumeran, pero sin adjuntar los datos de MAAs. Además para los casos en que sí aparecía dicha información, únicamente se señalaban los tipos de MAAs presentes, y no la proporción o concentración en que aparecían cada uno de ellos. *C. rubrum* de Playa Unión (Argentina), de Sylt y Helgoland (Alemania) poseían palythine y shinorine. Y *C. tenuissimum* recolectada en Plymouth (Inglaterra) presentaba porphyra-334. Como se puede observar la variedad de MAAs es inferior, aunque se hace referencia a los mismos tipos de MAAs. También en esta misma tabla se recogen las especies *Anthithamnion plumula*, aunque sin resultados adjuntos, y *Callithamnion gaudichaudii*, en la que detectan los mismos tipos de MAAs que en este trabajo de investigación.

En la familia Delesseriaceae, las dos especies de *Myriogramme* analizadas (*M. multinervis* y *M. smithii*) presentaron una concentración baja de MAAs, y las proporciones de MAAs fueron similares, entre un 80-90% de shinorine y un 15-20% de porphyra-334. Ejemplares de *M. mangini* y *M. smithii* recolectados en Potter Cove, presentaron en el primero de los casos una concentración de MAAs superior a las especies analizadas, concretamente de $2.93\pm 1.3 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ y en el segundo, al contrario de lo que se presenta en este capítulo, no se detectaron MAAs, las proporciones de MAAs sí fueron similares (Hoyer *et al.*, 2001).

En la familia Rhodomelaceae, también se observó dentro de un mismo género que la concentración y proporción relativa de los distintos tipos de MAAs fue distinta, concretamente se observó que *Bostrychia scorpioides* presentaba una concentración de MAAs inferior a la especie de *Bostrychia* recolectada en Chile, además la primera de ellas poseía un 87% de porphyra-334, mientras que la otra *Bostrychia* analizada, presentó shinorine como MAA más

abundante. En la literatura se han encontrado referencias a muchas especies de este género, concretamente todas ellas habitaban zonas de manglares tropicales o subtropicales y fueron recolectadas en distintas épocas del año, en general, las concentraciones se encuentran entre 0.02 y 4.9 mg·g⁻¹PS y las proporciones de los distintos MAAs son muy variadas, algunas de estas especies presentaron palythine, palythinol, asterina o incluso porphyra-334 como principal MAAs y por ejemplo *B. scorpioides* a pesar de presentar una concentración similar a la reflejada en este capítulo, poseía como principal MAA shinorine (Karsten *et al.*, 1998c, 2000).

En el género *Laurencia*, se observó a medida que se avanzaba en el tiempo que la concentración de MAAs para una misma especie y lugar de recolección aumentaba. Ocurrió tanto en los ejemplares recolectados en Tarifa como aquellos recolectados en Gran Canaria. Sin embargo, en los ejemplares de *L. obtusa* recolectados en el Cabo de Gata la concentración y proporción relativa de los MAAs se mantuvo tanto en octubre de 2000 como en junio de 2001, a pesar de que en este segundo periodo la dosis de radiación solar recibida fue bastante superior. En *L. pinnatifida* recolectada en Tarifa, se observó que cuánto mayor era la dosis de radiación solar recibida menor era la concentración de MAAs, al igual que ocurría con *A. armata*. Además conforme iba aumentando la radiación la proporción de porphyra-334 aumentaba y caía la de palythine y palythinol. En la especie de *Laurencia* recolectada en Gran Canaria la concentración total de MAAs fue similar en febrero y en octubre de 2001, sin embargo, en septiembre de 1999 coincidiendo con una mayor dosis de radiación solar, de nuevo encontramos la menor concentración de MAAs. Además se determinaron diferencias en las proporciones relativas de los distintos tipos de MAAs; en febrero en vez de shinorine presentaron mycosporine-gly, y más porphyra-334 que palythine, al contrario que en septiembre y al igual que en octubre. Ya en 1990, Sivalingam y Nisizawa apuntaron a que el género *Laurencia* se encontraba entre las algas rojas con menor contenido de sustancias que absorbían en el rango del UV. Ejemplares de *L. obtusa* recolectados en Punta Carnero en julio de 1997 se caracterizaron por una concentración de MAAs de 2.6 mg·g⁻¹PS (Karsten *et al.*, 1998b), superior a la mostrada en este capítulo. Además la proporción relativa de los MAAs también difirió, poseían alrededor de un 30% tanto de asterina-330 como de palythine, un 19% de porphyra-334, un 12% de shinorine y el resto de palythinol (Karsten *et al.*, 1998b). Aunque las concentraciones fueron similares a las nuestras, en *L. changii* y *L. cartilaginea* recolectadas en abril de 1992 en Hainan (China), 0.41 y 0.27 mg·g⁻¹PS respectivamente, las proporciones de los MAAs difirieron, en ambas el MAA principal fue palythinol, seguido de palythine, porphyra-334 y asterina-330 en menor proporción (Karsten *et al.*, 1998c). *L. pinnatifida* de Plymouth (Inglaterra) presentó un 100% de porphyra-334, aunque se desconoce la concentración total de MAAs (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/rhodophyta.htm>).

Los últimos dos géneros estudiados dentro de la familia Rhodomelaceae fueron *Polysiphonia* y *Streblocladia*, esta última especie presentó una concentración de MAAs de 2.8 mg·g⁻¹PS, alta para los valores generales determinados para esta familia. *P. lanosa* presentó una concentración de MAAs superior a las otras dos especies analizadas dentro de este mismo género, las cuales se caracterizaron por poseer una concentración similar y baja de MAAs, y además la especie de Argentina no poseía porphyra-334 y sin embargo, en las otras dos especies suponía respectivamente, un 79 y un 33% del total de MAAs. *P. arctica* (Spitsbergen) y *P. elongata* (Helgoland), presentaron unas concentraciones de 0.73 y de 0 mg·g⁻¹PS respectivamente, la proporción de los distintos MAAs en el primero de los casos difirió con respecto a la de este trabajo de investigación, el MAA mayoritario fue palythine, seguido de un MAA desconocido con un máximo a 357 nm y por último, presentaban un poco de shinorine, porphyra-334 y asterina-330 (Karsten *et al.*, 1998b). *P. fastigiata* (sinónimo: *P. lanosa*) (Plymouth) poseía palythine, palythanol, porphyra-334 y shinorine y *P. urceolata* (sinónimo: *P. stricta*) (Sylt) palythine y shinorine (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/rhodophyta.htm>), en esta última especie también se detectó la presencia de porphyra-334.

II.5.1.4. Orden Corallinales:

La familia Corallinaceae se caracterizó por poseer unas concentraciones de MAAs muy bajas, a pesar de que en la mayoría de los casos los ejemplares se encuentran expuestos directamente a la radiación solar en cubetas de poca profundidad. La morfología de su talo calcificado supondría una barrera a la penetración de la RUV. Dentro de este grupo existe una gran homogeneidad en los resultados. En general, las concentraciones no varían ni entre especies, ni entre las épocas del año y tampoco entre los lugares de recolección. Del 50-70% del total de MAAs formaba parte shinorine, junto con un 20% aproximadamente de palythine y en algunos casos pequeñísimas proporciones de asterina-330 y porphyra-334. Caben destacar las especies de *Corallina*, *Jania* y *Lithophyllum* recolectadas en Albufeira, las tres presentaron una concentración ligeramente inferior al resto del grupo y además, en el primer caso la proporción de shinorine fue superior y en el segundo caso inferior, además *J. rubens* en vez de palythine, poseía porphyra-334 como segundo MAA en importancia. *Amphiroa rigida* y *Lithophyllum expansum*, ambas recolectadas en Giglio, también presentaron una concentración de MAAs inferior al resto del grupo, más marcada incluso que en los casos anteriores. *J. rubens* (Gran Canaria) presentó una concentración de MAAs inferior en el mes de febrero de 2001 que en septiembre de 1999, además mientras que en septiembre la proporción de shinorine fue de un 41% y de un 55% para palythine, en febrero fueron de un 83 y 15%, respectivamente. Este es el único caso estudiado del grupo en el que se podría asociar una menor dosis de radiación solar recibida con un menor contenido en MAAs, y además parece ser que durante el periodo de más

radiación existe preferencia a la acumulación de palythine frente a shinorine. Al igual que *Laurencia* sp., *Jania* sp. se encontraba entre las especies con menor contenido de compuestos que absorbían en la región del UV (Sivalingam y Nisizawa, 1990). *C. officinalis* (Helgoland) presentó un 100% de shinorine con una concentración total de $0.19 \pm 0.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$ (Karsten *et al.*, 1998b), al contrario que la misma especie recolectada en Maine que poseía un 77% de shinorine y un 33% de mycosporine-gly, además con una concentración total muy superior (Banaszak *et al.*, 1998). *C. elongata* (Tarifa, noviembre 1997) presentó una concentración de MAAs de $0.21 \pm 0.04 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$, siendo un 55% shinorine y el resto palythine, resultado similar al de este trabajo, aunque en este caso la concentración total de MAAs y la proporción de shinorine fueron inferiores. *J. rubens* y *L. incrustans* (Punta Carnero, julio 1997) presentaron unas concentraciones de MAAs superiores a las mostradas en este capítulo, concretamente 1.5 y $0.96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$, además las proporciones de los diferentes MAAs fueron distintas. Para *J. rubens* el total de MAAs lo componían casi en un 50% cada uno, shinorine y porphyra-334. Y para *L. incrustans* casi la totalidad de MAAs era shinorine y un pequeño porcentaje de MAAs lo componía porphyra-334 (Karsten *et al.*, 1998b). Coincidiendo con la generalidad de los resultados de este capítulo, cuatro especies de *Corallina* sp. poseían shinorine y palythine, pero por el contrario, otras tres poseían únicamente shinorine entre los MAAs, de nuevo no se conocen las proporciones relativas ni la concentración total de MAAs (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/rhodophyta.htm>). En esta misma fuente se presentan, además, 4 especies de *J. rubens* que poseen, coincidiendo también con los resultados de este capítulo, shinorine y palythine.

II.5.1.5. Orden Gelidiales:

En la familia Gelidiaceae, se encontraron resultados muy diversos en términos de concentración total de MAAs. Sin embargo, se mantuvo un patrón en la composición de MAAs, principalmente poseían shinorine en un porcentaje que superaba el 80%. La única excepción fue *G. sesquipedale*, cuyo MAA principal fue asterina-330, representando más de un 70% del total. El segundo MAA en importancia fue palythine, que presentó una mayor plasticidad en el grupo, las especies *Gelidiella* sp., *G. arbuscula* y *G. latifolium* presentaron las menores proporciones de palythine, en el resto de las especies este MAA representaba aproximadamente un 15%, excepto algunos casos puntuales en *G. sesquipedale* o en las especies del género *Pterocladia*, especies en las que se observaron mayores fluctuaciones. En ninguno de los casos se observó la presencia de mycosporine-gly y sí de asterina-330, y eventualmente de porphyra-334. En la especie *G. canariense*, a pesar de que la concentración total no varió entre los meses de septiembre y febrero, la composición de MAAs sí presentó cambios, en el mes de mayor dosis

de radiación solar la proporción de palythine fue de un 15%, siendo el resto shinorine, y en el mes de menos dosis de radiación se observó casi exclusivamente la presencia de shinorine.

La mayor concentración de MAAs en la familia Gelidiaceae la encontramos en la especie *G. pusillum*, aproximadamente $5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$, seguida de *G. arbuscula* y *G. latifolium*. La concentración de esta última especie recolectada en una grieta esciáfila en el mes de febrero en Gran Canaria fue inferior significativamente a las recolectadas en Tarifa, las cuales recibían una mayor radiación. Este sería otro de los casos puntuales en los que se observó una correlación positiva entre la cantidad de radiación recibida y la concentración de MAAs. La concentración de MAAs fue superior en la especie *Gelidiella* sp. recolectada en Tarifa, que aquella recolectada en Portugal. Sin embargo, no se observaron cambios en la concentración total de MAAs en *G. canariense* ni en *G. sesquipedale* recolectados en distintas épocas del año del mismo lugar, ambas especies, presentaron unas concentraciones totales medias dentro del grupo. *G. sesquipedale* de la Albufeira recolectado en verano presentó una concentración de MAAs muy inferior, de las menores del grupo. *G. sesquipedale* se caracteriza por comportarse como una especie de sombra y según los resultados que se han mostrado en el capítulo se observa que no posee la capacidad de acumular grandes cantidades de MAAs, esta baja concentración junto con otras ausencias de otros mecanismos de protección y/o reparación hacen que esta especie sea muy sensible a la RUV, de manera que sufre fotoinhibición crónica (Gómez y Figueroa, 1998). *P. capillacea*, que también presentó de las concentraciones más bajas de MAAs del grupo, no varió su concentración entre los distintos meses de muestreo para los ejemplares recolectados de un mismo lugar, Cabo de Gata y Gran Canaria. Sin embargo, sí que se detectaron pequeñas diferencias entre los ejemplares recolectados en distintas latitudes, la concentración fue inferior en los talos recolectados en Gran Canaria y Tarifa.

G. pusillum y *G. sesquipedale* de Punta Carnero (julio 1997), presentaron concentraciones superiores a las mostradas en este capítulo, 6.5 ± 0.6 y $2.9\pm 0.2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ respectivamente. Aunque las proporciones relativas de los distintos tipos de MAAs sí fueron similares (Karsten *et al.*, 1998b). *Gelidiella acerosa* de la Isla de Hainan (China) presentó una concentración igual a *G. nigrescens* de Tarifa, aunque las proporciones de palythine y asterina-330 en aquella fueron superiores a las de ésta (Karsten *et al.*, 1998c). De manera similar al resultado obtenido en este trabajo, *P. capillaceae* recolectada en Cádiz, presentaba un 100% de shinorine (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html\rhodophyta.htm>). Referencias en dicha tabla al género *Gelidium*, informan de que en general los MAAs que detectaron fueron shinorine y palythine.

II.5.1.6. Orden Gigartinales:

En este grupo se encontraron altas concentraciones de MAAs en las familias Phyllophoraceae, Peyssonneliaceae, Halymeniaceae y Rissoellaceae, con un general dominio de shinorine entre los MAAs. Las concentraciones de MAAs se encuentran en torno a 2.5 mg·g⁻¹PS. Shinorine es el MAA presente casi en un 100% en los ejemplares analizados de la familia Phyllophoraceae, excepto en *G. furcellatus*, caracterizado por un 30% de palythine junto a un 70% de shinorine. No se encontró un patrón estacional ni latitudinal entre los ejemplares estudiados de este grupo. Tampoco en *Peyssonnelia* sp. se identificó un patrón estacional, la concentración de MAAs no varió entre los meses de octubre y junio.

Las menores concentraciones del orden Gigartinales, las encontramos en las especies *Callophyllis variegata*, *C. purpureum* y *Dumontia incrassata*. En las que el 100% del total de MAAs estuvo compuesto por shinorine, excepto en la última especie en la que estaban presentes shinorine y porphyra-334 en unos porcentajes del 69 y 26%, respectivamente. La proporción relativa de MAAs para *D. incrassata* en este trabajo resulta de la combinación de composiciones presentes en la tabla de la página web <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik/html/rhodophyta.htm> para *Dumontia* sp, estos autores determinaron que la composición de *D. incrassata* recolectada en dos años consecutivos varió desde poseer sólo shinorine, hasta tener porphyra-334 y palythine (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik/html/rhodophyta.htm>).

En la familia Gigartinaceae se encontró una gran variedad de concentraciones y proporciones relativas de MAAs, la máxima concentración se encontró en *Mazzaella laminarioides* y las mínimas se determinaron en una de las especies de *Chondracantus* y en *Gigartina* sp. Una concentración similar a la de este trabajo la encontraron en *M. laminarioides* recolectada en Chile durante el verano austral (Huovinen *et al.*, en revisión).

En la familia Caulacanthaceae aunque la concentración también fue muy variada, las proporciones de MAAs se mantuvieron en el grupo, shinorine y palythine aparecían en igual importancia en el total de MAAs. Destaca la baja concentración de *Caulacanthus* sp. recolectado en Albufeira, justo en el mes en el que la dosis de radiación solar fue superior respecto a los demás casos del grupo, además esta especie fue la única que presentó una composición de MAAs diferente al resto de ejemplares, se caracterizó por una composición y proporción de MAAs similar a la del orden Bangiales.

La concentración y composición de MAAs en ejemplares de *C. crispus*, *C. purpureum* y *M. stellata* recolectados en junio de 1993 en Maine fueron distintas a las obtenidas en este trabajo de investigación. Las dos últimas especies contenían aproximadamente un 70% más de MAAs

que *P. umbilicalis*, y *C. crispus* presentaba una concentración similar a esta última especie. Además la proporción de mycosporine-gly que encontraron en todos los casos, fue muy elevada y en este capítulo nisiquiera estuvo presente (Banaszak *et al.*, 1998). Sin embargo, sí se obtuvieron similares resultados a los del presente trabajo en ejemplares de *C. crispus* y *M. stellatus* recolectados en Helgoland, en julio de 1997, la primera especie poseía 4.5 veces menos MAAs que la segunda, aunque en ésta, en lugar de asterina-330 detectaron palythinol, además de palythine (Karsten *et al.*, 1998b). Tampoco detectaron asterina-330 en ninguna de las especies de *Chondrus* que se recogen en la tabla de la página web <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/rhodophyta.htm>. *M. stellatus* y *C. crispus* recolectados en Helgoland en junio de 1999, presentaron distinta sensibilidad frente a la RUV, *M. stellatus* era más resistente y le permitía vivir en áreas más expuestas a la radiación solar, esta mayor resistencia en parte se atribuyó a que poseía una concentración de MAAs seis veces superior (Bischof *et al.*, 2000). La especie *Gymnogongrus griffithsiae* recolectado en la provincia de Cádiz, presentó una concentración de MAAs dos veces superior que la de especies del mismo género recogidas en este capítulo (Karsten *et al.*, 1998b). Cuando se mantenía en cultivo *Gigartina skottsbergii* la concentración de MAAs era 3.3 veces menor que en el momento de su recolección del hábitat natural (Potter Cove, Antártica), además la proporción relativa de los MAAs también variaba, en su hábitat se observaba palythine como principal MAA y shinorine como secundario, y en cultivo el principal MAA era porphyra-334 y el secundario palythine (Hoyer *et al.*, 2002). La concentración de MAAs en *Gigartina* sp. presentada en este capítulo fue próxima a aquella de cultivo, y además, principalmente se detectaba la presencia de asterina-330. La concentración y composición de MAAs en *Gymnogongrus antarcticus* recolectado en Potter Cove (Antártica) fue muy similar a la de ejemplares del mismo género analizados en este trabajo de investigación (Hoyer *et al.*, 2002). De nuevo se observó una caída de la concentración total de MAAs cuando *G. turquetii* se mantenía en cultivo, aunque en este caso la composición de MAAs sí se mantenía (Hoyer *et al.*, 2001).

En la familia Halymeniaceae, se observaron diferencias entre las especies, tanto en composición como en concentración. *G. doryphora* presentaba principalmente porphyra-334 y en segundo lugar shinorine, al igual que *G. lanceolata*. *G. turuturu* presentó gran cantidad de shinorine y el resto de palythine. La concentración de MAAs tras el cultivo de ejemplares de *G. dichotoma* y *G. doryphora* en una alta concentración de amonio, fue similar a la encontrada en los ejemplares de *G. turuturu*. Tras el cultivo en alta concentración de amonio *G. dichotoma*, además de incrementar la concentración de MAAs, presentó una composición diferente, desde un valor equitativo entre shinorine y palythine hacia un dominio casi absoluto de shinorine. La concentración de MAAs en *G. lanceolata* fue similar a la de *G. dichotoma* recolectada en su hábitat natural. En todos estos casos estudiados para el grupo Halymeniaceae, la concentración

de MAAs fue inferior que la que encontraron en *G. doryphora* recolectada en Chile, que estuvo entre 3.5 y 4.4 mg·g⁻¹PS (Huovinen *et al.*, en revisión).

A pesar de que se citan ocho especies de *Grateloupia* sp. y *Peyssonnelia* sp. en la tabla que se recoge en la página web <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/rhodophyta.htm>, no se completó la composición de MAAs para ninguno de ellos. Sí se recoge la información para *Gigartina acicularis*, que poseía una composición de MAAs diferente a la de este trabajo de investigación, detectaron shinorine y porphyra-334. Sí coincidió la composición de MAAs para *R. verruculosa* aún estando recolectada en otro lugar, concretamente Giglio (Italia) y en otra época del año, el mes de abril (<http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/html/rhodophyta.htm>).

II.5.1.7. Orden Gracilariales:

Entre las distintas especies del género *Gracilaria* se encontraron diferencias tanto en la concentración total de MAAs como en la composición de los mismos. *G. gracilis* presentó una menor concentración que otras especies, como por ejemplo *G. chilensis*, además el MAA más abundante en esta última especie fue porphyra-334, seguido de palythine, asterina-330, shinorine y por último también presentó un poco de palythinol, y en *G. gracilis* casi un 100% del total de MAAs lo compuso shinorine. La composición de MAAs en los ejemplares de *Gracilaria* sp. (Gran Canaria) fue de aproximadamente de un 40% de shinorine y un 55% de porphyra-334, y en *Gracilaria* sp. (Tarifa) de un 88% de shinorine y un 11% de palythine. También se detectaron diferencias en términos de concentración total y composición de MAAs en tres especies del género *Gracilaria* recolectadas en la Isla de Hainan (Karsten *et al.*, 1998c). No se observaron diferencias en la concentración ni en el composición de MAAs en *Gracilaria* sp. (Gran Canaria) entre los valores para los meses de febrero y octubre.

II.5.1.8. Ordenes Nemaliales, Palmariales, Plocamiales y Rhodymeniales:

Nothogenia fastigiata presentó una concentración de MAAs superior a la media en relación a los demás resultados obtenidos en este trabajo de investigación. Mientras que *P. palmata* se caracterizó por una concentración de MAAs muy baja. En otros trabajos se detectaron concentraciones para *Palmaria decipiens* de la Antártica de 2.7 mg·g⁻¹PS, además la composición e importancia relativa de los tipos de MAAs fue distinta (Karentz *et al.*, 1991b). *Lomentaria clavellosa* se caracterizó por tener una concentración intermedia entre las dos primeras especies citadas. Una concentración aún superior se detectó en esta misma especie también recolectada en la Antártica, concretamente 3.9 mg·g⁻¹PS. Aunque la proporción relativa de MAAs fue muy similar a la encontrada en este trabajo de investigación. También se observó que la concentración de MAAs caía 9 veces cuando esta especie se mantenía en cultivo (Hoyer

et al., 2001). En general, en los ejemplares de *P. cartilagineum* se detectó una homogeneidad en concentración y composición de MAAs, aunque fueron recolectados en distintas épocas y lugares del sur de la Península Ibérica. No se detectó absorción en el rango del UV en *P. cartilagineum* ni en *P. palmata* de Helgoland (Yakovleva *et al.*, 1998). *Lomentaria orcadensis* y *P. palmata* de Maine, presentaron una concentración total de MAAs muy similar, al contrario que los resultados mostrados en este capítulo. Además en *P. palmata* sólo se detectó la presencia de mycosporine-gly (Banaszak *et al.*, 1998). Otros ejemplares de *P. palmata* recolectados en Spitsbergen (Antártica) presentaron una concentración más elevada de MAAs (3.5 mg·g⁻¹PS). En el estudio de Karsten y colaboradores (1998b) no se detectaron MAAs en *P. cartilagineum* de Helgoland. Sin embargo, en ejemplares de *P. cartilagineum* recolectados en Potter Cove (Antártica) sí se detectaron MAAs en la misma concentración que en este trabajo, aunque con una proporción relativa de éstos diferente (Hoyer *et al.*, 2001).

II.5.1.9. Orden Dictyotales:

Como caso excepcional, en el alga parda *Lobophora variegata* se detectaron MAAs aunque en una concentración pequeña, próxima por ejemplo al alga roja *D. incrassata*. Sin embargo, en las demás especies de algas pardas y verdes analizadas (tablas M.2 y M.3), no se detectó la presencia de MAAs, a lo sumo se detectaron trazas, que por estar por debajo del límite de detección del equipo de HPLC no se pudo confirmar que se tratase de MAAs.

II.5.1.10. Síntesis:

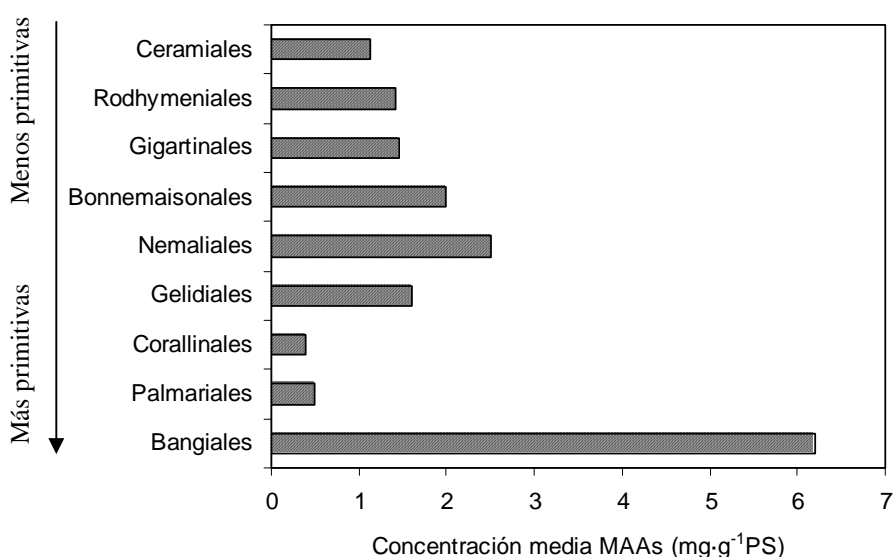


Figura II.5.2. Concentración media de MAAs en cada uno de los órdenes de las algas rojas analizadas.

No se observó relación alguna entre la filogenia de las especies analizadas y el contenido interno de MAAs (figura II.5.2). Sin embargo, las mayores concentraciones de MAAs se encontraron en el orden Bangiales. La familia Corallinaceae (Corallinales) presentó las menores concentraciones, inferiores a $1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ y con una media entre $0.4\text{-}0.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$. La concentración de MAAs en las familias Gracilariaceae (Gracilariales) y Plocamiaceae (Plocamiales) estuvieron en torno a 1.5 y $1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ respectivamente, y en la familia Phyllophoraceae (Gigartinales) alrededor de $2.5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$. Otros grupos en los que se analizaron un número de especies superior a cinco, presentaron concentraciones muy diversas según las especies y/o según su localización y/o época del año en que se recolectaron, entre estos se encuentran las familias Bonnemaisoniaceae, Rhodomelaceae, Gelidiaceae, Gigartinaceae y Caulacanthaceae.

El MAA común a todas las especies analizadas fue shinorine, aunque la proporción relativa varió según los casos. En la familia Bonnemaisoniaceae estuvo presente en un alto porcentaje, más de un 60%. En las familias Ceramiaceae, Phyllophoraceae y Corallinaceae, en general también estaba presente en grandes cantidades. En otros grupos como la familia Gelidiaceae, estaba ampliamente representada salvo en *G. sesquipedale*.

Palythine fue el segundo de los MAAs en importancia relativa. Estuvo presente en casi todas las muestras analizadas. En un 30% aproximadamente en el género *Asparagopsis*. Y en el resto de especies en una proporción muy variada. Asterina-330 fue el MAA que le siguió en representación a palythine. En la mayoría de los casos en una proporción inferior a un 10%, excepto en *G. sesquipedale* en la que representa un 75% del total de MAAs.

A continuación porphyra-334, que dominaba en el orden Bangiales, especies en las que se encuentra representada en más de un 80%. En general en la familia Rhodomelaceae también se encontraron importantes cantidades de este MAA, con más de un 30% en la mayoría de los casos, llegando incluso hasta un 87% puntualmente. En el resto de las muestras analizadas la proporción relativa al total de MAA fue muy baja (aproximadamente un 2%), excepto casos puntuales en los que esporádicamente se alcanzaron altas concentraciones de porphyra-334.

El MAA menos común fue palythinol, presente casi exclusivamente y en un pequeño porcentaje en algunas de las especies del género *Laurencia*. El siguiente MAA menos común fue mycosporine-gly, presente también en pequeñas cantidades en algunas especies del orden Bangiales, y de las familias Rhodomelaceae y Caulacanthaceae, excepto en algunos casos puntuales en los que rondó el 25%. Es curioso que, al contrario que en las macroalgas en las que el porcentaje de mycosporine-gly no es muy elevado, el líquen *Lichenia pygmaea* recolectado

en la Isla de las Palomas (Tarifa, Cádiz) presentaba una concentración total de MAAs de $1.5 \pm 0.3 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$, de la que un 100% era mycosporine-gly.

Se concluye que la síntesis y acumulación de MAAs en los distintos grupos taxonómicos estudiados es un proceso muy flexible, en el que estarían influyendo gran cantidad de factores, entre los que se podrían destacar los ambientales y los genéticos. De manera que, en función de las condiciones lumínicas, la concentración de nutrientes, y siempre que se posea la carga genética que posibilite la síntesis de estos compuestos, podrían acumularse. A pesar de no haberse encontrado una respuesta inductora de la RUV en la síntesis de MAAs, no se puede descartar su función como potencial fotoprotector, puesto que por su estructura química y por sus propiedades físicas se conoce que son moléculas que apantallan eficazmente la RUV.

II.5.2. Estacionalidad:

Tal y como se apuntó anteriormente, el MAA más abundante en las dos especies del orden Bangiales fue porphyra-334 (80-90%), siendo las proporciones de shinorine, palythine y asterina-330 similares e inferiores a un 10% en *P. leucosticta*, al igual que en *B. atropurpurea*, sin embargo, en esta última especie la presencia de palythine fue muy inferior en todos los meses estudiados. Las especies *Caulacanthus* sp. y *Corallina* sp. presentaron unas concentraciones de MAAs al menos 3 veces inferiores a las Bangiales, como MAA principal poseían shinorine, seguido de palythine. Además *Caulacanthus* sp. tenía una pequeña proporción de porphyra-334 y *Corallina* sp. de asterina-330.

En *B. atropurpurea* y *P. leucosticta* la concentración total de MAAs fue aproximadamente de $6.5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$, observándose una disminución significativa de dicha concentración en el mes de marzo, coincidiendo con la cercana desaparición de la fase gametofítica (haploide) debido a un incremento en el fotoperiodo y en la temperatura del agua. Por lo tanto, se mantuvo de manera general una concentración interna muy elevada independientemente del incremento en la dosis de radiación solar o cualquier otra variación de las condiciones ambientales; es más, se produjo una caída de la concentración coincidiendo con el mes en el que se incrementaban considerablemente las dosis diarias de radiación solar. Karsten y West (2000) estudiaron también un ciclo de la fase gametofítica de *B. atropurpurea* de Melbourne (Australia), a pesar de que en esa zona la RUV era un 30% superior que en Málaga, la concentración durante los meses estudiados rondó $4.9 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$, inferior en aproximadamente $1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$ que la presentada en este capítulo. Aquellos autores tampoco encontraron un patrón en la acumulación de MAAs, y también observaron una disminución de la concentración a finales de febrero. Concluyeron que las especies del grupo de las Bangiales estaban adaptadas genéticamente a acumular en todo momento altas concentraciones de MAAs, lo que les permitiría vivir en las

zonas medias y altas del intermareal, soportando variaciones diarias y estacionales extremas de desecación, osmóticas y de radiación solar (Karsten y West, 2000). Hoyer y colaboradores (2001) identificaron también a las Bangiales como aquellas algas que poseían una concentración de MAAs elevada y que se mantenía constante independientemente de las condiciones ambientales.

Las especies que pertenecen al orden Bangiales se consideran primitivas debido a que poseen una organización vegetativa y reproductiva simple (Kraft y Woelkerling, 1990), son más ancestrales que otras algas rojas (Garbary y Gabrielson, 1990). Tuvieron que soportar elevados niveles de RUV desde el Paleozoico y por ello, al igual que concluyeron otros autores (Hoyer *et al.*, 2001), se sugiere que desarrollaron la capacidad de sintetizar MAAs y ese carácter se conservó hasta la actualidad.

Debido a que coincidió el mínimo de concentración de MAAs en *P. leucosticta* con el máximo recubrimiento rocoso por parte de esta especie, se podría pensar que los MAAs se emplearon como un reservorio de aminoácidos para la síntesis de proteínas, cuya concentración es muy elevada en este periodo de máximo recubrimiento, al igual que les ocurría al pool de aminoácidos totales (Hernández *et al.*, 1993b), al final del ciclo (mes de abril) se recuperó ligeramente el contenido interno de MAAs. En el trabajo citado anteriormente, también identificaron un incremento del pool de aminoácidos totales al final del ciclo, coincidiendo con un incremento en la concentración de nitrato interno y en el agua de mar, este incremento lo atribuyeron a una menor demanda de la síntesis de proteínas o a una hidrólisis de las mismas (Hernández *et al.*, 1993b). Según esos resultados se podría pensar en la existencia de un paralelismo entre el contenido de MAAs y el de aminoácidos totales en esta especie, aunque también hay que tener en cuenta que, en general, las variaciones que se observaron para el contenido en aminoácidos totales fueron muy superiores a las del contenido de MAAs a lo largo del ciclo.

El contenido total de MAAs en *B. atropurpurea*, en *Corallina* sp. y en *G. pusillum* se correlacionó de forma negativa con las dosis de radiación solar recibidas. Además en *Caulacanthus* sp., al igual que en *P. leucosticta*, se observaron menores concentraciones de MAAs en el mes en el que las dosis mensuales de radiación se incrementaban considerablemente. En *B. atropurpurea* y en *G. pusillum* se determinó además, una correlación positiva entre la dosis y el contenido de asterina-330 y palythine, lo contrario ocurría en *Corallina* sp.

El grado de asociación entre los MAAs se caracterizó, en general, por la existencia de una correlación positiva entre el contenido de asterina-330 y palythine, sin embargo, la correlación

entre el MAA mayoritario para cada especie (ya sea shinorine o porphyra-334) con los anteriores MAAs (palythine y asterina-330) fue negativa. Y en el orden Bangiales se determinó una correlación negativa entre el contenido de shinorine y porphyra-334.

De manera general se concluye que las menores concentraciones de MAAs en las especies estudiadas, coinciden con los periodos en los que la radiación solar recibida era superior. Además cuando las dosis de RUV eran superiores (implicando a su vez en la naturaleza, mayores dosis de PAR), se incrementaban las proporciones relativas de palythine y asterina-330 respecto a los demás MAAs presentes en el alga. Se sugiere la presencia de una reacción de interconversión desde shinorine y/o porphyra-334 hacia palythine y asterina-330, tal y como sugirieron otros autores (Shick *et al.*, 2000), estas reacciones de interconversión no implicarían una variación en la concentración total de MAAs, aunque se estarían produciendo en coincidencia con los periodos en los que las concentraciones de MAAs eran inferiores. Se podría relacionar este comportamiento con una adaptación de las especies a unas dosis mayores de radiación, de manera que acumulando palythine que absorbe a una longitud de onda inferior ($\lambda_{\text{máx}}=320$ nm) que shinorine ($\lambda_{\text{máx}}=334$ nm) se podría filtrar más eficientemente parte de las bandas más efectivas en términos de daño celular. Kräbs y colaboradores (2002) propusieron en el alga roja *C. crispus* la interconversión de shinorine a palythine vía asterina-330 y palythinol, propusieron que en esta ruta intervendrían enzimas que se estimularían con PAR o se inhibirían por RUV. Mientras que en la interconversión de palythinol a palythine vía asterina-330 intervendrían enzimas que se inhibirían con radiación UVB, todo ello para explicar la presencia de shinorine en PAR y la preferente acumulación de palythinol y asterina-330 en las algas expuestas a radiación UVB. También propusieron que los fotorreceptores y/o enzimas que actuasen en la síntesis de shinorine serían más sensibles a la RUV, que los que estaban induciendo la síntesis de otros MAAs (Kräbs *et al.*, 2002). En función a estas reacciones, en un primer periodo shinorine actuaría como protector frente a la RUV y posteriormente, palythine y asterina-330 tomarían esta función, mientras que parte de shinorine actuaría como precursor de gadusol vía mycosporine-gly, actuando por lo tanto, como precursor de una molécula antioxidante, las enzimas participantes en estas reacciones debían activarse con altas irradiancias, siempre dependiendo de la concentración de los distintos tipos de MAAs presentes (Kräbs *et al.*, 2002). La conversión de shinorine a gadusol estaba mediada por una bacteria en holoturias tropicales (Dunlap y Shick, 1998). Podría estar ocurriendo algo similar en las algas estudiadas, de manera que conforme iba aumentando la dosis de radiación solar se necesitaban otros mecanismos de protección, además de una simple pantalla frente a la RUV, y era la capacidad de eliminar los radicales de oxígeno. Aunque al igual que ocurría en *C. crispus*, en este capítulo tampoco se detectó la presencia de mycosporine-gly en ninguno de los casos, quizá debido a que se completaba la reacción y lo que se acumulaba por lo tanto, era gadusol,

compuesto del que se han descrito sus propiedades antioxidantes (Dunlap y Shick, 1998). Además, esta reacción de conversión de shinorine en gadusol sería un sumidero de MAAs, que explicaría el que la concentración total disminuyese a elevadas dosis de radiación (figura II.5.3). La concentración de gadusol no se determinó en ninguno de los extractos, puesto que en un primer momento no se había pensado en esta posible estrategia para la acumulación de un compuesto con alta capacidad antioxidante. Por lo tanto, este sería un tema en el que profundizar en estudios posteriores.

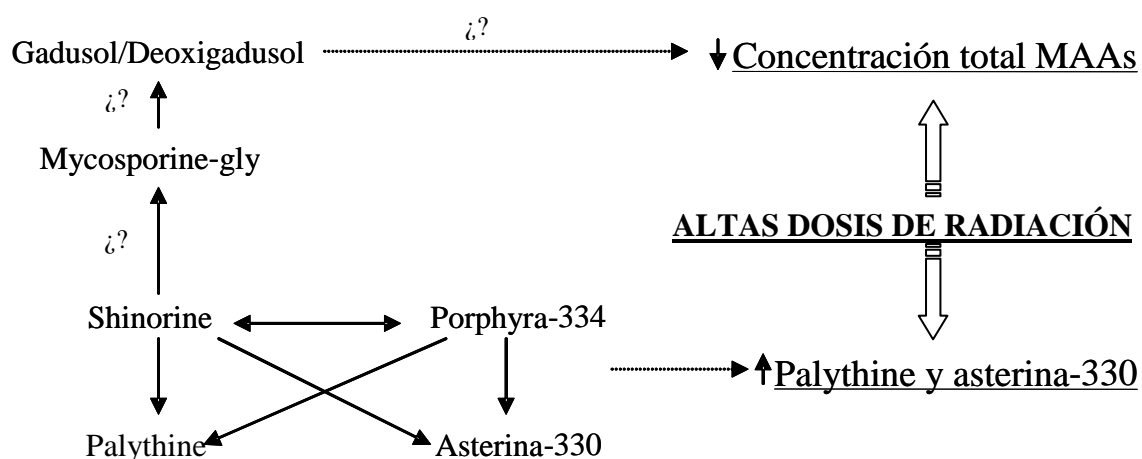


Figura II.5.3. Esquema de las reacciones de conversión propuestas entre MAAs y el gadusol.

CAPÍTULO III

Efecto a corto plazo de la RUV y PAR en la acumulación de MAAs y el estado fotosintético en dos especies del género *Porphyra*.

Los motivos que nos llevaron a elegir el género *Porphyra* como modelo del estudio del efecto de la RUV y PAR en la acumulación de MAAs, su capacidad de fotoprotección y el metabolismo fotosintético se enumeran en el apartado de material y métodos (M.1. Género *Porphyra*).

III.1 Efecto a corto plazo de fuentes artificiales de RUV y PAR en *Porphyra leucosticta* sobre la acumulación de MAAs y el estado fotosintético.

III.1.1. Diseño experimental:

Se expusieron los talos en bandejas durante 48 horas en luz continua a cuatro tratamientos lumínicos: alto PAR (AP), alto PAR más RUV (APUV), bajo PAR (BP) y bajo PAR más RUV (BPUV) (figura III.1.1). La irradiancia para AP fue: $460 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, para BP: $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y la RUV fue de $9.6 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVA y $0.9 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVB. La RUV fue la misma para los tratamientos lumínicos APUV y BPUV. Las dos intensidades de PAR se consiguieron con el uso de placas difusoras (Plexiglas® gs Weiss 017, que afectan a la cantidad, pero no a la calidad de esta banda de radiación). La radiación PAR se emitió, en todos los casos, con la lámpara de halogenuros Optimarc. Se emplearon filtros Ultraphan 395, que eliminan la RUV, para los tratamientos AP y BP. Para los tratamientos APUV y BPUV se emplearon filtros Ultraphan 295 para eliminar la radiación UVC emitida por la lámpara Optimarc (material y métodos: figura M.3.A). La RUV se consiguió con el uso de 1 lámpara Philips TL40W/12 y 2 Q-Panel. La fuente de luz PAR se colocó en la parte superior de los cultivos y la fuente de RUV procedía de los laterales de los cultivos, por lo tanto los filtros neutros se colocaron de manera que interferían únicamente con la radiación PAR procedente de la parte superior del sistema de incubación. Transcurridas las 48 horas, los talos se sometieron a un periodo de recuperación en una irradiancia PAR baja de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante otras 24 horas y fue la misma para los 4 tratamientos lumínicos. Los talos empleados para este experimento fueron recolectados el 4 de abril de 2000 y mantenidos durante una semana en precultivo a 15°C , empleando agua de mar filtrada y enriquecida con Provasoli con burbujeo de aire constante y a una irradiancia PAR de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se cambió el medio al día 6 de precultivo. Se midió el rendimiento cuántico efectivo y el amortiguamiento no fotoquímico inicial, tras 2, 4, 6, 8, 24, 31 y 48 horas del periodo de exposición y a los 30 minutos, 2, 4, 6, 8 y 24 horas del periodo de recuperación. También se midió la concentración inicial de pigmentos (clorofila *a* y ficobiliproteínas) y la de proteínas solubles; y se analizó la concentración tras 24 y 48 horas del periodo de exposición y tras las 24 horas del periodo de recuperación. Por último, se determinó el contenido inicial de MAAs, y el contenido tras 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación (figura III.1.1).

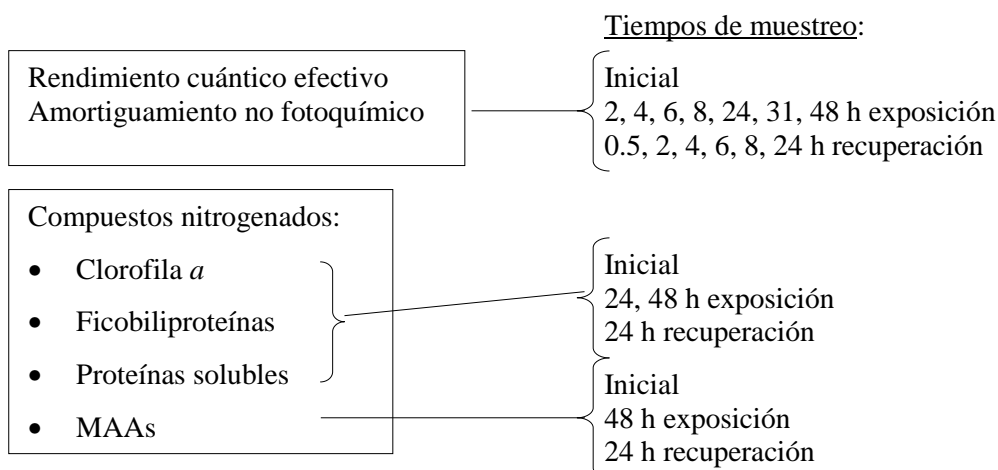
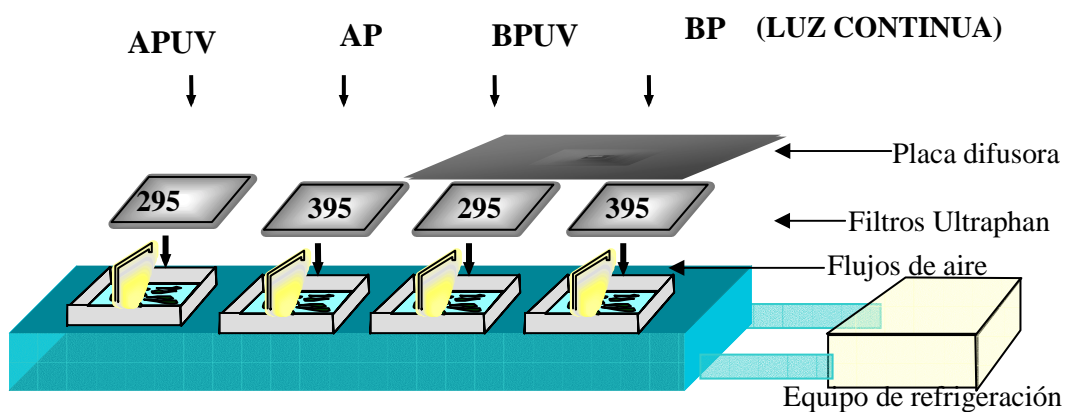


Figura III.1.1. Esquema del diseño experimental.

III.1.2. Resultados:

Respuesta fotosintética:

En el tratamiento lumínico de BP durante el periodo de experimentación el rendimiento cuántico efectivo no varió significativamente ($p > 0.05$), se mantuvo en torno al valor inicial que fue de 0.6 ± 0.07 . En el tratamiento de AP existieron caídas significativas ($p < 0.05$) del rendimiento durante la exposición, se pueden diferenciar dos fases: desde las primeras 2 a las 6 horas y desde las 24 horas hasta el final del periodo (figura III.1.2.A). Sin embargo, en el periodo de recuperación en una irradiancia PAR baja se recuperó rápidamente el rendimiento, alcanzando el valor inicial a los 30 minutos y manteniéndose en el resto del periodo de recuperación (figura III.1.2.B). En el tratamiento APUV también se pueden diferenciar dos fases de caída del rendimiento en el periodo de exposición, pero en este caso la primera de ellas comprende las 4 primeras horas y la siguiente fase el resto del periodo de exposición (figura III.1.2.A). En el periodo de recuperación también se pueden distinguir dos fases en el tratamiento APUV, los primeros 30 minutos con un 68% de recuperación respecto al inicial y el resto del periodo en el que se alcanza de nuevo el valor del inicio del experimento (figura

III.1.2.B). En el tratamiento BPUV no se produjo una caída significativa ($p>0.05$) del rendimiento durante las primeras 8 horas de exposición, sin embargo, tras las 24 horas se observó una caída significativa ($p<0.05$) que se mantuvo el resto del periodo de exposición. La recuperación total del rendimiento se produjo a partir de las 2 horas de recuperación. Fijando el tiempo, el comportamiento del rendimiento fue el mismo para las 24, 31 y 48 horas de exposición, los menores rendimientos fueron los de AP y APUV, no se observaron diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$), le siguió el tratamiento BPUV y por último el BP (figura III.1.2.A). A partir de las 8 horas del periodo de recuperación no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p>0.05$) (figura III.1.2.B).

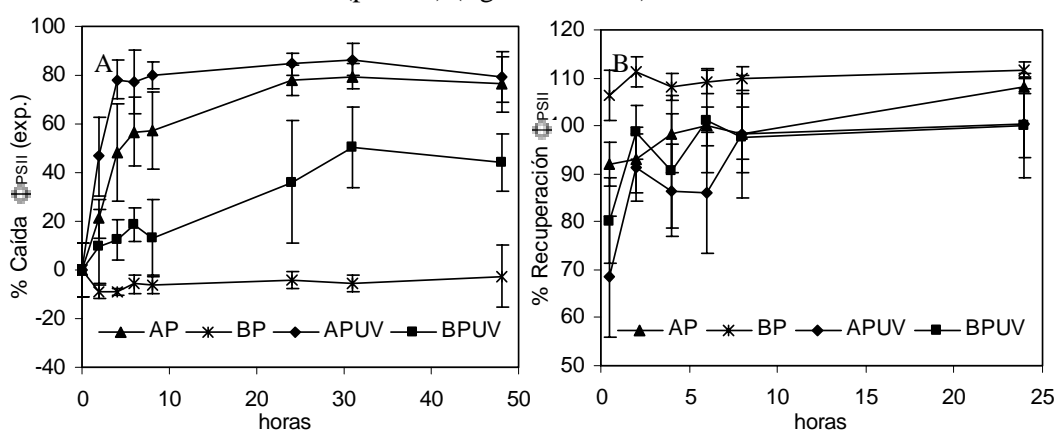


Figura III.1.2. Porcentaje de caída (A) y recuperación (B) del rendimiento cuántico efectivo (Φ_{PSII}) en *P. leucosticta* tras un periodo de 48 horas de exposición a los cuatro tratamientos lumínicos (APUV, BPUV, AP y BP) y un periodo de recuperación de 24 horas en una irradiancia PAR baja.

El amortiguamiento no fotoquímico (q_N) se incrementó significativamente a las 24 horas de exposición en todos los tratamientos lumínicos, pero en menor porcentaje en el tratamiento BP, dichos valores se mantuvieron hasta el final del periodo de exposición, y decrecieron significativamente hasta igualar el valor inicial en todos los tratamientos tras el periodo de recuperación ($p<0.05$) (figura III.1.3).

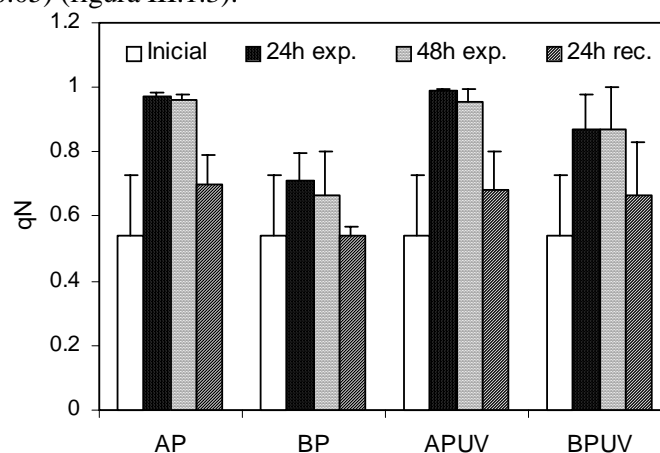


Figura III.1.3. Amortiguamiento no fotoquímico (q_N) al iniciar el experimento y tras 24 y 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación en *P. leucosticta*.

Contenido pigmentario (clorofila *a* y ficobiliproteínas):

La concentración de clorofila *a* cayó significativamente ($p < 0.05$) a las 24 horas de exposición en el tratamiento BPUV. En los tratamientos BP, AP y APUV no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) a lo largo del tiempo (figura III.1.4).

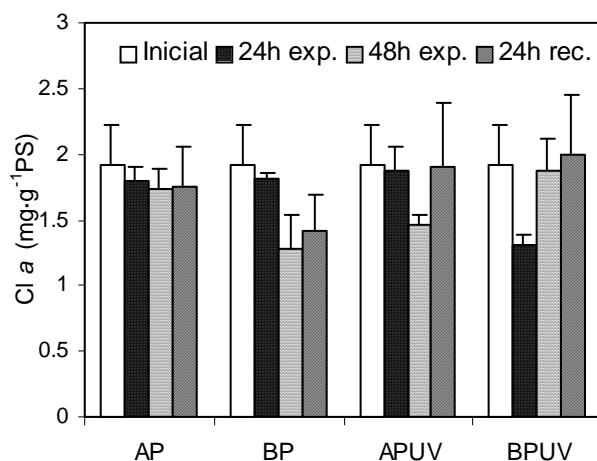


Figura III.1.4. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras 24 y 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación en *P. leucosticta*.

La concentración de ficoeritrina (FE) no varió a lo largo del periodo de experimentación en los tratamientos AP y BP ($p > 0.05$). En el tratamiento APUV la concentración de FE tras 48 horas de exposición fue inferior que el valor inicial ($p < 0.05$). En el tratamiento BPUV se observó una disminución significativa de la concentración de FE tras el periodo de recuperación ($p < 0.05$) (figura III.1.5).

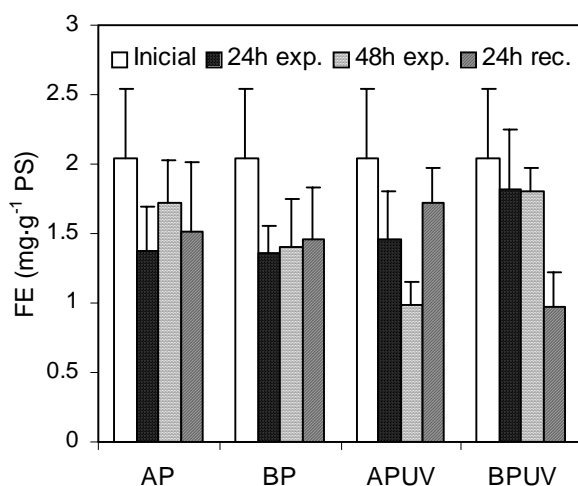


Figura III.1.5. Concentración de ficoeritrina al iniciar el experimento y tras 24 y 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación en *P. leucosticta*.

La concentración de ficocianina (FC) no varió significativamente ($p > 0.05$) respecto al valor inicial a lo largo del periodo de experimentación (exposición y recuperación) en los tratamientos

lumínicos AP, BP y APUV. En el tratamiento BPUV se observó una caída significativa ($p < 0.05$) de la concentración después de las 24 horas de recuperación (figura III.1.6).

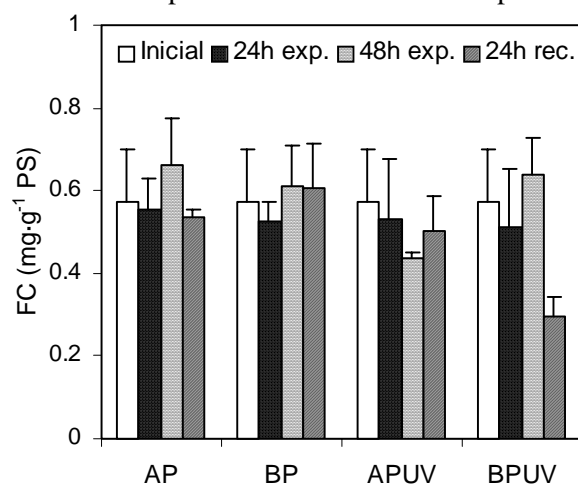


Figura III.1.6. Concentración de ficocianina al iniciar el experimento y tras 24 y 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación en *P. leucosticta*.

La relación FE/FC no varió a lo largo del tiempo en el tratamiento BPUV (se mantuvo en torno a 3.3) ($p > 0.05$). En AP y BP se produjo una caída significativa de dicha relación ($p < 0.05$) después de las 24 horas de exposición, que se mantuvo durante el resto del experimento. En APUV se produjo una caída significativa respecto al inicial a las 48 horas de exposición ($p < 0.05$). Fijando el tiempo, a las 24 horas de recuperación la relación en BP fue significativamente inferior que en APUV y en BPUV ($p < 0.05$) (figura III.1.7).

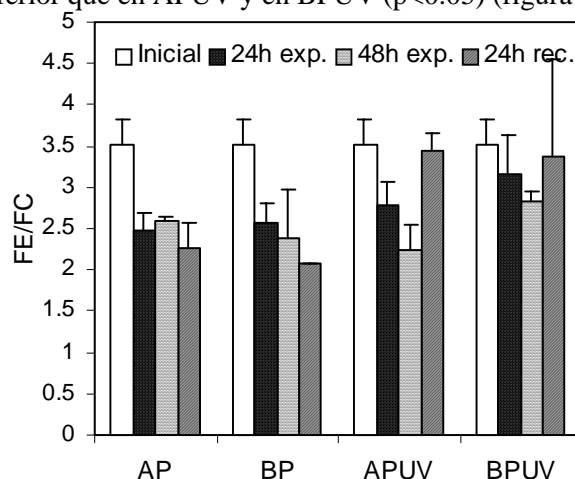


Figura III.1.7. Relación FE/FC al iniciar el experimento y tras 24 y 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación en *P. leucosticta*.

Acumulación de proteínas solubles:

La concentración de proteínas solubles no varió significativamente respecto al valor inicial a lo largo del periodo de experimentación (exposición y recuperación) en ninguno de los tratamientos lumínicos. Fijando el tiempo, tampoco se observaron diferencias significativas

entre tratamientos para ninguno de los casos ($p > 0.05$). La concentración estuvo en torno a $11 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$ (datos no mostrados).

Contenido de MAAs:

La concentración de MAAs fluctuó a lo largo de las primeras 24 horas de exposición a los cuatro tratamientos lumínicos. Las fluctuaciones no siguieron ningún patrón, simplemente fueron subidas y bajadas del contenido interno de MAAs quizá guiadas por un proceso de regulación osmótica (datos no mostrados). A las 24 horas de exposición la concentración interna parece que se comenzaba a estabilizar, por ello, se muestra la concentración después de 48 horas de exposición y tras 24 horas de recuperación (figura III.1.8).

Se identificaron principalmente 4 tipos de MAAs, shinorine, porphyra-334, palythine y asterina-330. El 85% de la concentración inicial estuvo representado por porphyra-334, los otros tres MAAs supusieron aproximadamente un 5% del total cada uno de ellos. A medida que avanzaba el periodo de exposición y recuperación, las proporciones de asterina-330 y palythine se mantuvieron en torno al 5%. Sin embargo, variaron las proporciones de porphyra-334 y shinorine, a medida que uno aumentaba en proporción el otro disminuía, resultados que se muestran en las figuras III.1.9.A, B. Se determinó una correlación negativa entre shinorine y porphyra-334 (coeficiente de correlación de Pearson de $r = -0.980$; $p < 0.01$; $n = 9$).

La concentración inicial de MAAs fue $6.71 \pm 0.25 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$. Tras las 48 horas de exposición a los 4 tratamientos lumínicos la concentración cayó significativamente en todos los casos. Esta caída fue menor y de igual magnitud para los tratamientos BP y BPUV (alrededor de un 30%), seguida del tratamiento AP (39%) y por último, la mayor caída del contenido interno se produjo en el tratamiento APUV (68%). Tras el periodo de recuperación en una irradiancia PAR baja, el contenido interno se mantuvo respecto al valor a las 48 horas de exposición en los tratamientos AP y APUV. Sin embargo, en los tratamientos BP y BPUV tras el periodo de recuperación el contenido de MAAs continuó cayendo hasta un 60% respecto a las 48 horas de exposición (figura III.1.8).

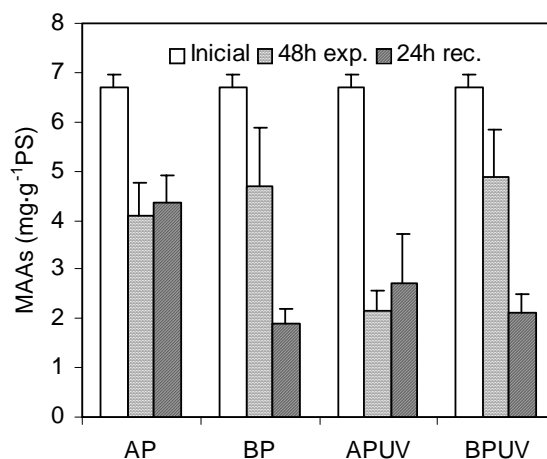


Figura III.1.8. Concentración de MAAs al iniciar el experimento, tras 48 horas de exposición y tras 24 horas de recuperación en *P. leucosticta*.

En los tratamientos AP, BP y APUV la proporción de shinorine se incrementó significativamente a las 24 horas de recuperación ($p < 0.05$). En el tratamiento BPUV la proporción de shinorine se incrementó significativamente después de las 48 horas de exposición y se mantuvo hasta después del periodo de recuperación. A las 24 horas de recuperación la proporción de shinorine en el tratamiento lumínico BP fue inferior que en el resto de tratamientos ($p < 0.05$) (figura III.1.9.A).

En los tratamientos lumínicos AP y BP se produjo una caída significativa de la proporción de porphyra-334 después de las 24 horas de recuperación ($p < 0.05$). En los tratamientos APUV y BPUV la caída ya se había producido a las 48 horas de exposición ($p < 0.05$), y ésta continuó en el tratamiento APUV en el periodo de recuperación y se mantuvo el valor en el tratamiento BPUV (figura III.1.9.B).

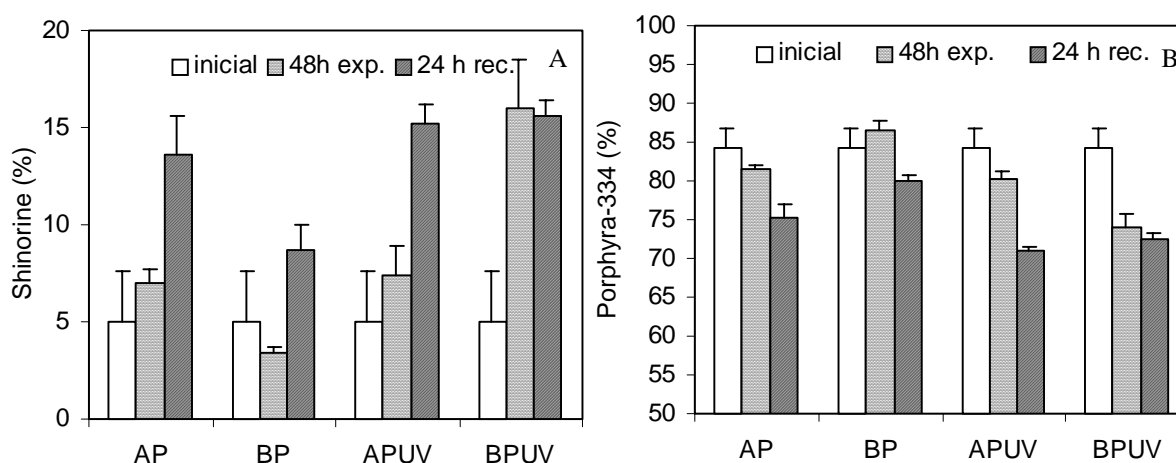


Figura III.1.9. Proporción relativa de shinorine (A) y porphyra-334 (B) respecto al total de MAAs al iniciar el experimento, tras 48 horas de exposición y tras 24 horas de recuperación en *P. leucosticta*.

Relación MAAs-rendimiento cuántico efectivo-dosis de radiación:

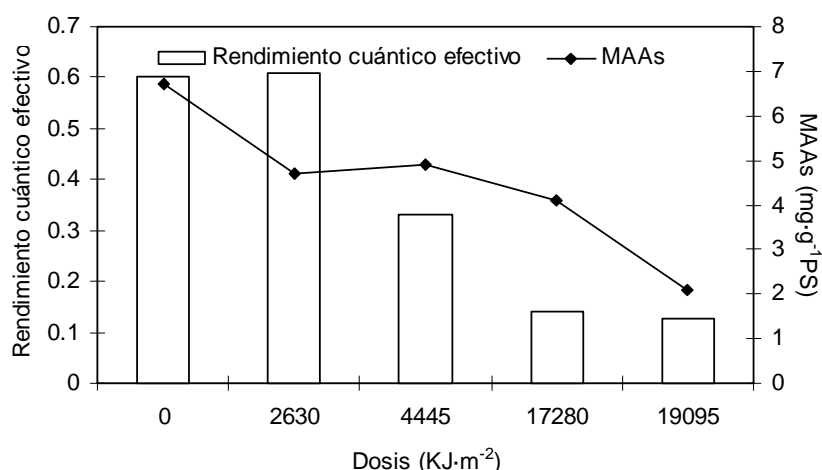


Figura III.1.10. Rendimiento cuántico efectivo y concentración de MAAs en función a la dosis recibida tras 48 horas de exposición en *P. leucosticta*.

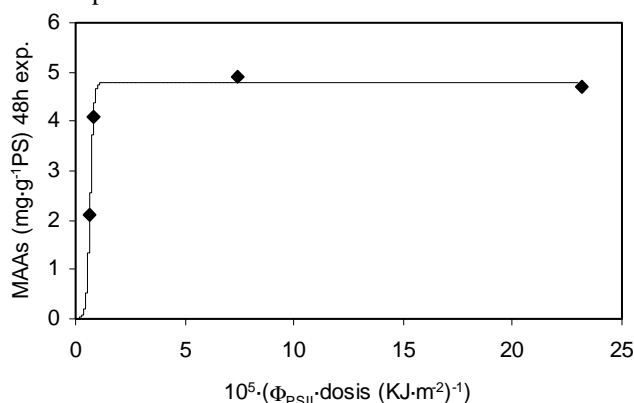


Figura III.1.11. Relación entre el rendimiento cuántico efectivo normalizada con la dosis recibida frente al contenido de MAAs tras 48 horas de exposición en *P. leucosticta*.

Conforme aumentaba la dosis de radiación recibida por los talos de *P. leucosticta* se observaba una caída en el rendimiento cuántico efectivo y también en el contenido de MAAs (figura III.1.10).

Se encontró una relación entre el rendimiento cuántico efectivo normalizado con la dosis de radiación recibida frente al contenido de MAAs, que se puede ajustar perfectamente a una función de tipo saturante, con una pendiente inicial de la curva muy elevada, que indica que pequeños incrementos en el rendimiento cuántico efectivo/dosis derivan en un aumento mucho más brusco del contenido interno de MAAs. Sin embargo, a valores mayores de rendimiento/dosis la acumulación de MAAs se satura. La saturación se alcanza a 5 mg·g⁻¹PS (figura III.1.11). Esta relación nos indicaría además de manera global, que cuando se aplican dosis de radiación elevadas que provocan caídas en el rendimiento cuántico efectivo, los talos serían capaces de responder de manera más notable con una gran plasticidad en la acumulación de MAAs.

III.2. Efecto a corto plazo de fuentes artificiales de RUV y PAR sobre la acumulación de MAAs y el estado fotosintético en dos fototipos de *P. columbina* (sol y sombra).

III.2.1. Diseño experimental:

Se mantuvieron talos de la especie *P. columbina* en cilindros de metacrilato (Plexiglas®) transparentes a la RUV, en una cámara de cultivo Sanyo MLR 350 instalada en la Estación de Fotobiología Playa Unión (Argentina). La temperatura se controló a 15° C, los cilindros estaban sometidos a un burbujeo con aire constante y se empleó como medio de cultivo agua de mar filtrada tomada de la Playa de Barrancas Blancas el mismo día de recolección de los talos, el 24 de octubre de 2001. Se recolectaron dos grupos de algas, un grupo situado en la parte más expuesta del intermareal rocoso, estos talos se caracterizaban por estar muy poco pigmentados (grupo tipo sol) y otro grupo cuyo hábitat era una zona rocosa sombreada y los talos se caracterizaron por estar muy pigmentados (grupo tipo sombra). Los talos se mantuvieron en precultivo a $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR durante 6 días. Transcurrido este tiempo se cambió el medio y se expusieron las algas a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB durante 48 horas en continuo (figura III.2.1). Las irradiancias para estos tratamientos fueron de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR, $15 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVA y $0.9 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVB para el caso de las algas tipo sombra; y $114 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR, $5.7 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVA y $0.3 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVB para el caso de las algas tipo sol. Las fuentes de luz fueron lámparas fluorescentes Truelite (PAR) y lámparas Q-Panel (RUV). La atenuación de la irradiancia se consiguió para el grupo sol empleando filtros neutros que cortaban un 62% de la radiación incidente. Transcurridas las 48 horas de exposición se apagaron las lámparas de RUV y se empleó una radiación PAR de $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para todos los casos (sol y sombra) durante un periodo de recuperación de 24 horas en continuo.

Se midió para los dos grupos de algas, tipo sol y sombra, el rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) y el amortiguamiento no fotoquímico (qN) al iniciar el experimento y después de 24 y 48 horas de exposición y tras las 24 horas de recuperación. También se analizó el contenido de clorofila *a* y de MAAs al iniciar el experimento y tras las 24 y 48 horas de exposición y las 24 horas de recuperación. El contenido de ficobiliproteínas se analizó al iniciar el experimento y tras finalizar tanto el periodo de exposición como el de recuperación (figura III.2.1).

Con este experimento se pretendía estudiar si las plantas que habían crecido en su hábitat natural con una baja irradiancia (tipo sombra) eran capaces de adaptarse a unas condiciones de RUV más extremas y en consecuencia, cómo influían los MAAs en esta posible capacidad de fotoprotección. También se estudiaría cuál era el comportamiento de los talos tipo sol cuando se les sometía a unas irradiancias no fotoinhibitorias en términos de respuesta fotosintética y contenido de MAAs.

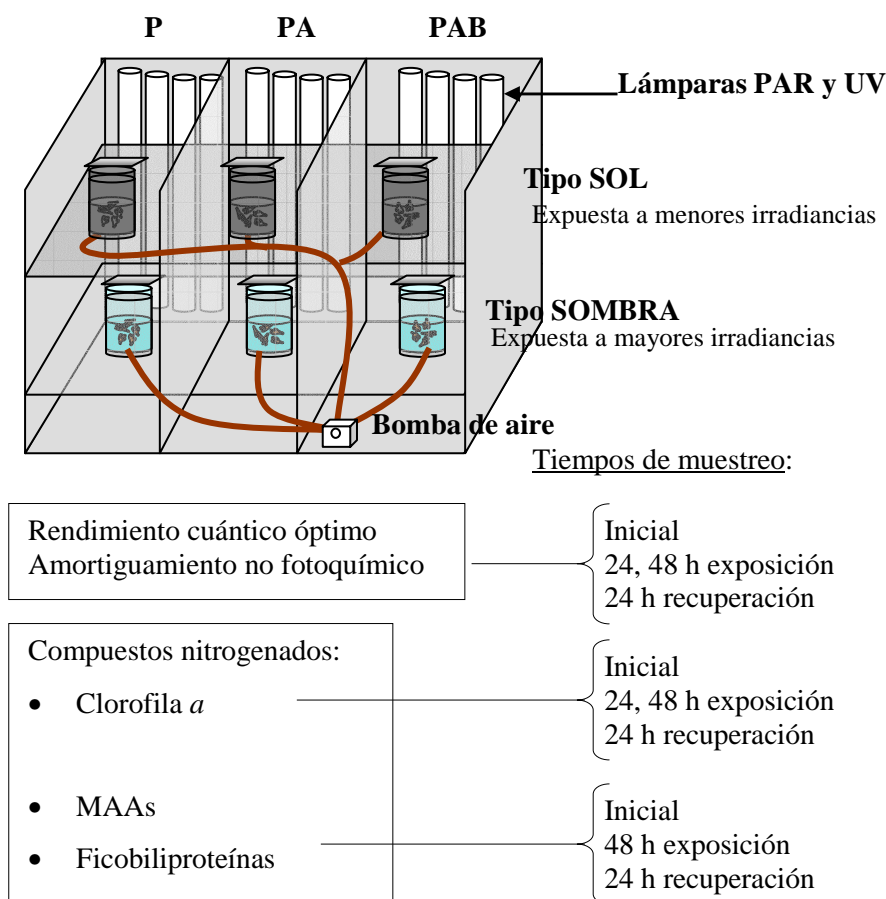


Figura III.2.1. Representación esquemática del experimento realizado con *P. columbina* en la cámara de cultivo Sanyo MLR 350.

III.2.2. Resultados:

Respuesta fotosintética:

El rendimiento cuántico óptimo inicial para las algas tipo sol y tipo sombra fue el mismo, pero el comportamiento después del periodo de exposición y recuperación fue distinto para los dos grupos de algas. Se observó una caída significativa ($p < 0.05$) del rendimiento a las 24 horas de exposición a los tratamientos lumínicos PAB y PA en las algas pertenecientes al tipo sombra, esta caída se mantuvo a las 48 horas, sin embargo, en las algas tipo sol la caída significativa del rendimiento respecto al valor inicial se produjo después de las 48 horas de exposición ($p < 0.05$). En ambos casos y para ambos tratamientos (PAB y PA), se recuperó significativamente el F_v/F_m hasta alcanzar de nuevo el valor inicial después del periodo de recuperación a baja irradiancia de PAR. En el tratamiento P para las algas de tipo sombra la caída se produjo a las 24 horas de exposición ($p < 0.05$), recuperándose posteriormente el rendimiento, también se observó una caída para las algas tipo sol después de las 24 horas de exposición aunque esta caída fue menor que en los demás casos ($p < 0.05$) (figura III.2.2.A,B).

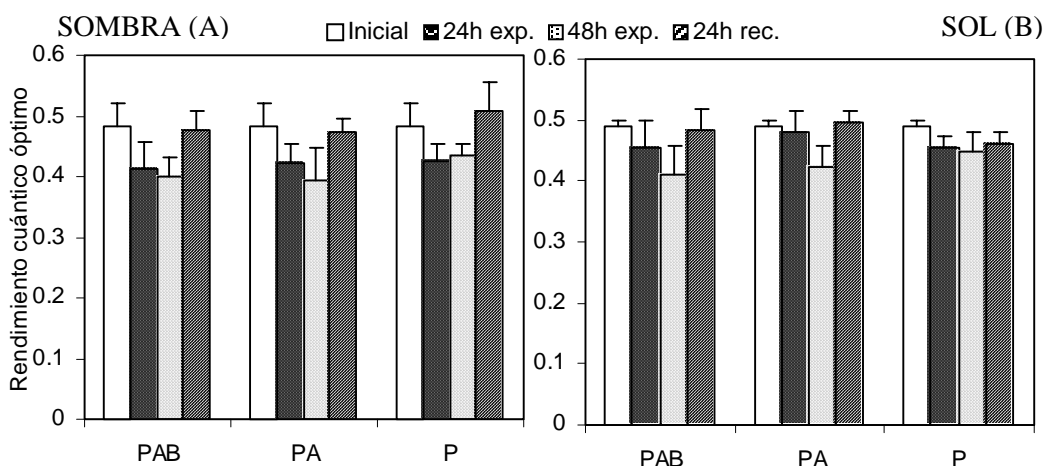


Figura III.2.2. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) para las plantas tipo SOMBRA (A) y SOL (B) al iniciar el experimento y tras 24 y 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación para *P. columbina*.

El amortiguamiento no fotoquímico (qN) inicial fue de 0.6 para ambos grupos de algas, y no varió significativamente a lo largo del cultivo en ninguno de los tratamientos lumínicos ($p > 0.05$) (datos no mostrados).

Contenido pigmentario (clorofila a y ficobiliproteínas):

La concentración inicial de clorofila *a* fue la misma para los dos grupos de algas empleadas en este experimento. A lo largo del tiempo no se observaron diferencias significativas en la concentración de clorofila *a* para ninguno de los tratamientos lumínicos, tanto para las plantas tipo sombra como para las de tipo sol ($p > 0.05$). A pesar de no detectarse diferencias significativas, se observó en el conjunto de datos, que la concentración de clorofila *a* en las algas tipo sol fue ligeramente inferior que en las de tipo sombra (figura III.2.3.A,B).

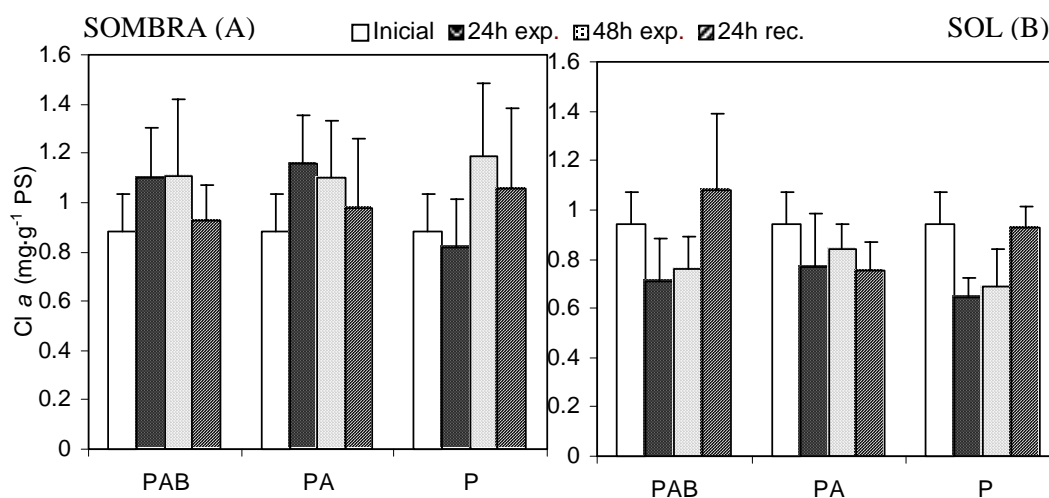


Figura III.2.3. Concentración de clorofila *a* para las plantas tipo SOMBRA (A) y SOL (B) al iniciar el experimento y tras 24 y 48 horas de exposición y 24 horas de recuperación para *P. columbina*.

La concentración inicial de ficoeritrina (FE) y, en consecuencia la de ficobiliproteínas (FB), fue inferior significativamente en los talos de tipo sol que en los talos de tipo sombra ($p < 0.05$). La concentración inicial de ficocianina (FC) no difirió entre los dos grupos de algas empleadas en el experimento, ni tampoco se detectaron diferencias significativas en el valor inicial de la relación FE/FC ($p > 0.05$). Después de las 48 horas de exposición no se detectaron diferencias significativas entre los dos grupos de algas para ninguno de los tratamientos lumínicos aplicados en ninguna de estas medidas (FE, FC, FB y FE/FC) ($p > 0.05$). Tras el periodo de recuperación, sólo se detectaron diferencias significativas en el valor de FE/FC para el tratamiento lumínico P, el valor para las algas de tipo sol fue inferior que para las algas de tipo sombra ($p < 0.05$) (figura III.2.4.A,C).

El contenido de FC no varió significativamente a lo largo del tiempo para las algas tipo sombra en los tratamientos lumínicos PA y P ($p > 0.05$). En PAB se produjo un incremento significativo de la concentración de FC y FE, y en consecuencia de FB, tras las 24 horas del periodo de recuperación ($p < 0.05$). En PA la concentración de FE, y de FB, y la relación FE/FC cayeron significativamente respecto al valor inicial a las 48 horas de exposición ($p < 0.05$), aunque se produjo un ligero incremento en el contenido interno tras el periodo de recuperación, llegando a igualarse de nuevo al valor inicial. En el tratamiento lumínico P también cayó significativamente la concentración de FE tras la exposición ($p < 0.05$), pero en este caso se mantuvo el valor tras la recuperación. La relación FE/FC también fue inferior significativamente tras la recuperación en P (figura III.2.4.SOMBRA).

Para las algas tipo sol no se observaron diferencias significativas en el contenido interno de FC a lo largo del tiempo en ninguno de los tratamientos lumínicos ($p > 0.05$). Las FE sí variaron significativamente en los tratamientos PAB y P. Tras las 24 horas de recuperación se produjo un incremento de la concentración interna de FE y de FB en PAB respecto al valor de concentración a las 48 horas de exposición ($p < 0.05$). Sin embargo, en P se produjo una caída de la concentración de FE y de la relación FE/FC a las 24 horas del periodo de recuperación respecto al valor inicial ($p < 0.05$) (figura III.2.4.SOL).

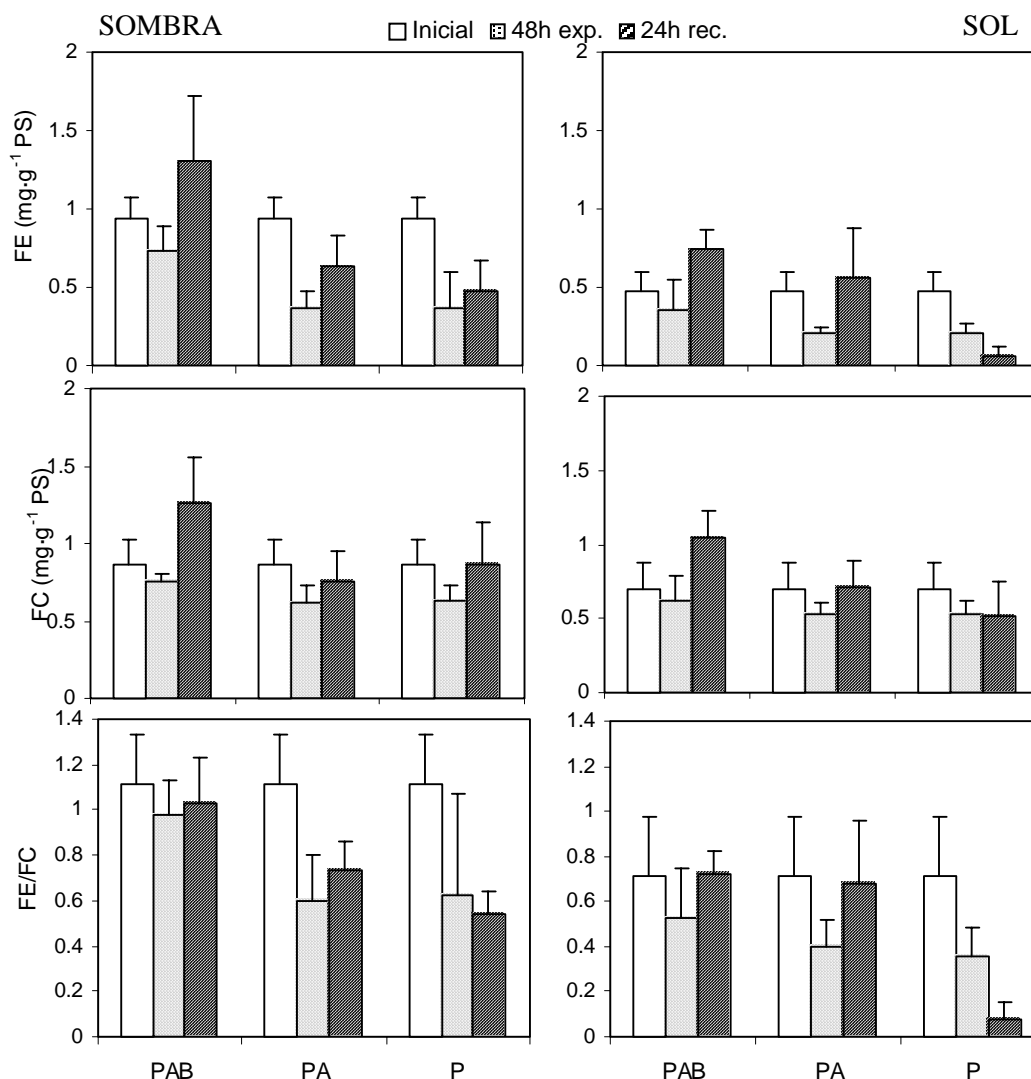


Figura III.2.4. Contenido de ficoeritrina (A), ficocianina (B), ficobiliproteínas (C) y relación FE/FC (D) para las plantas tipo SOMBRA (gráficos de la izquierda) y SOL (gráficos de la derecha) al iniciar el experimento, tras 48 horas de exposición y tras 24 horas de recuperación para *P. columbina*.

Contenido de MAAs:

Tras el periodo de precultivo la concentración de MAAs fue significativamente superior en los talos que habían estado menos expuestos en el medio natural (tipo sombra) que aquellos que habitaron una zona de mayor exposición solar (tipo sol) ($p < 0.05$). Tras las 48 horas de exposición en el experimento no se detectaron diferencias significativas para cada uno de los tratamientos entre las algas que habían estado más y menos expuestas en el momento de su recolección. Lo mismo ocurrió tras las 24 horas de recuperación ($p > 0.05$) (figura III.2.5.A,B).

Tras las 48 horas de exposición en las algas tipo sombra se observó una caída significativa en todos los tratamientos con respecto al valor inicial ($p < 0.05$), manteniéndose ese contenido

interno después de las 24 horas de recuperación en todos los tratamientos ($p>0.05$) (figura III.2.5.A).

En las algas tipo sol no se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo en los tratamientos PA y P ($p>0.05$), sin embargo, en el tratamiento PAB se observó una caída significativa de la concentración interna tras las 48 horas de exposición ($p<0.05$) y este valor se mantuvo después del periodo de recuperación (figura III.2.5.B).

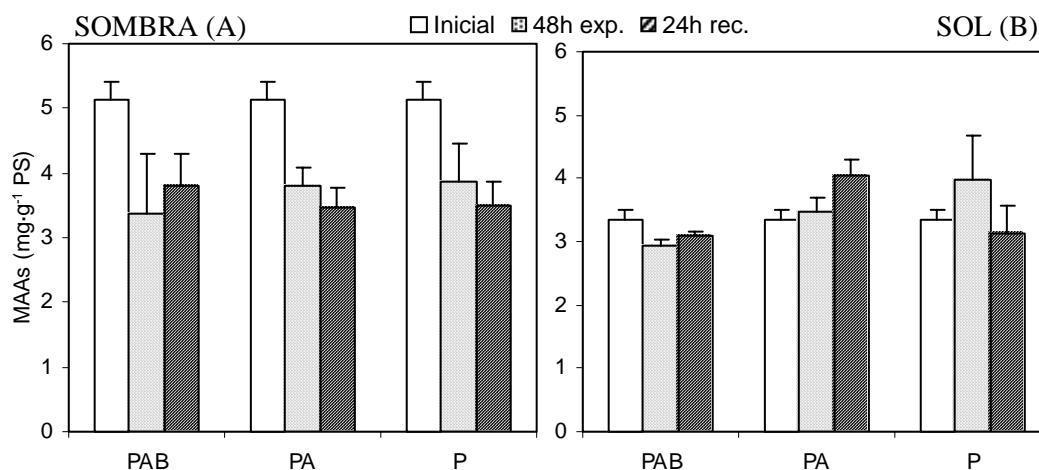


Figura III.2.5. Contenido de MAAs para las plantas tipo SOMBRA (A) y SOL (B) al iniciar el experimento, tras 48 horas de exposición y tras 24 horas de recuperación para *P. columbina*.

Se analizó el comportamiento de los dos MAAs más abundantes, shinorine y porphyra-334. Aunque también se identificó mycosporine-gly, palythine y asterina-330 en todas las muestras, pero estos tres últimos en una proporción que no llegó en ninguno de los casos al 1% del total.

Shinorine representó aproximadamente un 15% del total de MAAs inicial en las algas tipo sombra, mientras que en las de tipo sol representó hasta un 20% del inicial. Porphyra-334 estaba presente en un 85% en el valor inicial de MAAs para las algas tipo sombra y en un 80% en las de tipo sol (figura III.2.6.A,B). Se determinó una correlación negativa entre shinorine y porphyra-334 ($r=-0.998$; $p<0.01$; $n=14$).

Mientras que en las algas de tipo sol no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en la proporción relativa de shinorine a lo largo del tiempo para ninguno de los tratamientos (figura III.2.6.B), en las de tipo sombra se detectó un incremento en la presencia de shinorine en paralelo a un descenso del porcentaje de porphyra-334 después de 48 horas de exposición en los tratamientos PA y P ($p<0.05$). Los valores se mantuvieron después del periodo de recuperación para estos tratamientos. Sin embargo, en el tratamiento lumínico PAB los porcentajes iniciales se mantuvieron a las 48 horas de exposición, pero a las 24 horas de recuperación el comportamiento fue el mismo que en los casos anteriores, parece que en este último tratamiento

la presencia de radiación UVB impidiese el incremento de shinorine (figura III.2.6.A). Las variaciones que se produjeron en la composición de ambos MAAs (shinorine y porphyra-334), en los talos de tipo sombra estuvieron encaminadas a alcanzar las mismas proporciones relativas que poseían las plantas de tipo sol.

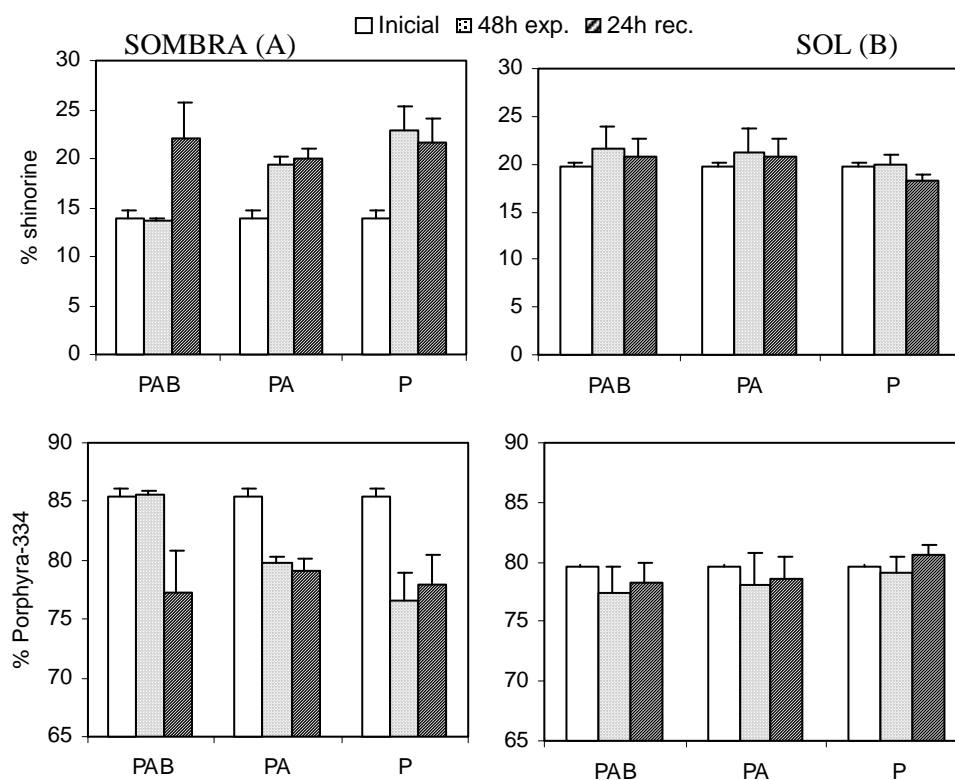


Figura III.2.6. Porcentaje de shinorine y porphyra-334 para las plantas tipo SOMBRA (A) y SOL (B) al iniciar el experimento, tras 48 horas de exposición y tras 24 horas de recuperación para *P. columbina*.

III.3. Efecto a corto plazo de la radiación solar (RUV y PAR) en *Porphyra columbina* sobre la acumulación de MAAs y el estado fotosintético.

III.3.1. Diseño experimental:

Experimento de 72 horas de duración en el que se cultivó el alga *P. columbina* bajo radiación solar en un tanque de incubación con un flujo continuo de renovación de agua para la refrigeración de los cultivos, este tanque se situó en el exterior de la Estación de Fotobiología Playa Unión (Argentina). Para el desarrollo de este experimento se emplearon talos de *P. columbina* recolectados el 16 de octubre de 2001. El precultivo duró 5 días y se realizó en el interior de la cámara de cultivo Sanyo MLR 350 a una irradiancia de $65 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a 15°C de temperatura y bajo un fotoperiodo de 12:12 (luz:oscuridad). El medio de cultivo empleado fue agua de mar natural filtrada. Tras el precultivo se expusieron los talos a 4 tratamientos lumínicos: PAB, un 25% de PAB, PA y P, para atenuar la irradiancia en el segundo de los tratamientos se emplearon dos mallas metálicas superpuestas (figura III.3.1.A).

Las dosis medias diarias que recibieron los talos fueron $8500 \text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$ (PAR), $1250 \text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$ y $28 \text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$ (UVA y UVB, respectivamente). Las irradiancias medias fueron $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (PAR), $32 \text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ (UVA) y $0.72 \text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ (UVB).

Se midió el rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) y el amortiguamiento no fotoquímico (qN) al iniciar el experimento y después de 24 y 72 horas de experimentación. Se tomaron muestras también al inicio y tras 24 y 72 horas para el cálculo de la concentración de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y ficobiliproteínas) y para determinar el contenido interno de MAAs (figura III.3.1.B).

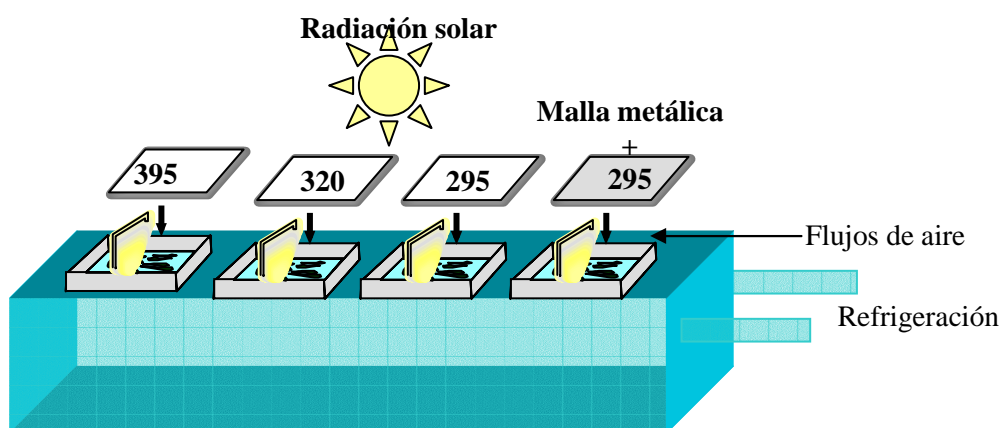


Figura III.3.1.A Esquema del diseño experimental.

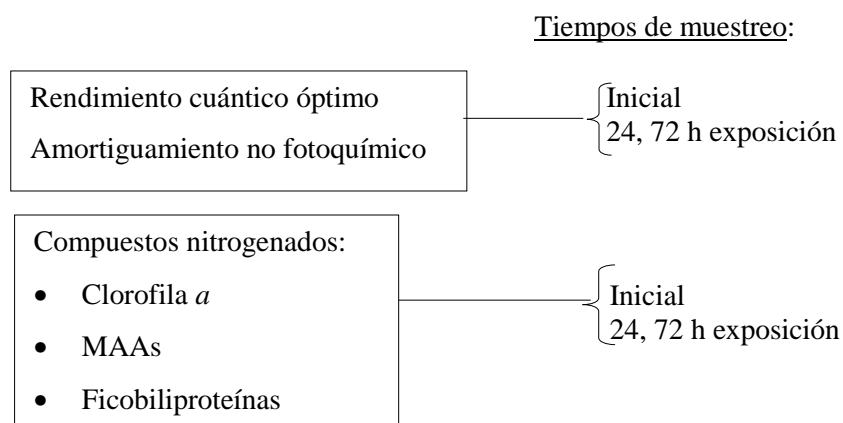


Figura III.3.1.B. Variables medidas y tiempos de muestreo.

III.3.2. Resultados:

Respuesta fotosintética:

El rendimiento cuántico óptimo cayó significativamente después de 24 horas de experimentación en todos los tratamientos lumínicos y continuó cayendo significativamente respecto al valor anterior también en todos los tratamientos ($p < 0.05$), excepto en PA, en el que se mantuvo la caída de las 24 horas de exposición. Fijando el tiempo de muestreo, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos para el valor del rendimiento a las 24 horas de exposición ($p > 0.05$), a las 72 horas se observó que el rendimiento cuántico óptimo en el tratamiento 25% PAB fue significativamente superior que en los demás tratamientos ($p < 0.05$) (figura III.3.2.A).

El amortiguamiento no fotoquímico (qN) se incrementó significativamente después de 24 horas de exposición en los tratamientos PAB y PA ($p < 0.05$), manteniéndose el valor hasta el final del experimento. En el tratamiento 25% PAB el qN fue significativamente superior después de las 72 horas que a las 24 horas de experimentación ($p < 0.05$). En el tratamiento P no se observaron diferencias significativas a lo largo del periodo de experimentación ($p > 0.05$). Fijando el tiempo de muestreo, a las 24 horas de exposición el valor de qN fue significativamente inferior en el tratamiento 25% PAB que en el resto de tratamientos ($p < 0.05$). A las 72 horas el amortiguamiento fue inferior significativamente en los tratamientos P y 25% de PAB que en los tratamientos PAB y PA ($p < 0.05$) (figura III.3.2.B).

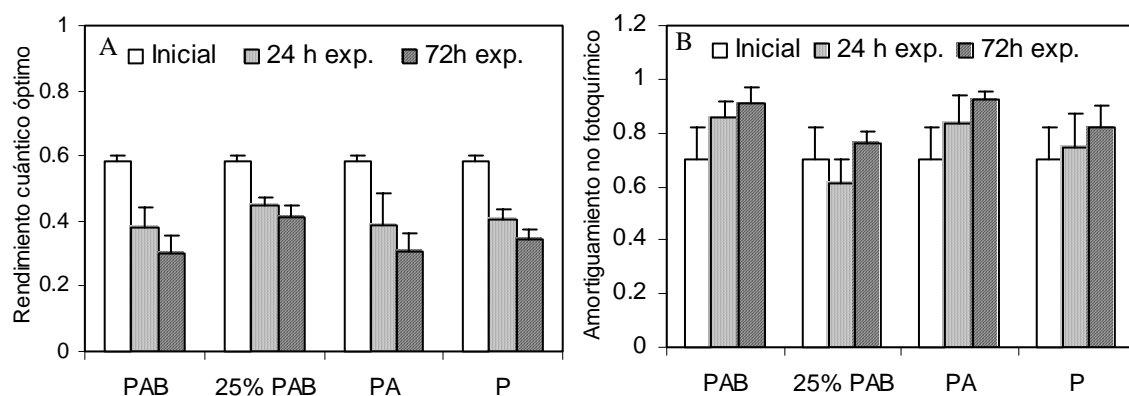


Figura III.3.2. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) (A) y amortiguamiento no fotoquímico (qN) (B) al iniciar el experimento y tras 24 y 72 horas de exposición a los tratamientos PAB, 25% PAB, PA y P bajo radiación solar para *P. columbina*.

Contenido pigmentario (clorofila *a* y ficobiliproteínas):

La concentración de clorofila *a* no varió significativamente a lo largo del tiempo en los tratamientos 25% PAB y P ($p > 0.05$). En el tratamiento lumínico PAB se detectó una caída significativa respecto al valor inicial después de las 72 horas de experimentación ($p < 0.05$), en el tratamiento PA la caída fue significativa a las 24 horas ($p < 0.05$) y se mantuvo este valor hasta el final del experimento (figura III.3.3).

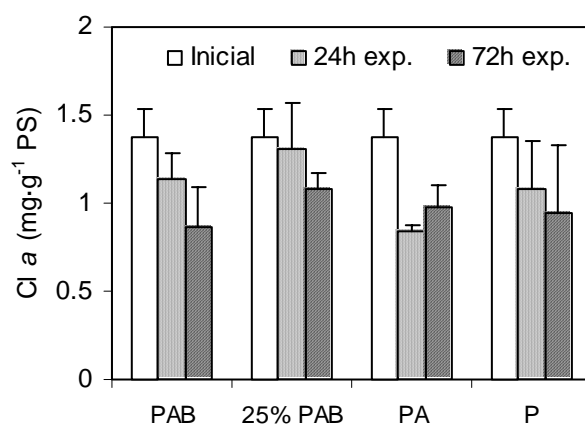


Figura III.3.3. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras 24 y 72 horas de exposición a los tratamientos PAB, 25% PAB, PA y P bajo radiación solar para *P. columbina*.

La concentración de ficoeritrina (FE) cayó significativamente respecto al valor inicial después de las 72 horas de exposición en el tratamiento PAB y se incrementó significativamente después de las 72 horas en el tratamiento P ($p < 0.05$) (figura III.3.4.A). La concentración de ficocianina (FC) cayó significativamente en el tratamiento PAB a las 24 horas de exposición ($p < 0.05$) y este valor se mantuvo hasta el final del experimento. Sin embargo, en el tratamiento P se produjo una caída significativa después de las 24 horas de exposición, pero el contenido interno se incrementó de nuevo a las 72 horas ($p < 0.05$) hasta alcanzar el valor del inicio. En el

tratamiento lumínico PA se detectó una caída significativa del contenido de FC después de las 72 horas de experimentación ($p < 0.05$). El contenido de FE y FC no varió significativamente a lo largo del periodo de experimentación en el tratamiento de 25% de PAB ($p > 0.05$) (figura III.3.4.B). La relación FE/FC se situó en torno a 1 en todos los casos, sin observarse diferencias significativas entre tratamientos ni en el tiempo ($p > 0.05$) (datos no mostrados).

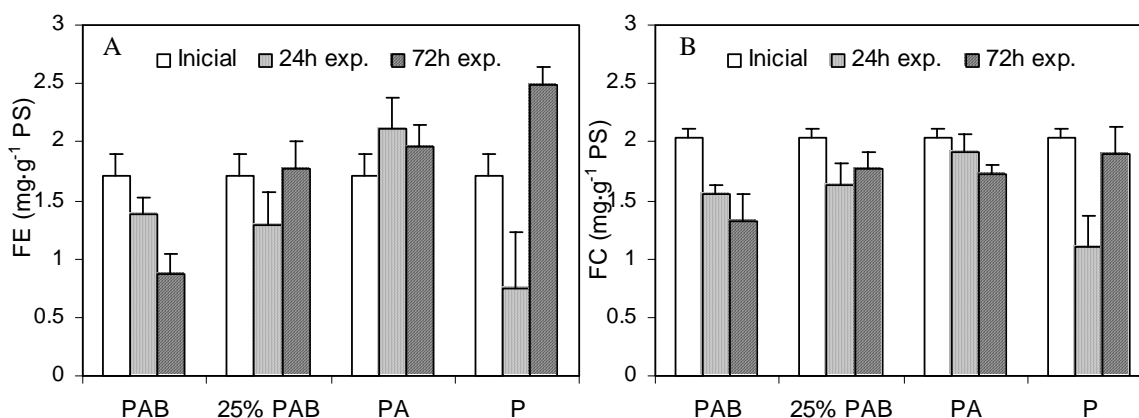


Figura III.3.4. Concentración de ficoeritrina (A) y ficocianina (B) al iniciar el experimento y tras 24 y 72 horas de exposición a los tratamientos PAB, 25% PAB, PA y P bajo radiación solar para *P. columbina*.

Contenido de MAAs:

En los tratamientos PAB y PA el contenido de MAAs no varió significativamente a lo largo del tiempo ($p > 0.05$). Sin embargo, para el 25% de PAB se produjo una caída significativa de la concentración de MAAs tras las 72 horas de experimentación respecto al inicial y en el tratamiento P se incrementó la concentración tras las 72 horas respecto al valor tras las 24 horas de exposición ($p < 0.05$).

A las 24 horas de exposición no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$). Sin embargo, tras las 72 horas de exposición el contenido de MAAs en P fue significativamente superior que en los demás tratamientos ($p < 0.05$), y el contenido en PA fue significativamente superior que en el tratamiento del 25% de PAB ($p < 0.05$) (figura III.3.5).

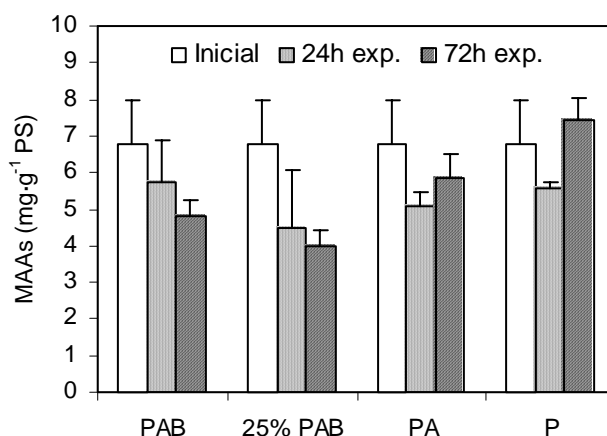


Figura III.3.5. Concentración de MAAs al iniciar el experimento y tras 24 y 72 horas de exposición a los tratamientos PAB, 25% PAB, PA y P bajo radiación solar para *P. columbina*.

Los extractos para MAAs se componían aproximadamente de un 83% de porphyrina-334 y de un 16% de shinorine. Del resto, hasta alcanzar el 100% formaban parte una pequeña proporción de mycosporine-gly, palythine y asterina-330. No se observaron diferencias significativas a lo largo del periodo de experimentación ni en el porcentaje de porphyrina-334 ni en el de shinorine. Excepto a las 24 horas de exposición, en la que el porcentaje de shinorine fue significativamente inferior en P que en PAB (total y 25%) y el de porphyrina-334 significativamente superior ($p < 0.05$) (figura III.3.6.A,B). Se observó una correlación negativa entre el contenido de shinorine y el de porphyrina-334 ($r = -0.995$; $p < 0.01$; $n = 9$).

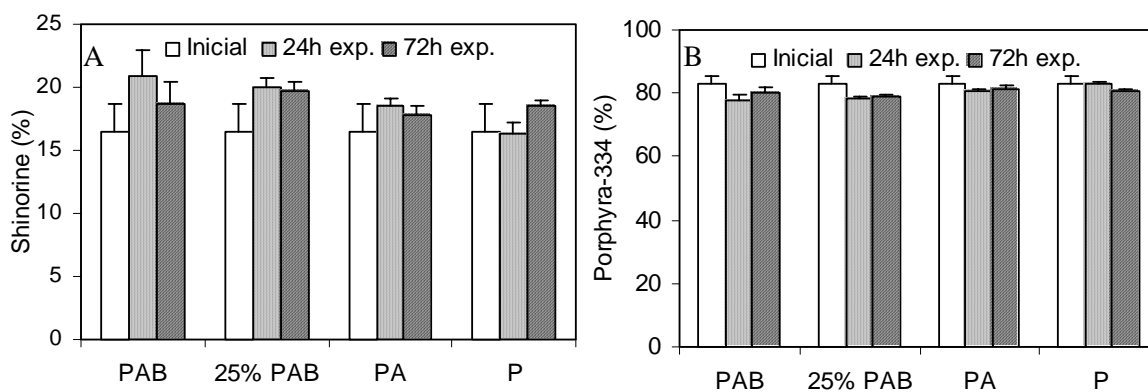


Figura III.3.6. Proporción relativa de shinorine (A) y porphyrina-334 (B) al iniciar el experimento y tras 24 y 72 horas de exposición a los tratamientos PAB, 25% PAB, PA y P bajo radiación solar para *P. columbina*.

III.4. Discusión.

III.4.1. Respuesta fotosintética:

En periodos de tiempo cortos y estando ambas fases macroscópicas (haploides) próximas a desaparecer, *P. columbina* y *P. leucosticta* presentaron diferentes estrategias de aclimatación a las altas irradiancias PAR y RUV, a pesar de que en ambos casos se observó una fotoinhibición dinámica (Hanelt, 1998), puesto que tras el periodo de recuperación en una irradiancia PAR baja se produjo una recuperación completa del rendimiento cuántico. Cabe destacar que en el año 2000 los talos de *P. leucosticta* a pesar de haber sido recolectados a principios del mes de abril, se encontraban más próximos a su desaparición que los de *P. columbina*, además el recubrimiento rocoso por parte de los primeros de ellos era muy escaso.

En *P. leucosticta* se observó una caída rápida y brusca del rendimiento cuántico efectivo cuando los talos se exponen durante 48 horas en continuo a una fuente artificial de radiación, la caída fue del 85% respecto al valor inicial (0.6) en el tratamiento APUV, caracterizado por una IBE calculada para la fotosíntesis (Fork, 1963) de $322 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y de $4.9 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ para fotoinhibición (Jones y Kok, 1966). Y en *P. columbina* tras la exposición de 48 horas a una IBE para fotosíntesis (Fork, 1963) de $203 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y de $5.2 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ para fotoinhibición (Jones y Kok, 1966), se produjo una caída del rendimiento mucho menor, del 19% respecto al valor inicial (0.5). Además se observó que entre los mecanismos de aclimatación en los ejemplares de *P. leucosticta* se ponía de manifiesto la disipación térmica de la energía de excitación (reflejada en el valor de qN), mientras que este mecanismo no entraba en juego en *P. columbina*. Tampoco se observaron grandes caídas del rendimiento fotosintético cuando *P. columbina* se la exponía a la radiación solar directa, a pesar de que la IBE media para fotoinhibición (Jones y Kok, 1966) era superior a los casos anteriores, la mayor de las caídas se produjo en PAB tras las 72 horas de exposición y fue del 48% del valor inicial (0.6).

En un intento de identificar qué otros mecanismos estarían interviniendo en el proceso de aclimatación, se analizó la influencia de la composición pigmentaria y del contenido interno de MAAs. El contenido inicial de clorofila *a* y FE fue aproximadamente un 53 y un 65% inferior, respectivamente, en la incubación de los talos de *P. columbina* a una fuente artificial de radiación lumínica que en los de *P. leucosticta*. Y el contenido de FC fue muy similar en ambas especies. Según apuntaron otros autores, las FB podrían ejercer una función fotoprotectora induciendo cambios conformacionales tanto en el cromóforo como en la parte apoproteica de las mismas (Talarico y Maranzana, 2000). Sin embargo, como se apuntó anteriormente los ejemplares de *P. columbina* se caracterizaron por una menor fotoinhibición de la fotosíntesis, por lo tanto, se concluye que estos pigmentos no estaban interviniendo en el proceso de

aclimatación. De hecho, otros autores han relacionado un bajo contenido de ficobiliproteínas con una menor sensibilidad ante los daños provocados por la RUV, ya que absorberían menos RUV y los efectos negativos a nivel fisiológico y metabólico serían menores (Aguilera *et al.*, 1999a). Respecto a la clorofila *a* hay autores que afirmaron que este pigmento parecía menos sensible a la hora de detectar el efecto de las altas irradiancias en experimentos cortos realizados en algas rojas, que la fluorescencia de la clorofila (Dring *et al.*, 1996).

Se ha comprobado que las moléculas de porphyra-334 y shinorine, cumpliendo con las características fundamentales de un fotoprotector, son capaces de disipar térmicamente la energía absorbida de la RUV (Shick *et al.*, 2000); cumpliéndose su papel de pantalla de la RUV, las caídas del rendimiento cuántico de fluorescencia de la clorofila *a* deberían ser menores en presencia de un mayor contenido de MAAs., sin embargo, el contenido de MAAs fue inferior en los talos de *P. columbina* que en los de *P. leucosticta*. Además, como se indicó anteriormente los ejemplares de *P. columbina* expuestos a radiación solar presentaron mayores caídas en el rendimiento fotosintético que los ejemplares de esta misma especie expuestos a radiación artificial, a pesar de que la concentración de MAAs era superior.

Puesto que no se encontró una relación directa entre el contenido pigmentario y de MAAs con las caídas del rendimiento fotosintético, se pensó en la influencia del grosor de los talos en el proceso de aclimatación. Los de *P. columbina* eran de mayor espesor que los de *P. leucosticta*, se deduce a partir de la relación PF/área, que era de 6.88 mg·cm⁻² en el primero de los casos (datos propios) y de 5.5 mg·cm⁻² en el segundo de ellos (Figueroa *et al.*, 1995a). Se ha postulado que disminuye la eficiencia con que se absorbe la luz al incrementarse el grosor del talo (Enríquez *et al.*, 1994). Llegados a este punto, se podría asumir que el mayor espesor de los talos de *P. columbina* les conduciría a absorber la luz más ineficientemente que *P. leucosticta* (Enríquez *et al.*, 1994), sin embargo, también hay que tener en cuenta que la mayor parte de los tejidos fotosintéticamente activos se localizan en las partes más externas de los mismos. Otros autores han relacionado una disminución de la absorción de los talos con el movimiento de los cloroplastos con el fin de evitar el fotodaño del aparato fotosintético provocado por elevadas irradiancias, concretamente *Dictyota dichotoma* los coloca en posición paralela con respecto a la luz (Hanelt y Nultsch, 1991). Quizá este mecanismo estuviese más activo en *P. columbina* que en *P. leucosticta*, y por lo tanto, podría actuar como otro posible mecanismo de adaptación de *P. columbina* a las elevadas irradiancias.

Procesos bifásicos de caídas y recuperación del rendimiento cuántico:

En *P. leucosticta* se pueden identificar dos fases tanto en los periodos de caída del rendimiento cuántico efectivo como en los periodos de recuperación en una irradiancia PAR

baja. Éstas se caracterizan por tener una evolución distinta. En *Ulva rotundata* fueron descritas también dos fases y las asociaron durante la fotoinhibición a la separación de dos componentes, por un lado los procesos de disipación de energía (fotoprotección) y por el otro el daño provocado en el PSII por el exceso de energía de excitación (Franklin *et al.*, 1992). En la recuperación se observaron también dos fases claras (Hanelt *et al.*, 1997a). Otros autores determinaron que la caída del rendimiento cuántico óptimo a medida que transcurría el tiempo de exposición seguía una evolución lineal en *Phaseolus vulgaris* (Greer *et al.*, 1986) o evolucionaba mediante una función de casi primer orden en *Monstera deliciosa* (Demmig y Björkman, 1987). Sin embargo, Bose y colaboradores (1988) también determinaron dos fases en la caída de la F_v después de un corto periodo de 1 hora de exposición a $2000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en dos especies de *Porphyra*, *P. nereocystis* (tipo sombra) y *P. perforata* (tipo sol), también observaron dos fases en el proceso de recuperación. La primera fase de la caída de la fluorescencia la relacionaron con el establecimiento de un gradiente de protones a través de las membranas tilacoidales y la fase más tardía, que era la más lenta, estaba correlacionada con la fotoinhibición (Bose *et al.*, 1988). La velocidad de recuperación es mucho mayor si las algas han crecido cercanas a la superficie del agua, además se supone una mayor fotoinhibición en las especies que han crecido más expuestas a la radiación solar directa (Demmig-Adams y Adams, 1992). En algas rojas del sur de España también se determinó esta misma relación del grado de fotoinhibición y recuperación con la historia lumínica (Jiménez *et al.*, 1998).

En dos especies de *Porphyra*, una de tipo sol y otra de sombra, se atribuyó una localización a nivel de membrana tilacoidal al mecanismo que dotaba de una mayor resistencia a las especies de sol (Herbert y Waaland, 1988). Las plantas de tipo sol podrían reemplazar rápidamente los centros de reacción del PSII que estaban fotoinhibidos por otros fotoquímicamente activos por medio de un ciclo activo de reparación, en las plantas de sombra este ciclo estaría menos desarrollado y los centros de reacción que se inhibían proveían protección a los centros que todavía estaban activos por medio de la disipación no fotoquímica del exceso de energía de excitación (Öquist *et al.*, 1992a). También los talos de *Ulva rotundata* adaptados a vivir en la sombra presentaron mayor fotodaño en el PSII que aquellos adaptados a vivir en zonas más expuestas (Henley *et al.*, 1992), que presentaron una mayor capacidad para la fotoinhibición dinámica mediante la deexcitación térmica. Sin embargo, las algas adaptadas a vivir en zonas sombreadas normalmente sufren fotoinhibición crónica cuando se las transfiere a altas irradiancias (Osmond, 1994). Se observó que los talos de *Porphyra* sp. de tipo sol presentaban una mayor capacidad de aclimatación a altas irradiancias PAR que los de tipo sombra (Figueroa *et al.*, 2003a). Sin embargo, no se reflejan las anteriores conclusiones en los resultados mostrados en este capítulo, puesto que *P. columbina* de tipo sombra presentó una caída del rendimiento cuántico óptimo de tan solo el 19%, manteniéndose con igual proporción desde las

24 horas hasta las 48 horas de exposición, y además presentó una gran capacidad para la fotoinhibición dinámica, puesto que la recuperación del rendimiento después del periodo de 24 horas en una irradiancia PAR baja fue del 100%. Es más, en el trabajo de Figueroa y colaboradores (2003a) se observó que la exposición a irradiancias PAR de $40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en continuo durante 48 horas provocaba caídas del 60% en el rendimiento de los talos de tipo sombra, mayores que en este capítulo a pesar de que fue superior la irradiancia PAR ($114 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). A pesar de que *P. columbina* presentó caídas del rendimiento fotosintético pequeñas cuando se las exponía a altas irradiancias, los ejemplares del tipo sol al exponerse a una dosis muy inferior a la que recibían en su lugar de recolección presentaban caídas del rendimiento de un 16% después de 48 horas de exposición en luz continua en todos los tratamientos (PAB, PA y P), caídas de igual magnitud que las que se producían para esos mismos tratamientos en los ejemplares de tipo sombra expuestos a una dosis de radiación muy superior, próxima a la de su lugar de recolección; aunque en este último caso la caída se producía ya a las 24 horas de exposición.

En un trabajo reciente se han desarrollado modelos matemáticos que recogen la evolución de la fotoinhibición y la recuperación, identificándose dos componentes, con unas velocidades de reacción lenta y rápida, respectivamente. Tras la exposición a condiciones de estrés por alta irradiancia, tendría lugar una recuperación rápida pero incompleta, relacionada con la reactivación de los centros de reacción del PSII que habían quedado desactivados (1ª fase), esta recuperación parcial se completaría conforme se fuesen reparando lentamente las proteínas del centro de reacción dañadas (Hanelt, 1998). Posteriormente se propuso una variante al modelo de Hanelt (1998), mediante la cual se introdujo en la expresión matemática para la fotoinhibición un término asociado a la recuperación, puesto que se asume que la fase funcional de la recuperación comienza desde el momento en el que se aplican las condiciones de estrés y no una vez que terminan estas, tal y como se asumía en el modelo de Hanelt (Conde-Álvarez, 2001).

Como se apuntó anteriormente, se detectó la presencia de las dos fases en los periodos de inhibición y recuperación para *P. leucosticta*. Cuando se las exponía a los tratamientos APUV y AP los talos se comportaban como especies recolectadas en zonas poco profundas, afirmación que de hecho es cierta para esta especie. Además la contribución de la alta irradiancia PAR fue mayor en la caída del rendimiento cuántico efectivo que la contribución de la RUV, ya que entre AP y APUV no se observó un comportamiento muy distinto. La RUV únicamente contribuía en la velocidad con que se alcanzaba la mayor de las caídas del rendimiento. Ya se había apuntado en trabajos anteriores, que la radiación PAR era más activa causando la fotoinhibición, y que la RUV principalmente afectaba al retraso de la recuperación (Hanelt *et al.*, 1997a). Sin embargo, fijándonos en los tratamientos BP y BPUV se observó que en estos casos, la influencia de la

RUV fue superior que en el caso de altas irradiancias, concretamente la RUV provocó una caída del rendimiento cuántico efectivo, pero no se produjo una caída tan brusca en las primeras horas de exposición como ocurría cuando la alta irradiancia PAR estaba presente. Este resultado coincide con el de otros ejemplares del género *Porphyra*, cuando se las exponía a bajas y altas irradiancias de PAR, la caída del rendimiento cuántico de fluorescencia de la clorofila *a* era del 6% y del 80-90%, respectivamente (Figueroa *et al.*, 2003a). Parece ser que la alta irradiancia PAR también influyó más que la RUV cuando se exponían los ejemplares de *P. columbina* a la radiación solar, ya que estuviese o no presente la RUV, la caída del rendimiento cuántico óptimo era la misma. Al igual que ocurría en *P. umbilicalis* expuesta a los tratamientos lumínicos PAB, PA y P, con una irradiancia de PAR $400 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en la que se observó una caída brusca del rendimiento cuántico efectivo después de una exposición de 15 minutos, sin observarse diferencias entre tratamientos, la contribución de la alta irradiancia PAR fue mayor que la de la RUV (Häder *et al.*, 1999). De hecho, el rendimiento fotosintético se mantuvo superior en *P. columbina* después de 3 días bajo sólo un 25% de radiación solar respecto a los demás tratamientos, incluso respecto al tratamiento P en el que estaba ausente la RUV. Smith y colaboradores (1992) determinaron que cambios en la relación RUV/PAR podrían actuar como señal ambiental y modular los mecanismos de fotoinhibición y fotoprotección. Caldwell y Flint (1997) también encontraron que la relación RUV/PAR afectaba sustancialmente a la respuesta biológica. En los tratamientos lumínicos BPUV y APUV para *P. leucosticta* la relación RUV/PAR fue distinta, ya que se mantenía la misma cantidad de RUV frente a un cambio en la radiación PAR, por ello, el aporte de la RUV al proceso de fotoinhibición podría haber sido distinto para ambos tratamientos lumínicos en comparación con aquellos en los que la RUV no estaba presente.

III.4.2. Variaciones pigmentarias:

Hay autores que determinaron variaciones pigmentarias (de clorofila *a* y ficobiliproteínas) en periodos de tiempo cortos tanto en laboratorio (Rüdiger y López-Figueroa, 1992) como en condiciones naturales, relacionándose negativamente con la presencia de RUV en las horas centrales del día (López-Figueroa, 1992). Además en *P. leucosticta* se encontró un patrón diario en la concentración pigmentaria, al igual que ocurría con la producción de oxígeno y los rendimientos cuánticos de fluorescencia; concretamente, se determinó que la RUV provocaba un efecto directo en el metabolismo fotosintético mediante la fotooxidación de las moléculas de clorofila *a*, además la ausencia de RUV producía una rápida regeneración de las moléculas de ficoeritrina (Figueroa *et al.*, 1997). La ficocianina decrecía de manera más pronunciada que la clorofila *a* o los carotenoides cuando la RUV estaba presente en el cultivo de la cianobacteria *Anabaena* sp. después de 24 horas de exposición (Sinha *et al.*, 1998). En general, las variaciones

pigmentarias encontradas en *P. leucosticta* fueron pequeñas, la relación FE/FC disminuyó en los tratamientos en los que la RUV no estaba presente ya a las 24 horas de exposición y aumentó en presencia de RUV tras la recuperación. En *P. umbilicalis* no encontraron variaciones pigmentarias después de exposiciones de 24 horas a varios tratamientos lumínicos (Aguilera *et al.*, 1999a). En *P. columbina* se observaron mayores variaciones del contenido de ficobiliproteínas que en *P. leucosticta*, concretamente las variaciones se produjeron en la concentración de ficoeritrina, mientras que la ficocianina se mantuvo invariante. La FC presenta una menor plasticidad por su posición en el ficobilisoma (Algarra y Rüdiger, 1993). En ausencia de radiación UVB se produjo una caída de FE tras el periodo de exposición. Sin embargo, se observó un efecto negativo de la RUV en el contenido interno de clorofila *a* y ficobiliproteínas cuando se exponían los talos de *P. columbina* a la radiación solar directa, aunque la radiación UVB retardaba la caída del contenido interno de clorofila *a*.

III.4.3. Variaciones del contenido de MAAs:

Se observaron caídas en el contenido de MAAs tanto en *P. columbina* como en *P. leucosticta*, aunque de menor magnitud en la primera de las especies. Además las caídas en *P. columbina* cultivadas con una fuente de luz artificial se producían únicamente en el fototipo sombra, que poseía un contenido de MAAs inicial más elevado y se exponían a dosis de radiación similares a las que recibían las de tipo sol en su hábitat natural, llegándose a igualar el contenido interno de MAAs al de este último grupo. De nuevo se observó una menor concentración de MAAs cuando las plantas recibían mayores dosis de radiación.

Se produjo una caída del contenido interno de MAAs del 26% respecto al inicial en *P. columbina* cultivada con luz artificial, en ausencia de RUV, y del 40% en el tratamiento AP para *P. leucosticta*. Se observa una correspondencia entre el porcentaje de caída de MAAs y las irradiancias de PAR recibidas, puesto que si para una irradiancia de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (IBE para la fotosíntesis (Fork, 1963), $203 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) se produjo una caída del 26% en *P. columbina*, le correspondería a una irradiancia de $460 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (IBE para la fotosíntesis (Fork, 1963), $322 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en *P. leucosticta* una caída del 40%. Sin embargo, esta correspondencia se perdía cuando la irradiancia PAR era más baja y también en presencia de la RUV. El contenido interno de MAAs presentó menores variaciones en presencia de RUV en *P. columbina* que en *P. leucosticta*, puesto que en ésta, la exposición a la RUV provocaba una disminución adicional de la concentración de MAAs a altas irradiancias de PAR, mientras que en *P. columbina* tipo sombra no se observaron diferencias en el contenido de MAAs en presencia o no de alguna banda de RUV, esta última especie estaba recibiendo un 10.5% más radiación UVA y un 10.5% menos radiación UVB. Sin embargo, la RUV contribuyó negativamente a la concentración de MAAs en *P. columbina* tipo sol, a pesar de que la irradiancia de incubación en este último caso

era inferior, y también influyó de manera negativa en el contenido interno de MAAs cuando los talos de *P. columbina* se exponían a radiación solar. En este último caso, concretamente fue la radiación UVB la responsable de esta disminución en el contenido interno. De nuevo se podría pensar en que *P. columbina* poseía una menor eficiencia en la absorción de luz, que le estaría favoreciendo el que se mantuviese el contenido de MAAs en unos niveles más altos que en *P. leucosticta*.

Las menores variaciones del contenido de MAAs en *P. columbina*, impiden que se encuentre una relación entre dicho contenido y el rendimiento cuántico normalizado frente a la dosis, como ocurría en *P. leucosticta*, en la que a mayores dosis (asociadas con menores rendimientos cuánticos de fluorescencia) la capacidad de cambio del contenido de MAAs era muy superior, llegando a la saturación cuando las dosis de radiación eran menores, o dicho de otro modo, pequeñas dosis provocarían pequeños cambios en la concentración total de MAAs y dosis mayores inducirían mayores cambios.

Todos estos resultados derivan en conclusiones contrarias a las obtenidas por otros autores (Karsten *et al.*, 1998b), en las especies de *Porphyra* estudiadas la RUV no provocaba un incremento en la concentración de MAAs, sino que por el contrario, influía negativamente en el proceso de acumulación de estas moléculas. Tampoco encontraron una inducción del contenido de MAAs en *P. umbilicalis* tras el cultivo durante 72 horas a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB con una irradiancia PAR de $496 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, y $24.44 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de radiación UVA y $0.64 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVB, el contenido de MAAs se mantuvo respecto al valor inicial ($10 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$) (Gröniger *et al.*, 1999). Dichos autores no analizaron el contenido de los diferentes tipos de MAAs, por lo que no se podrían comparar con nuestros datos, en los que a pesar de que en algunos casos no se observaron cambios en el total de MAAs sí variaban las proporciones relativas de los diferentes tipos. En otras especies, como *Neuroglossum ligulatum* y *Plocamium cartilagineum*, se encontraron concentraciones de MAAs inferiores en el tratamiento PAB que en P y PA, estos autores sugirieron que los MAAs eran degradados o bien se expulsaban al medio en presencia de radiación UVB (Hoyer *et al.*, 2002).

A pesar de que en *P. leucosticta* la RUV no influía en la concentración total de MAAs en el tratamiento con baja irradiancia PAR, favoreció el incremento de shinorine en un 11% y la caída, en esa misma proporción, de porphyra-334. También en macroalgas del ártico observaron un incremento de shinorine coincidiendo con las mayores dosis de radiación solar (Aguilera *et al.*, 2002). La acumulación preferente de shinorine, al tratarse de uno de los primeros MAAs en la ruta de síntesis desde el gadusol y mycosporine-gly, podría estar actuando como molécula iniciadora de la síntesis del resto de MAAs o bien se podría revertir la reacción hacia gadusol, como molécula antioxidante, siempre y cuando los talos recibiesen la señal lumínica que derive

en ello. En altas irradiancias PAR, la RUV no influía en la proporción relativa de shinorine y sí se producía una mayor caída aún en porphyra-334 cuando esta banda estaba presente. En *P. leucosticta* en todos los tratamientos tras la recuperación, al igual que ocurría en *P. columbina* cuando se exponía a las mayores irradiancias, se acumulaba preferentemente shinorine frente a porphyra-334. En los ejemplares de tipo sombra la presencia de la radiación UVB en el periodo de exposición impedía que se igualasen las proporciones relativas de ambos MAAs con las de tipo sol, tal y como ocurría en los tratamientos PA y P. Pero este proceso era dependiente de la fuente de radiación lumínica, puesto que bajo radiación solar apenas se observaron diferencias en las proporciones relativas de MAAs entre tratamientos en *P. columbina*, incluso en este último caso, la radiación UVB provocó un ligero incremento en la proporción relativa de shinorine frente a porphyra-334. Sin embargo, en *Devaleraea ramentaceae* expuesta a radiación solar (tratamientos P, PA y PAB) a pesar de no observarse un incremento en el contenido de MAAs en P ni en PA, sí se incrementó la concentración de palythine y de mycosporine-gly, pero no la de shinorine y porphyra-334 en PAB (Karsten *et al.*, 1999), las proporciones de estos dos últimos MAAs disminuyeron en presencia de radiación UVB al contrario de lo que ocurría en *P. leucosticta* y *P. columbina*. Se determinó en *C. crispus* que altas dosis de radiación UVA y UVB en ausencia de PAR, resultaban en la acumulación de MAAs, particularmente shinorine, después de algunos días de cultivo (Karsten *et al.*, 1998a). En otro experimento de 12 días de duración, se determinó que la radiación UVB tenía un efecto negativo en la acumulación de los MAAs mayoritarios (shinorine y palythine) en *C. crispus*, mientras que en presencia de radiación UVA se sintetizaban, al contrario de asterina-330, palythinol y palythene que se sintetizaban principalmente en presencia de UVB (Kräbs *et al.*, 2002). Otro resultado diferente se encontró en *P. palmata*, en la que la radiación PAR estimulaba la síntesis de porphyra-334, y la radiación UVA y UVB conducían preferentemente a la acumulación de shinorine y palythine respectivamente (Karsten y Wiencke, 1999). La síntesis de shinorine también estaba estimulada en *Phaeocystis antarctica* por la RUV, mientras que se encontró más porphyra-334 en ausencia de esta banda (Newman *et al.*, 2000).

Observando las discrepancias que existen, se puede concluir que la inducción, formación y acumulación de uno u otro MAA frente a distintas bandas de radiación es un proceso muy flexible, tal y como concluyeron Hoyer y colaboradores (2002). Se encuentran distintos comportamientos incluso dentro de una misma especie, aunque en general, en *Porphyra* a pesar de no observarse un incremento en el contenido total de MAAs en presencia de RUV, se producía una acumulación preferencial de shinorine en presencia de radiación UVB, al contrario de lo que ocurría en *C. crispus* (Kräbs *et al.*, 2002), pero de igual modo a como respondía *P. palmata* (Karsten y Wiencke, 1999).

CAPÍTULO IV

**Efecto de la irradiancia y calidad lumínica en la acumulación de MAAs
y en el estado fotosintético de *Porphyra leucosticta*.**

IV.1. Efecto de la irradiancia PAR en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de *P. leucosticta*.

IV.1.1. Diseño experimental:

Se expusieron los talos durante una semana en luz continua a cinco irradiancias PAR distintas. Los talos empleados para este experimento fueron recolectados el 23 de febrero de 2001 y se mantuvieron durante una semana en precultivo a 15° C con burbujeo de aire constante y a 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR (lámparas Osram). Se empleó como medio de cultivo agua de mar natural filtrada enriquecida con medio Provasoli. Las cinco irradiancias PAR se consiguieron con el uso de placas difusoras Plexiglas® gs Weiss 017. Para tres de ellas: 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se usaron lámparas Osram y para las otras dos se empleó una lámpara Optimarc (70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (figura IV.1.1.A,B). En estos dos últimos casos debido a que la luz emitida por la lámpara Optimarc posee un 5.8% de RUV en el rango de 300-400 nm (ver figura M.3), se emplearon filtros Ultraphan-395 para eliminar la presencia de la RUV.

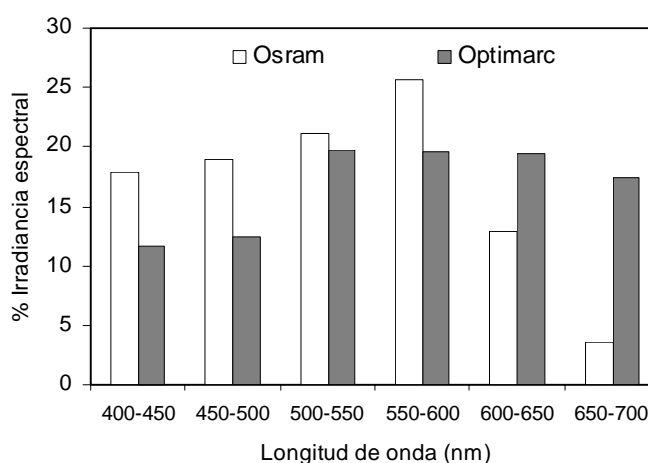


Figura IV.1.1.A. Porcentaje de la irradiancia espectral correspondiente a bandas de ancho 50 nm para las lámparas Osram y Optimarc (extraído de Fig. M.3.B).

Para evitar un incremento de temperatura en el cultivo con la lámpara Optimarc se empleó un baño con temperatura controlada ($15\pm 1^\circ\text{C}$). El rendimiento cuántico óptimo, los pigmentos (clorofila *a* y ficobiliproteínas), proteínas solubles y el contenido de MAAs, se midieron al iniciar el experimento y tras 7 días de cultivo.

	Lámparas Osram			Lámpara Optimarc	
Irradiancia ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	10	70	135	70	300
IBE ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, Fork 1963)	7	47	91	49	210

Tiempos de muestreo:

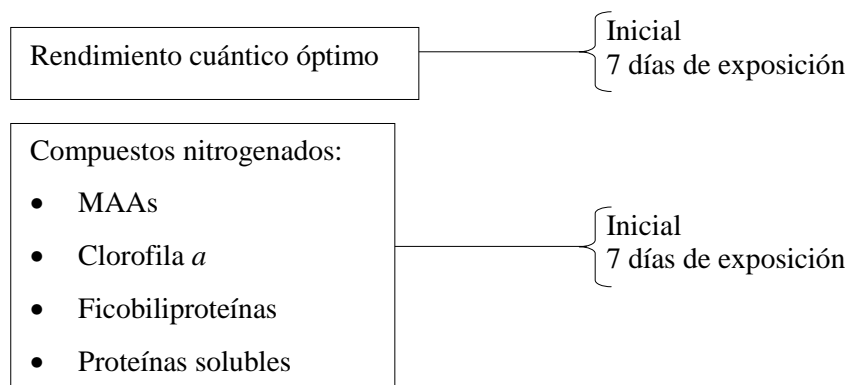


Figura IV.1.B. Representación del diseño experimental para la exposición durante 7 días a las irradiancias 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) para *P. leucosticta*.

IV.1.2. Resultados:

Respuesta fotosintética:

El único tratamiento que provocó una caída significativa del rendimiento cuántico óptimo tras los 7 días de experimentación fue la exposición a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (0.5 ± 0.041) ($p < 0.05$). En los demás casos se mantuvo el valor inicial de F_v/F_m (0.63 ± 0.049) (figura IV.1.2).

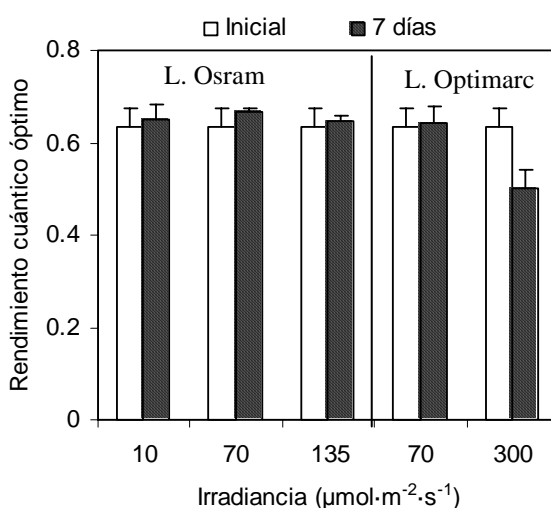


Figura IV.1.2. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) al iniciar el experimento y tras los 7 días de exposición a las irradiancias 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) para *P. leucosticta*.

Contenido pigmentario (clorofila a y ficobiliproteínas):

Se produjo una caída significativa del contenido de clorofila *a* después de 7 días de experimentación en los tratamientos de $135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y en $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p < 0.05$), en los tratamientos de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ la concentración interna de clorofila *a* se mantuvo a lo largo de la semana de cultivo ($p > 0.05$). El tratamiento de $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ indujo un incremento significativo del contenido interno de clorofila *a* ($p < 0.05$) (figura IV.1.3).

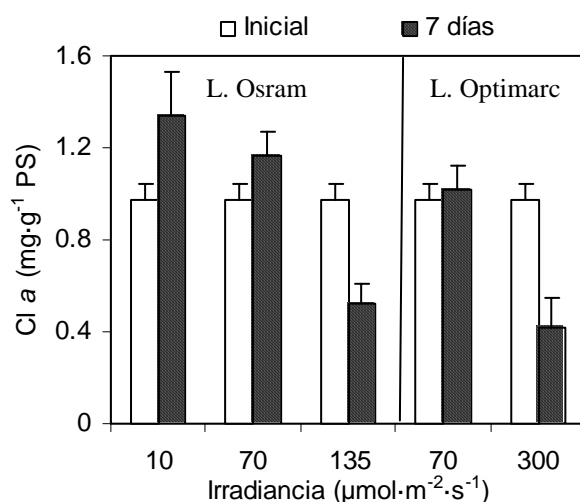


Figura IV.1.3. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras los 7 días de exposición a las irradiancias 10 , 70 y $135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) para *P. leucosticta*.

Se produjo una caída significativa del contenido de ficoeritrina tras los 7 días de experimentación en todos los tratamientos lumínicos ($p < 0.05$), excepto en el de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) en el que no varió la concentración respecto al valor inicial ($p > 0.05$) (figura IV.1.4.A). La concentración interna de ficocianina cayó significativamente respecto al valor inicial en todos los tratamientos ($p < 0.05$) (figura IV.1.4.B). La relación FE/FC se incrementó tras el periodo de cultivo en todos los tratamientos, siendo este incremento superior para 70 y $135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y para $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) ($p < 0.05$) (figura IV.1.4.C).

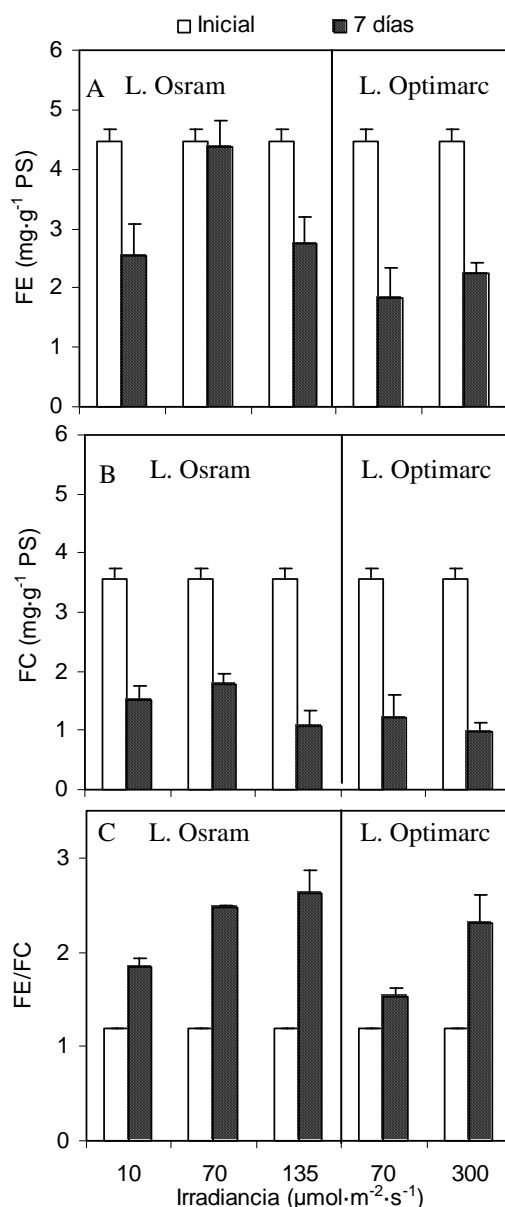


Figura IV.1.4. Concentración de ficoeritrina (A), ficocianina (B) y relación FE/FC (C) al iniciar el experimento y tras los 7 días de exposición a las irradiancias 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) para *P. leucosticta*.

Acumulación de proteínas solubles:

Se produjo una caída significativa del contenido de proteínas solubles en los tratamientos de 10 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) a los 7 días de experimentación ($p < 0.05$) y no se observó variación en el tratamiento de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p > 0.05$). Sin embargo, sí se produjo una caída del contenido de proteínas solubles tras el cultivo en el tratamiento de 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) ($p < 0.05$) (figura IV.1.5).

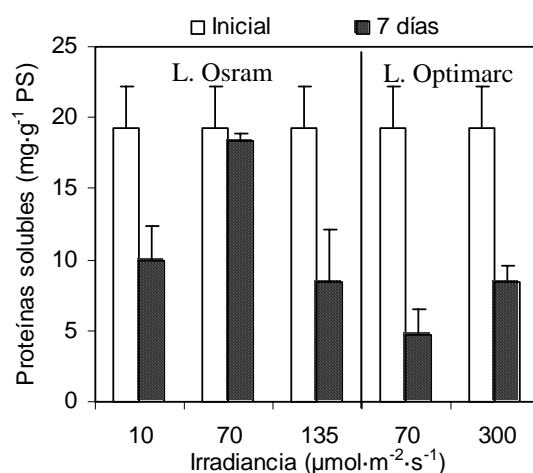


Figura IV.1.5. Concentración de proteínas solubles al iniciar el experimento y tras los 7 días de exposición a las irradiancias 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) para *P. leucosticta*.

Relación FB/PtS:

El coeficiente de determinación para la regresión lineal entre ambas variables fue de 0.79 ($n=25$; $p<0.01$). La ecuación para dicha relación fue: $\text{FB}=0.279\cdot\text{PtS}+1.1$

Contenido de MAAs:

Tras los 7 días de cultivo se observó una disminución significativa del contenido de MAAs respecto a la concentración inicial en todos los tratamientos ($p<0.05$), excepto en el tratamiento de 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, en el que se mantuvo la concentración del inicio ($p>0.05$). Además transcurridos los 7 días de cultivo la concentración de MAAs fue inferior en el tratamiento de 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ que en el de 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ($p<0.05$) (figura IV.1.6).

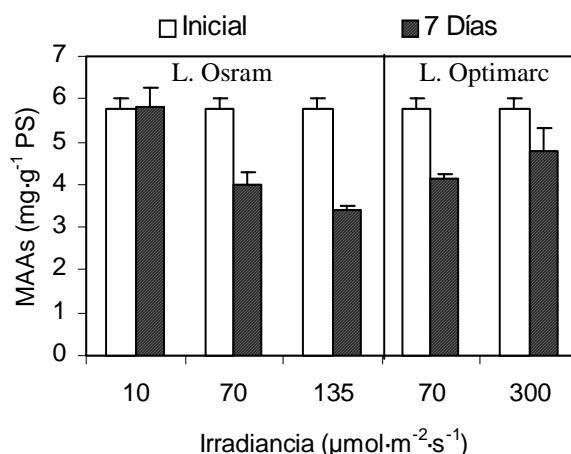


Figura IV.1.6. Concentración de MAAs al iniciar el experimento y tras los 7 días de exposición a las irradiancias 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) para *P. leucosticta*.

El 80% del total de MAAs lo componía porphyrina-334, el 10% aproximadamente shinorine, palythine y asterina-330 estaban presentes en menos de un 5%, y del resto formaba parte una pequeñísima proporción de mycosporine-gly. Las proporciones relativas no variaron significativamente a lo largo del experimento en el tratamiento de menor irradiancia ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). En el de mayor irradiancia ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) disminuyó significativamente la proporción de porphyrina-334 y se incrementaron las de palythine y asterina-330. Y en el resto de tratamientos se incrementó la proporción relativa de shinorine ($p < 0.05$) (figura IV.1.7.A,D).

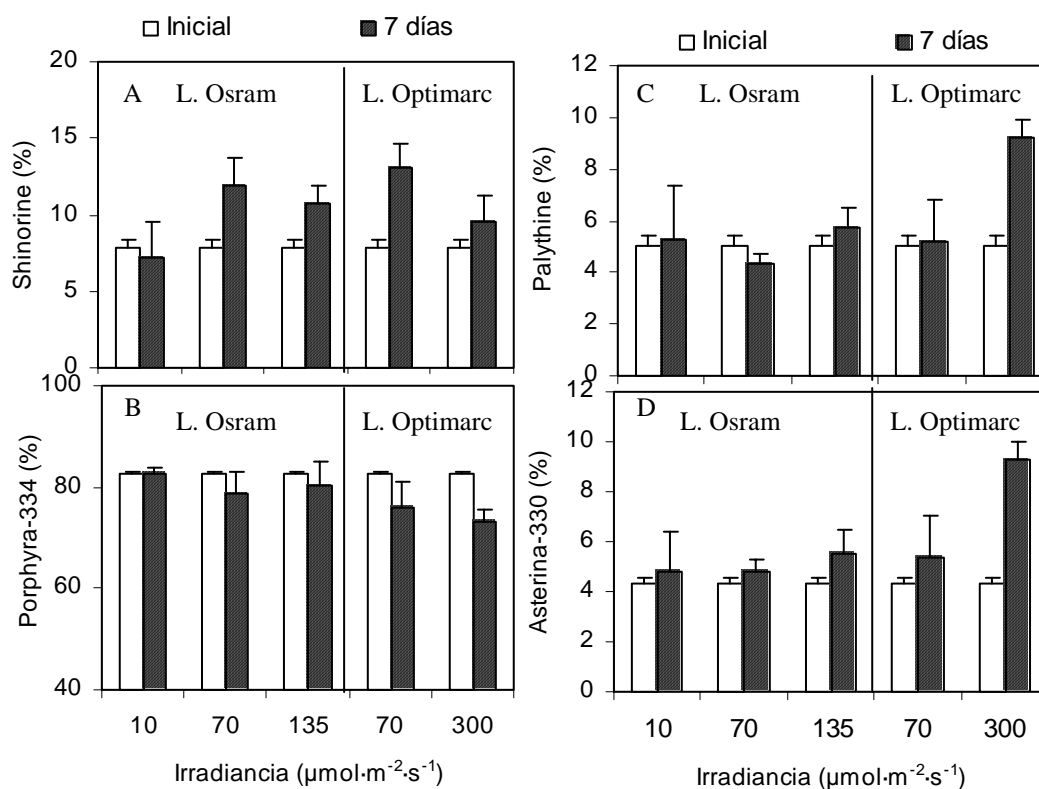


Figura IV.1.7. Proporción relativa de shinorine (A), porphyrina-334 (B), palythine (C) y asterina-330 (D) al iniciar el experimento y tras los 7 días de exposición a las irradiancias 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc) para *P. leucosticta*.

Correlaciones:

Tabla IV.1.1. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables indicadas, en la exposición de *P. leucosticta* a las irradiancias 10, 70 y 135 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram) y 70 y 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Optimarc). ** Correlación significativa $p<0.01$, * Correlación significativa $p<0.05$ (n=6).

	E	F_v/F_m	Cl <i>a</i>	FB	PtS	MAAs	SH	PR	PNE
F_v/F_m	-0.918*								
Cl <i>a</i>	-0.888*	0.689							
FB	-0.501	0.388	0.437						
PtS	-0.203	0.281	0.337	0.947**					
MAAs	-0.175	-0.124	0.436	0.482	0.318				
SH	0.009	0.149	-0.147	-0.436	-0.307	-0.833*			
PR	-0.774	0.700	0.546	0.664	0.480	0.426	-0.578		
PNE	0.918*	-0.975**	-0.754	-0.520	-0.422	0.038	-0.155	-0.670	
AS	0.957*	-0.954**	-0.740	-0.599	-0.443	-0.128	0.056	-0.816*	0.969**

La irradiancia con la que se incubaron los talos se correlacionó negativamente con el contenido interno de clorofila *a* y con el rendimiento cuántico óptimo. La concentración interna de MAAs se correlacionó negativamente con el contenido de shinorine, también fue negativa la relación de porphyra-334 y asterina-330, sin embargo, fue positiva la correlación entre este último MAA y palythine (tabla IV.1.1).

IV.2. Efecto de la calidad lumínica (luz blanca, azul, verde, amarilla y roja) en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de *P. leucosticta*.

IV.2.1. Diseño experimental:

Los talos empleados para este experimento se recolectaron el 5 de abril de 2002 en Lagos (Málaga) y se mantuvieron durante una semana en precultivo en el laboratorio a 15° C con burbujeo de aire constante y en agua de mar artificial (Instant Ocean Sea Salt) a la que no se adicionó nitrógeno inorgánico y sí fosfato sódico dibásico (10 μM). El precultivo se realizó en luz blanca a una irradiancia de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Truelite). Transcurrida la semana de precultivo se emplearon 5 cilindros con 90 discos por cilindro de *P. leucosticta* los cuales se expusieron durante 7 días a los tratamientos lumínicos indicados en el apartado de material y métodos (azul, verde, amarilla y roja), además del tratamiento en luz blanca, para el que se emplearon dos lámparas fluorescentes Truelite. La irradiancia para cada uno de los tratamientos fue la misma, 45 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (figura IV.2.1.B). Al inicio del experimento se cambió el medio de cultivo, se empleó agua de mar artificial a la que se añadió 300 μM de cloruro amónico.

Se determinó al iniciar el experimento y a los 3 y 7 días de experimentación el rendimiento cuántico óptimo y las curvas TTE-E (empleando el fluorímetro acuático Diving-PAM), el crecimiento (opción B, material y métodos), el contenido pigmentario (clorofila *a* y ficobiliproteínas), la concentración de proteínas solubles y estructurales, el carbono y nitrógeno internos, la absorbancia y el contenido de MAAs (figura IV.2.1.C). También se midieron los niveles de amonio en el medio de cultivo a lo largo de la experimentación para asegurarnos que no se agotaba el nitrógeno inorgánico a lo largo del periodo de experimentación.

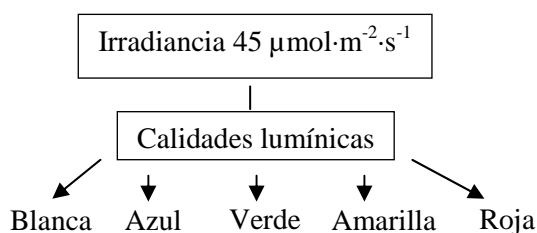


Figura IV.2.1.A. Esquema del diseño experimental.

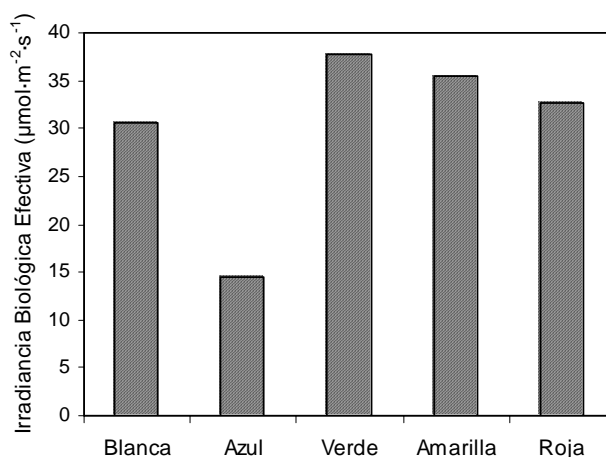


Figura IV.2.1.B. IBE para cada tratamiento lumínico, calculada a partir del espectro de acción de la fotosíntesis de *P. perforata* (Fork, 1963).

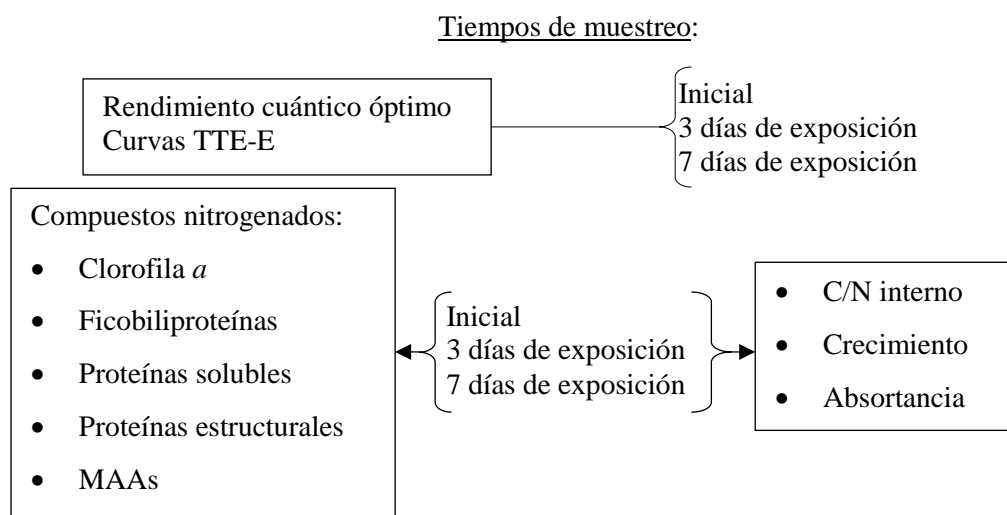


Figura IV.2.1.C. Variables medidas y tiempos de muestreo.

IV.2.2. Resultados:

Respuesta fotosintética:

Después de 3 días de experimentación no se detectaron diferencias significativas en el rendimiento cuántico óptimo de los discos incubados para ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$), sin embargo, después de 7 días el F_v/F_m de los discos cultivados en luz azul fue significativamente superior que el resto y el de los discos cultivados en luz blanca fue superior al de los discos cultivados en roja y amarilla ($p < 0.05$). En los tratamientos con luz blanca, amarilla y verde no se detectaron diferencias significativas a lo largo del periodo de incubación ($p > 0.05$), en luz azul se produjo un incremento significativo del rendimiento después de 7 días

respecto al inicial y en luz roja una caída significativa respecto al inicial ($p < 0.05$) (figura IV.2.2).

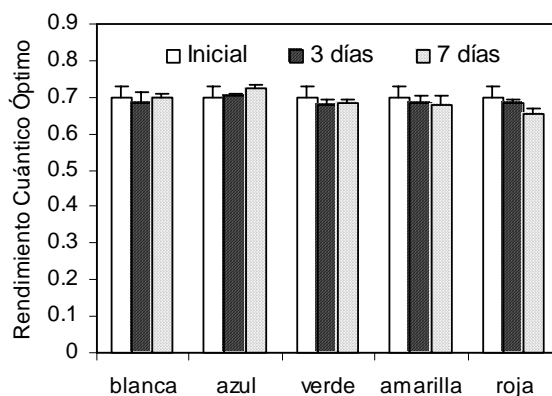


Figura IV.2.2. Rendimiento cuántico óptimo (F_v/F_m) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Del ajuste hiperbólico (Jassby y Platt, 1976) de las curvas TTE-E, medidas con el fluorímetro acuático Diving-PAM, se obtuvieron los valores de $TTE_{máx}$ y la pendiente inicial de la curva. A los 3 días no se observaron diferencias significativas en las pendientes para los distintos tratamientos ($p > 0.05$) y sí en los valores de $TTE_{máx}$, fue significativamente superior en los discos cultivados en luz azul respecto a aquellos cultivados en luz blanca, roja y verde ($p < 0.05$). A los 7 días sí se observaron diferencias en las pendientes de la curva, en el tratamiento con luz azul la pendiente fue menor que en los demás tratamientos, seguido del tratamiento con luz roja ($p < 0.05$), entre los tratamientos con luz blanca, amarilla y verde no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Las diferencias en el tiempo para un mismo tratamiento fueron las siguientes, para la luz blanca y la luz roja el valor de $TTE_{máx}$ se incrementó significativamente a lo largo del tiempo, para la luz azul a los 3 días se observó un incremento significativo de la $TTE_{máx}$ y una caída significativa a los 7 días sin alcanzar el valor inicial, en los tratamientos con luz amarilla y verde la $TTE_{máx}$ se incrementó significativamente a los 3 días de cultivo y el valor se mantuvo hasta los 7 días ($p < 0.05$) (figura IV.2.3). Respecto a las pendientes de las curvas no se observaron diferencias significativas a lo largo de todo el periodo de experimentación en los tratamientos con luz azul y roja ($p > 0.05$), en los tratamientos con luz blanca, amarilla y verde la pendiente se incrementó significativamente respecto al inicial después de los 7 días de cultivo ($p < 0.05$) (figura IV.2.4).

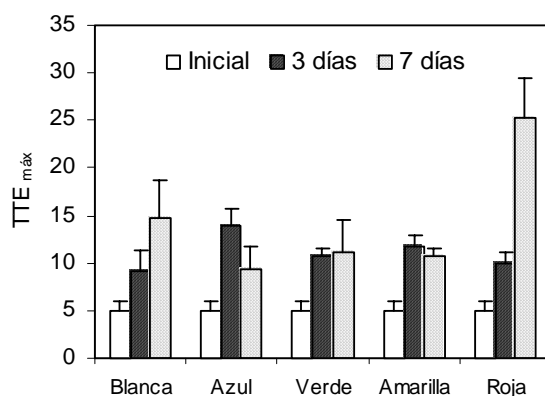


Figura IV.2.3. TTE_{máx} ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) de las curvas TTE-E al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

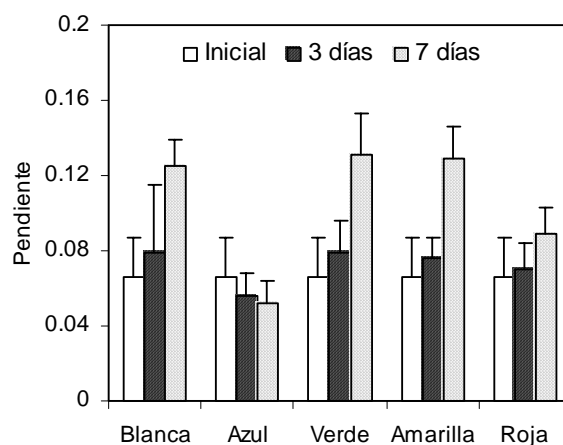


Figura IV.2.4. Pendiente ($\mu\text{mol e}^{-}\cdot(\mu\text{mol fotones})^{-1}$) de las curvas TTE-E al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Crecimiento:

Únicamente en el tratamiento con luz blanca se observó un incremento significativo en el área de los discos después de 3 días de cultivo ($p < 0.05$). Sin embargo, a los 7 días se produjo un incremento significativo del área en todos los tratamientos ($p < 0.05$). Fijando el tiempo, a los 3 días no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) y a los 7 días el área de los discos cultivados en luz azul fue significativamente menor que el de los discos cultivados en luz blanca, verde y roja ($p < 0.05$) (figura IV.2.5).

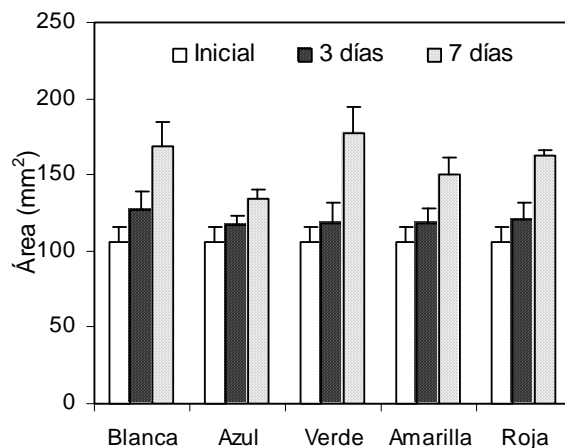


Figura IV.2.5. Área de los discos al inicio y tras 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

La tasa relativa de crecimiento (TRC) después de los 7 días de experimentación en luz amarilla fue significativamente inferior que en luz verde y en luz azul significativamente inferior que en luz blanca, roja y verde ($p < 0.05$) (figura IV.2.6).

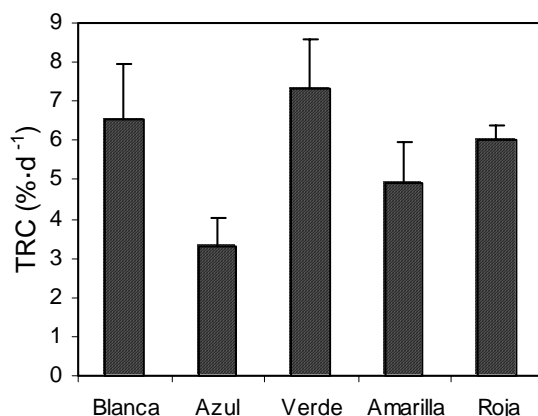


Figura IV.2.6. Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) después de los 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Contenido pigmentario (clorofila a y ficobiliproteínas):

El contenido de clorofila *a* se incrementó significativamente a los 3 días respecto al inicial en todos los tratamientos y continuó aumentando hasta el día 7 en los tratamientos con luz amarilla y verde ($p < 0.05$). En los demás tratamientos, no se detectaron diferencias significativas entre los días 3 y 7. Tampoco en el tiempo se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (figura IV.2.7).

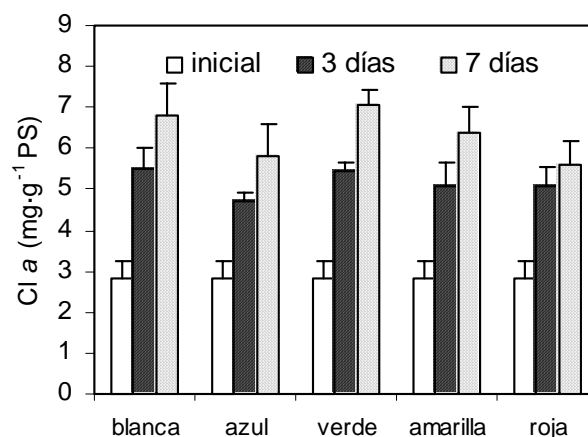


Figura IV.2.7. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

La concentración interna de ficoeritrina, ficocianina y, en consecuencia, la de ficobiliproteínas se incrementó significativamente a los 7 días de incubación en todos los tratamientos ($p < 0.05$), con excepción del tratamiento con luz azul, en el que no se observó incremento alguno del contenido interno de FC. A los 3 días no se detectaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p > 0.05$) y a los 7 días se observó que el contenido de ficoeritrina en los tratamientos con luz blanca y azul fue significativamente superior que en el tratamiento con luz roja ($p < 0.05$). Respecto al contenido de ficocianina, al día 3 los discos cultivados bajo luz roja presentaron un contenido de ficocianina significativamente superior que aquellos cultivados bajo luz blanca, amarilla y verde ($p < 0.05$). Sin embargo, al día 7 no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$) (figura IV.2.8). Calculando el contenido de ficobiliproteínas en su conjunto, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos en los días 3 y 7 ($p > 0.05$). La relación FE/FC no varió significativamente en ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$), excepto en luz azul en el que se observó un aumento significativo de dicha relación a los 7 días de cultivo ($p < 0.05$). A los 3 días la relación FE/FC fue significativamente mayor en el tratamiento con luz blanca que en el tratamiento con luz roja ($p < 0.05$), y a los 7 días la relación para el tratamiento con luz azul fue significativamente superior que para los demás tratamientos, y para el tratamiento con luz roja significativamente inferior ($p < 0.05$), no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos con luz blanca, amarilla y verde ($p > 0.05$) (figura IV.2.8).

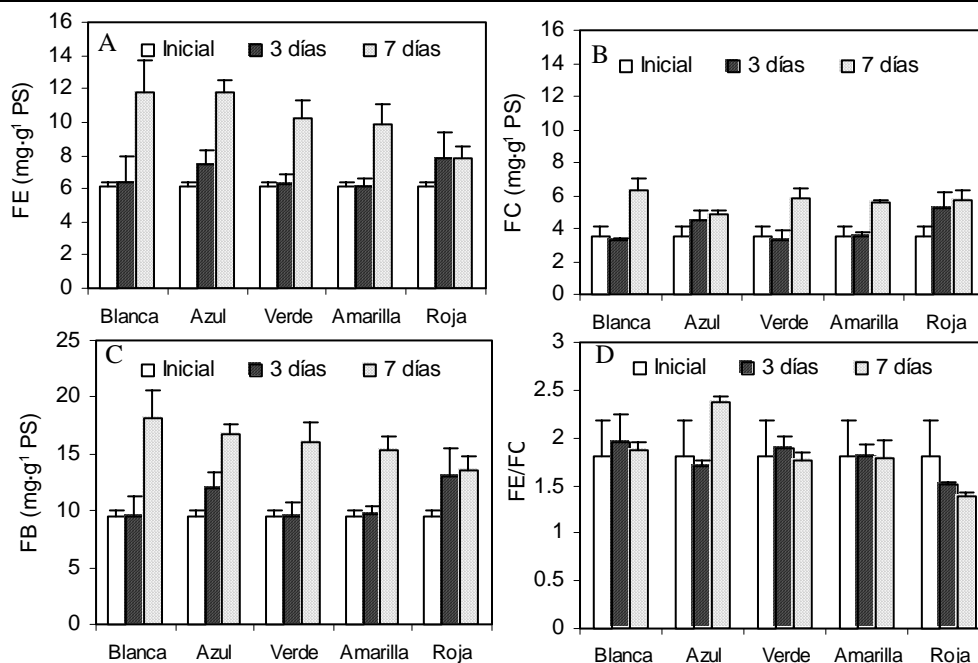


Figura IV.2.8. Concentración de ficoeritrina (A), ficocianina (B), ficobiliproteínas (C) y relación FE/FC (D) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Acumulación de proteínas solubles y estructurales:

Las proteínas solubles se incrementaron significativamente a los 3 días de cultivo en todos los tratamientos ($p < 0.05$) respecto al valor inicial. Después de los 7 días de cultivo el contenido interno fue superior significativamente respecto al valor a los 3 días en todos los tratamientos, excepto en luz roja ($p < 0.05$). Fijando el día de experimentación, se observó que a los 3 días los discos cultivados con luz roja tenían un contenido interno de proteínas solubles superior a los discos cultivados con luz amarilla ($p < 0.05$). A los 7 días de experimentación los discos cultivados con luz roja presentaron un contenido interno de proteínas solubles inferior a aquellos cultivados con luz azul y blanca ($p < 0.05$) (figura IV.2.9).

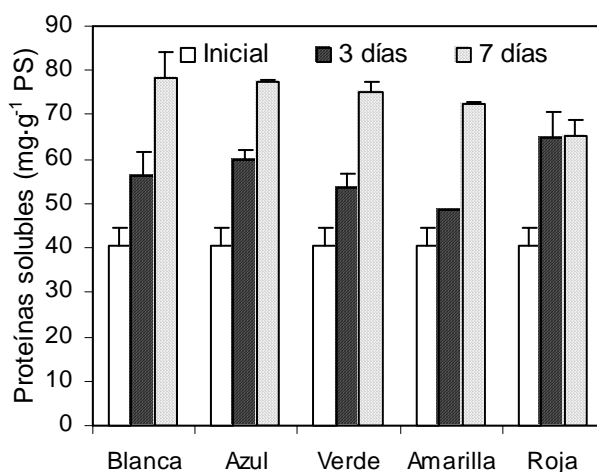


Figura IV.2.9. Concentración de proteínas solubles al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

La concentración interna de proteínas estructurales no varió significativamente entre el valor inicial y los 3 primeros días de experimentación en ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$). A los 7 días los discos cultivados en luz azul presentaron un contenido interno mayor que los discos cultivados en los demás tratamientos ($p < 0.05$). En los tratamientos con luz blanca y amarilla no se detectaron diferencias significativas en el contenido de proteínas estructurales a lo largo de todo el periodo de experimentación ($p > 0.05$), sin embargo, en los tratamientos con luz roja y verde se detectó una caída significativa de la concentración a los 7 días de experimentación y en el tratamiento con luz azul la concentración se incrementó significativamente después de los 7 días ($p < 0.05$) (figura IV.2.10).

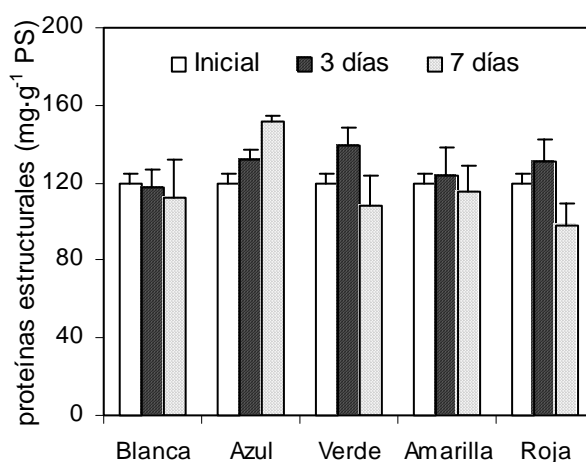


Figura IV.2.10. Concentración de proteínas estructurales al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Relación FB/PtS:

La relación entre ficobiliproteínas y proteínas solubles no varió significativamente entre tratamientos ni a los 3 ni a los 7 días de experimentación ($p > 0.05$). El valor para esta relación estuvo próximo a 0.2 en todos los casos. Fijando los tratamientos, sólo se detectó en los tratamientos con luz blanca y verde que la relación era significativamente superior a los 3 días que a los 7 días ($p < 0.05$) (datos no mostrados). El coeficiente de determinación para la regresión lineal fue de $r = 0.885$ ($n = 29$; $p < 0.01$). La ecuación para dicha relación fue: $FB = 0.277 \cdot PtS - 4.9$.

Carbono y nitrógeno total. Relación C/N:

El contenido interno de carbono no varió significativamente entre tratamientos ($p > 0.05$) y sólo la incubación con luz blanca indujo un incremento significativo del contenido de carbono a los 7 días de experimentación ($p < 0.05$) (figura IV.2.11.A).

El contenido interno de nitrógeno en los discos de *P. leucosticta* se incrementó en todos los tratamientos respecto al valor inicial después de 3 días de experimentación y continuó incrementándose significativamente sólo en el tratamiento con luz blanca y luz azul ($p < 0.05$), en luz verde y amarilla se mantuvo el valor de los 3 días, y en luz roja disminuyó el contenido respecto a los 3 días, pero sin bajar hasta el valor inicial. A los 3 días de experimentación no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) y a los 7 días el tratamiento con luz roja llevó hasta una concentración interna de nitrógeno significativamente inferior que los tratamientos con luz blanca, azul y verde ($p < 0.05$) (figura IV.2.11.B).

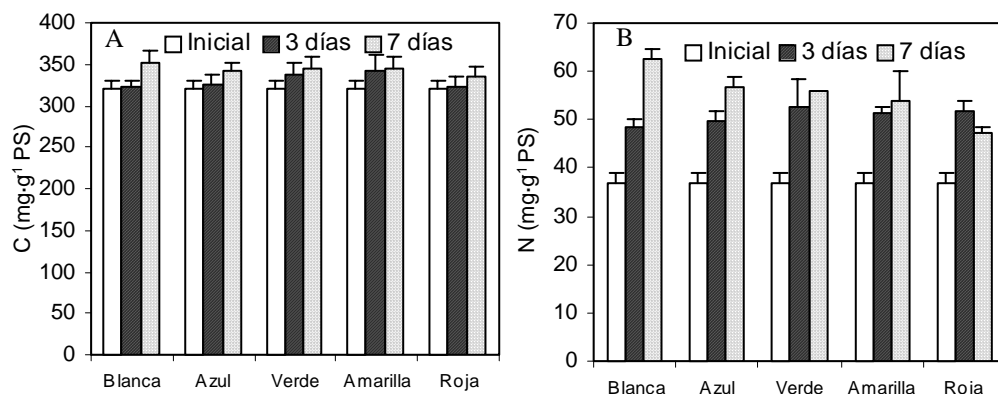


Figura IV.2.11. Contenido interno de C y N al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

La relación C/N cayó significativamente después de 3 días de cultivo en todos los tratamientos, continuó cayendo hasta el día 7 cuando los discos se incubaron con luz blanca y se incrementó, pero sin alcanzar el valor inicial, en el tratamiento con luz roja ($p < 0.05$). En el día 3 no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$) y al día 7 el valor más alto de la relación C/N se observó en los discos cultivados con luz roja. Y con luz blanca, esta relación fue menor significativamente que con luz amarilla ($p < 0.05$) (figura IV.2.12).

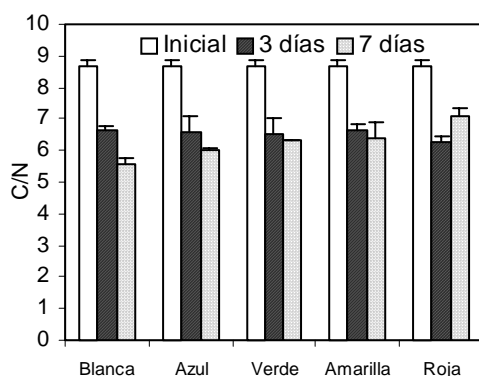


Figura IV.2.12. Relación C/N al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Absortancia:

La absortancia de los discos de *P. leucosticta* se incrementó significativamente en todos los tratamientos conforme avanzaba el periodo de experimentación ($p < 0.05$). La absortancia después de 7 días de cultivo fue significativamente superior a la que se midió después de 3 días y esta última al valor inicial ($p < 0.05$). A los 3 días no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$), sin embargo, después de 7 días de cultivo la absortancia de los discos cultivados en luz blanca fue superior a la de los discos cultivados en luz roja ($p < 0.05$).

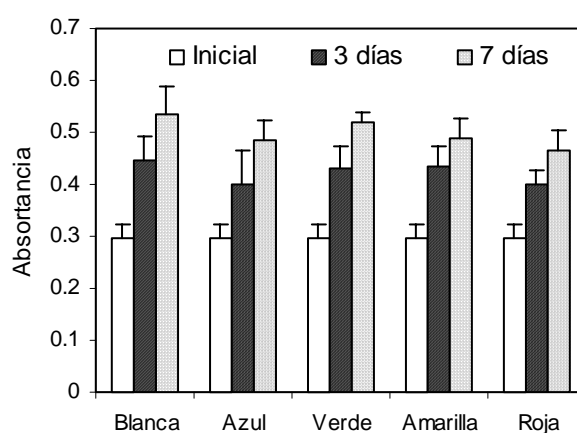


Figura IV.2.13. Absortancia de los talos al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Contenido de MAAs:

El contenido de MAAs no varió significativamente ($p > 0.05$) con el tiempo en los tratamientos en los que se empleó la luz de incubación roja y amarilla, sin embargo, en los tratamientos con luz blanca y azul el contenido se incrementó significativamente ($p < 0.05$) respecto al inicial después de 7 días de incubación y en el tratamiento con luz verde el incremento se produjo ya al día 3 de incubación y se mantuvo ese valor hasta los 7 días. A los 3 días de incubación no se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) y sin embargo, al día 7 el contenido de MAAs fue significativamente superior en el tratamiento con luz azul respecto al rojo y al amarillo ($p < 0.05$) (figura IV.2.14).

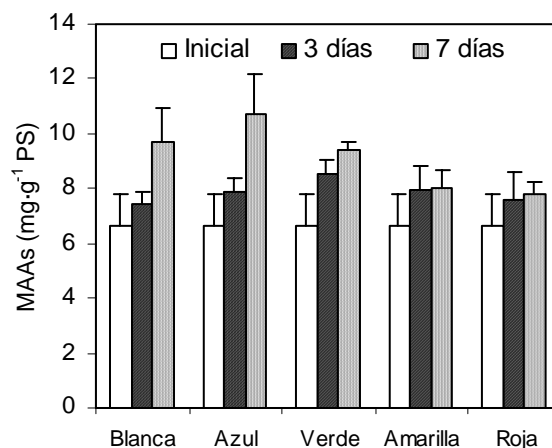


Figura IV.2.14. Concentración de MAAs al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

El contenido inicial de MAAs estaba compuesto por un 12% de shinorine, un 80% de porphyra-334, y un 4%, tanto de palythine como de asterina-330.

En todos los tratamientos excepto en luz azul se produjo un incremento significativo de la proporción relativa de shinorine respecto al inicial a los 3 días de cultivo y continuó incrementándose hasta los 7 días ($p < 0.05$). En luz azul se produjo una caída significativa respecto al inicial de la proporción de shinorine a los 3 días y continuó cayendo hasta los 7 días de cultivo ($p < 0.05$) (figura IV.2.15.A).

Se produjo una caída significativa de la proporción relativa de porphyra-334 respecto a la proporción inicial después de los 7 días de cultivo en los tratamientos con luz roja, amarilla y verde ($p < 0.05$). En luz blanca la proporción cayó ya a los 3 días y continuó disminuyendo hasta el día 7 de cultivo ($p < 0.05$). En luz azul no varió significativamente la proporción de porphyra-334 ($p > 0.05$) (figura IV.2.15.B).

Palythine y asterina-330 se comportaron del mismo modo. En luz blanca y amarilla se observó una caída significativa de la proporción a los 3 días que continuó hasta los 7 días de cultivo ($p < 0.05$). En luz roja y verde se produjo una caída significativa después de los 3 días de cultivo ($p < 0.05$) y este valor se mantuvo hasta el final del experimento. En luz azul la proporción se incrementó significativamente respecto al inicial después de los 7 días de cultivo ($p < 0.05$) (figuras IV.2.15.C,D).

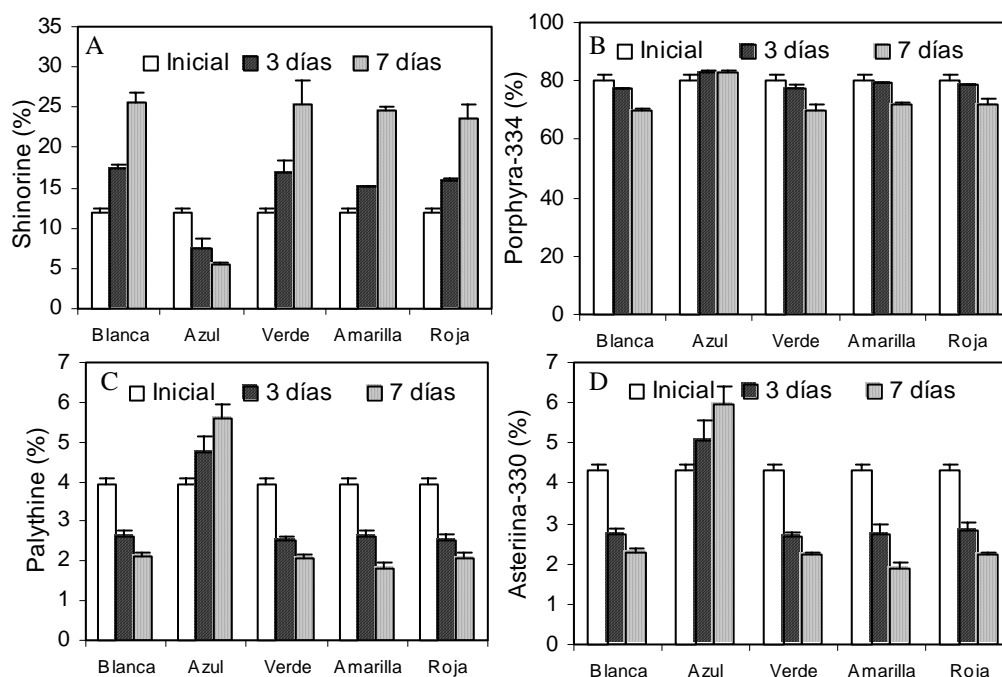


Figura IV.2.15. Proporciones relativas de shinorine (A), porphyra-334 (B), palythine (C) y asterina-330 (D) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de exposición a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja para *P. leucosticta*.

Correlaciones:

Tabla IV.2.1.A. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables indicadas en la exposición de *P. leucosticta* a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja. ** Correlación significativa $p < 0.01$, * Correlación significativa $p < 0.05$ (n=11).

	IBE	F_v/F_m	$TTE_{m\acute{a}x}$	PDTE	área	Cl <i>a</i>	FB	FE/FC	PtS
F_v/F_m	-0.729*								
$TTE_{m\acute{a}x}$	0.093	-0.583							
PDTE	0.630*	-0.354	0.206						
área	0.313	-0.263	0.527	0.814**					
Cl <i>a</i>	0.309	-0.142	0.345	0.715*	0.835**				
FB	-0.224	0.417	-0.059	0.369	0.486	0.174			
FE/FC	-0.304	0.524	-0.214	-0.055	0.103	0.510	-0.046		
PtS	-0.234	0.416	-0.194	0.275	0.355	0.018	0.966**	-0.116	
PEST	-0.545	0.700*	-0.622*	-0.719*	-0.710*	-0.429	-0.084	0.420	-0.010
C	0.271	0.041	0.260	0.643*	0.695*	0.801**	0.328	0.493	0.133
N	0.069	0.200	0.180	0.483	0.603*	0.881**	0.211	0.662*	0.019
A	0.217	-0.089	0.409	0.659*	0.838**	0.979**	0.207	0.562	0.032
MAAs	-0.231	0.471	0.083	0.208	0.517	0.688*	0.403	0.769**	0.264
SH	0.783*	-0.646*	0.402	0.919**	0.765**	0.620*	0.177	-0.251	0.101
PR	-0.664*	0.529	-0.425	-0.948**	-0.873**	-0.700*	-0.324	0.167	-0.236
PNE	-0.919**	0.782**	-0.315	-0.764**	-0.500	-0.455	0.140	0.337	0.194
AS	-0.916**	0.784**	-0.320	-0.766**	-0.501	-0.470	0.160	0.307	0.216

Tabla IV.2.1.B. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables indicadas en la exposición de *P. leucosticta* a las bandas de luz blanca, azul, verde, amarilla y roja. ** Correlación significativa $p < 0.01$, * Correlación significativa $p < 0.05$ (n=11).

	PEST	C	N	A	MAAs	SH	PR	PNE
C	-0.240							
N	-0.081	0.814**						
A	-0.423	0.843**	0.882**					
MAAs	0.189	0.761**	0.824**	0.740**				
SH	-0.848**	0.485	0.334	0.564	0.009			
PR	0.837**	-0.567	-0.417	-0.655*	-0.162	-0.977**		
PNE	0.763**	-0.306	-0.195	-0.374	0.224	-0.923**	0.824**	
AS	0.765**	-0.321	-0.206	-0.393	0.216	-0.922**	0.822**	0.999**

La IBE calculada para la fotosíntesis de *P. perforata* (Fork, 1963) se correlacionó positivamente con el contenido de shinorine y negativamente con el de porphyra-334, palythine y asterina-330. El área de los talos se correlacionó positivamente con la eficiencia fotosintética (pendiente de la curva TTE-E), con el contenido de clorofila *a*, C y N internos y con la absorbancia de los talos, la correlación fue negativa con respecto al contenido de proteínas estructurales. La absorbancia se correlacionó positivamente con la eficiencia fotosintética, con el crecimiento, y con el contenido interno de C, N y clorofila *a*. Globalmente se encontró una correlación positiva entre el contenido de MAAs y el de C, N, clorofila *a* y con la relación FE/FC. Y una correlación negativa con el rendimiento cuántico óptimo, al igual que shinorine, y contrariamente a palythine y asterina-330. El contenido en shinorine se correlacionó positivamente con la eficiencia fotosintética, con el contenido de clorofila *a* y con el área de los discos, al contrario que el resto de los MAAs. De modo que la correlación entre shinorine y los demás MAAs es negativa y entre porphyra-334, palythine y asterina-330 es positiva (tabla IV.2.1).

IV.3. Efecto de fuentes artificiales de RUV y PAR en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético a lo largo de una fase gametofítica de *P. leucosticta*.

IV.3.1. Diseño experimental:

A las plantas recolectadas entre los meses de diciembre de 2000 a abril de 2001 se las sometió a los mismos tratamientos una vez llegadas al laboratorio. En cada uno de estos meses se realizó el muestreo alrededor del día 20. En primer lugar se mantenían un día en cultivo a 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámpara Truelite) con un fotoperiodo de 12h luz:12h oscuridad, posteriormente se exponía los talos durante una semana a los tratamientos P, PA y PAB (empleando los filtros de Plexiglas®, ver material y métodos M.6). En este caso la lámpara empleada para la radiación PAR fue la Optimarc. Las irradiancias del cultivo fueron 460 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR, 9.6 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVA y 0.9 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVB, con un fotoperiodo de 12:12. La RUV se consiguió empleando 2 lámparas Q-Panel y 1 Philips TL40W/12. El medio en el que se mantuvo el cultivo fue agua de mar natural filtrada, la cual se enriqueció con medio Provasoli. El experimento se realizó en bandejas que se colocaron en el interior de otra de mayor tamaño, por la que circulaba agua a 7° C, de manera que la temperatura en los cultivos se mantenía en 15±1° C. Se calculó el rendimiento cuántico óptimo, la concentración de clorofila *a*, ficobiliproteínas, proteínas solubles y estructurales y MAAs al inicio y transcurrida una semana de experimentación (figura IV.3.1).

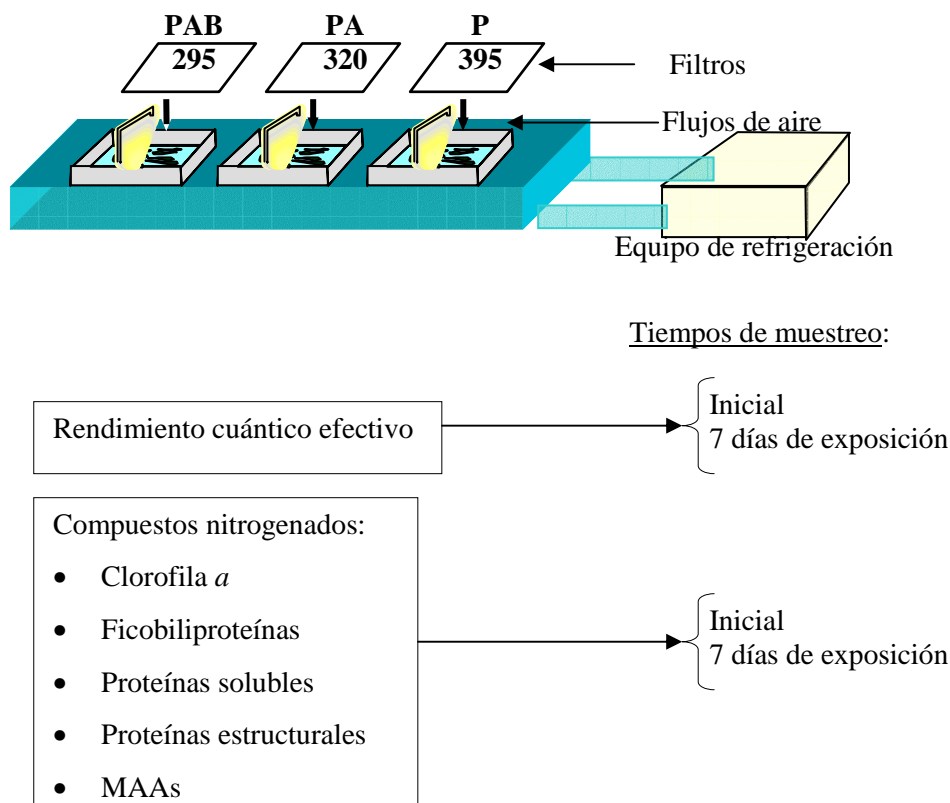


Figura IV.3.1. Esquema del diseño experimental para los talos de *P. leucosticta* expuestos a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001.

En el capítulo II se dedica un apartado a las dosis de radiación solar para los meses de experimentación (apartado II.4.1.1).

IV.3.2. Resultados:

Respuesta fotosintética:

Los rendimientos cuánticos óptimos de fluorescencia iniciales no variaron significativamente a lo largo de los meses en los que se repitió el experimento ($p > 0.05$), pero la respuesta ante cada uno de los tratamientos fue distinta a lo largo del ciclo de la fase gametofítica de *P. leucosticta*. Los valores iniciales del rendimiento cuántico óptimo fueron de 0.66 ± 0.04 (diciembre), 0.64 ± 0.03 (enero), 0.65 ± 0.02 (febrero), 0.62 ± 0.04 (marzo) y 0.66 ± 0.03 (abril).

En diciembre, enero y febrero se observó una pequeña caída significativa ($p < 0.05$) del F_v/F_m tras la exposición a los tres tratamientos P, PA y PAB ($p < 0.05$). Sin embargo, entre los tratamientos no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$). En marzo hubo una caída respecto al inicial en el tratamiento P (12%) y PA (25%) ($p < 0.05$), el valor del rendimiento en el tratamiento PAB no fue diferente significativamente al valor inicial ni al tratamiento P ($p > 0.05$), pero sí al tratamiento PA. Por último, en abril se produjeron caídas del F_v/F_m en los tres tratamientos, la mayor fue para PA (30%), seguido de PAB (20%) y por último el tratamiento en el que menos cayó el rendimiento cuántico óptimo fue P (12%) ($p < 0.05$) (figura IV.3.2).

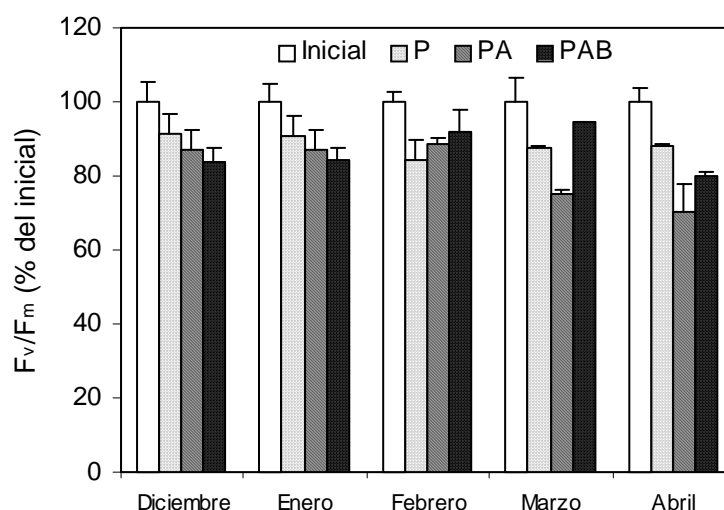


Figura IV.3.2. Porcentajes del rendimiento cuántico óptimo respecto al valor inicial tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

Contenido pigmentario (clorofila a y ficobiliproteínas):

En el mes de enero la concentración inicial de clorofila *a* fue superior que en el resto de los meses. Los tratamientos aplicados derivaron en respuestas diferentes según el mes de experimentación. En diciembre el tratamiento P incrementó la concentración inicial de clorofila *a* ($p < 0.05$). En los meses de enero, marzo y abril no se observaron diferencias significativas en el contenido de clorofila *a* entre los distintos tratamientos, ni respecto al valor inicial ($p > 0.05$). En febrero el tratamiento PA incrementó la concentración respecto al valor inicial ($p < 0.05$) (figura IV.3.3).

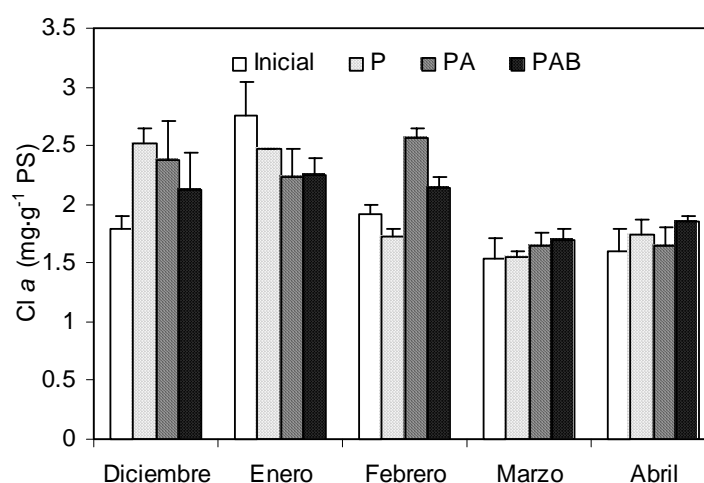


Figura IV.3.3. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

No se observaron diferencias significativas en el contenido inicial de ficoeritrina (FE) para los distintos meses de experimentación ($p > 0.05$) (figura IV.3.4.A). Sin embargo, el valor inicial de ficocianina (FC) fue significativamente inferior en el mes de abril respecto a diciembre, enero y febrero ($p < 0.05$) (figura IV.3.4.B). Calculando las ficobiliproteínas en su conjunto, se observó que en el mes de abril la concentración interna inicial fue significativamente inferior que en los meses de enero y febrero ($p < 0.05$) (figura IV.3.4.D). La relación inicial FE/FC también fue significativamente superior en abril que en los demás meses de muestreo ($p < 0.05$) (figura IV.3.4.C).

En los meses de enero, febrero y marzo no se observaron diferencias significativas después del periodo de experimentación en el contenido interno de ficoeritrina entre el valor inicial y los 3 tratamientos de luz aplicados ($p > 0.05$). En diciembre el tratamiento PA indujo una acumulación mayor significativamente que el tratamiento PAB y en el mes de abril todos los tratamientos derivaron en un contenido interno de ficoeritrina distinto significativamente entre

ellos y respecto al inicial ($p < 0.05$), de manera que el orden de mayor a menor concentración fue: inicial, P, PA y por último, PAB (figura IV.3.4.A).

La concentración de ficocianina en el mes de diciembre no fue diferente significativamente entre los tratamientos, ni tampoco respecto al inicial ($p > 0.05$). En enero el contenido inicial de FC fue superior significativamente que el del tratamiento P y PAB después de la semana de cultivo, y en el tratamiento PA se observó una concentración superior que en PAB ($p < 0.05$). En febrero el contenido interno de FC en los tres tratamientos lumínicos fueron inferiores significativamente respecto al inicial ($p < 0.05$). En marzo el contenido de FC fue inferior significativamente en los tratamientos P y PAB que el inicial y en abril la acumulación de FC tras el periodo de experimentación en el tratamiento P fue superior significativamente que en los tratamientos PA y PAB ($p < 0.05$) (figura IV.3.4.B).

La concentración de ficobiliproteínas no varió significativamente entre tratamientos ni respecto al inicial en los meses de diciembre y febrero ($p > 0.05$). En enero la concentración cayó significativamente en todos los tratamientos por igual, respecto al inicial ($p < 0.05$). En marzo el contenido interno de ficobiliproteínas fue inferior significativamente en los tratamientos P y PAB que el inicial ($p < 0.05$). Y en abril el contenido interno en el tratamiento P después de la semana de experimentación se mantuvo respecto al inicial ($p > 0.05$), sin embargo, el contenido en los tratamientos PA y PAB fue significativamente inferior que en P y el valor inicial ($p < 0.05$) (figura IV.3.4.D).

En la relación FE/FC no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ni respecto al inicial en los meses de enero y marzo ($p > 0.05$). En diciembre el valor de esta relación en el tratamiento PA fue superior significativamente que en el inicial ($p < 0.05$). En febrero tras la semana de cultivo el valor fue superior significativamente en los tratamientos P y PAB respecto al inicial ($p < 0.05$). Y en el mes de abril la relación cayó en todos los tratamientos por igual respecto al valor inicial ($p < 0.05$) (figura IV.3.4.C).

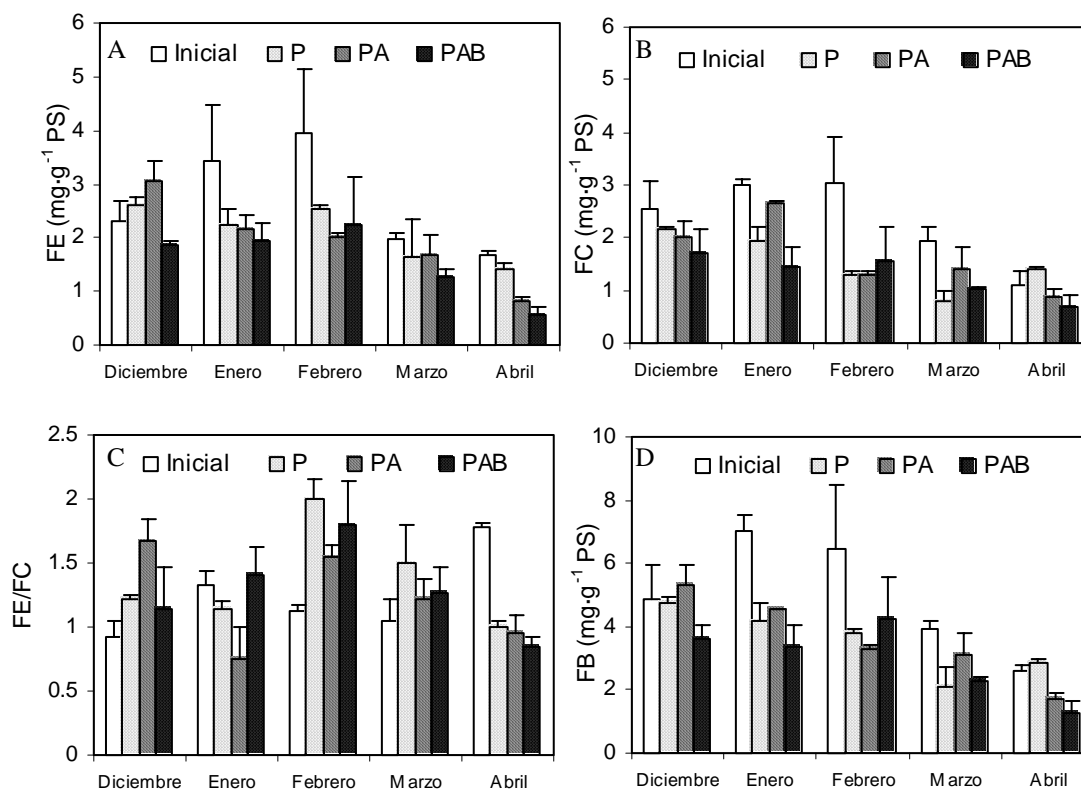


Figura IV.3.4. Concentración de FE (A), FC (B), relación FE/FC (C) y FB (D) al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

Acumulación de proteínas solubles y estructurales:

La concentración inicial de proteínas solubles fue significativamente inferior en los meses de marzo y abril respecto a los demás meses de experimentación ($p < 0.05$). Tras el periodo de cultivo no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ni respecto al inicial en los meses de diciembre y marzo ($p > 0.05$). En enero el tratamiento PA indujo una concentración superior que el tratamiento P ($p < 0.05$). En febrero tras la aplicación del tratamiento PA el contenido interno de proteínas solubles fue inferior que en el tratamiento PAB y también respecto al valor inicial, y en el tratamiento PAB se observó una concentración superior significativamente que en el tratamiento P ($p < 0.05$). En abril los tratamientos PA y PAB derivaron en una concentración inferior de proteínas solubles respecto al P y al inicial, en PA la concentración fue menor aún que en PAB ($p < 0.05$) (figura IV.3.5).

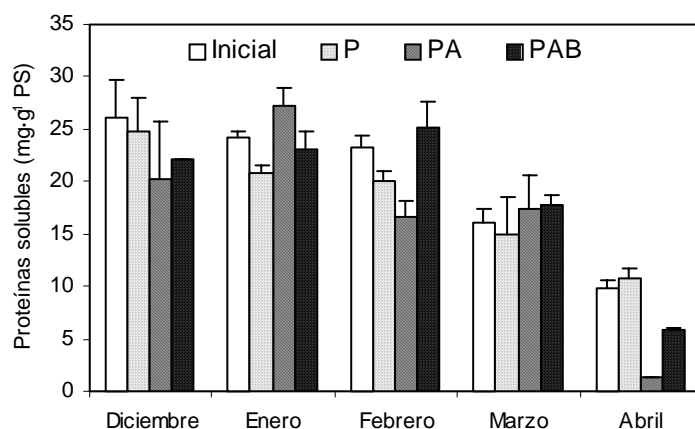


Figura IV.3.5. Concentración de proteínas solubles al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

La concentración inicial de proteínas estructurales no varió significativamente a lo largo del periodo de experimentación ($p > 0.05$). Tampoco varió después de la semana de cultivo en los meses de diciembre, febrero y marzo ($p > 0.05$). En enero la concentración de proteínas estructurales cayó significativamente en los tratamientos P y PA respecto al inicial y al tratamiento PAB, y en abril después del periodo de cultivo a los tres tratamientos lumínicos la concentración en el tratamiento P fue superior que en el tratamiento PAB ($p < 0.05$) (figura IV.3.6).

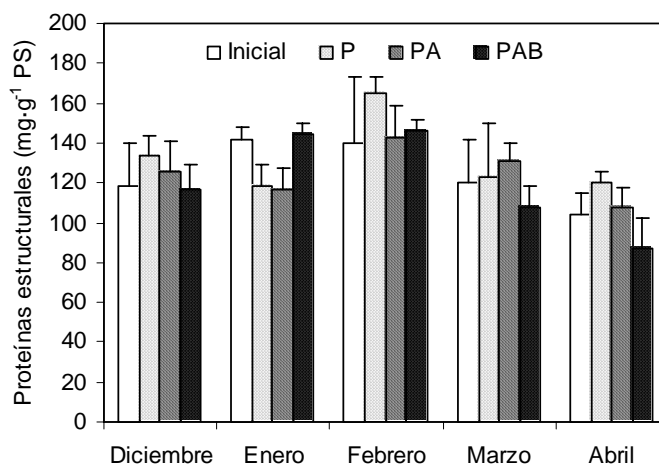


Figura IV.3.6. Concentración de proteínas estructurales al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

Relación FB/PtS:

La relación inicial de FB/PtS fue la misma en los distintos meses de experimentación ($p > 0.05$). En diciembre tras la semana de cultivo en los tratamientos P y PAB la relación FB/PtS fue inferior significativamente que el valor inicial y que en el tratamiento PA ($p < 0.05$). En enero

el inicial fue superior que en todos los demás tratamientos ($p < 0.05$). En febrero la relación fue inferior en el tratamiento PAB. En marzo el valor inicial fue significativamente superior que tras la aplicación de los tratamientos P y PAB ($p < 0.05$). En abril no se detectaron diferencias significativas entre el inicial y los tratamientos P y PAB ($p > 0.05$), sin embargo, en PA el valor de la relación fue muy superior, de 1.22 ± 0.14 (no se muestra en la figura) (figura IV.3.7).

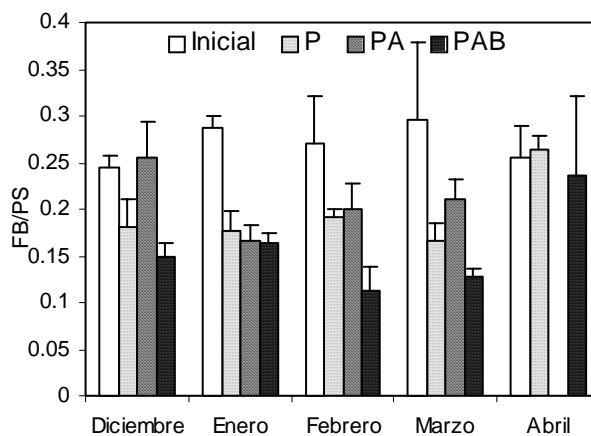


Figura IV.3.7. Relación FB/PS al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

El coeficiente de determinación para la regresión lineal entre FB y PtS fue de 0.583 ($n=60$; $p < 0.01$). La ecuación para la relación fue: $FB = 0.146 \cdot PtS + 1.1$.

Carbono y nitrógeno total. Relación C/N:

En los talos de *P. leucosticta* el contenido inicial de carbono y nitrógeno fue significativamente inferior en diciembre que en febrero ($p < 0.05$). Además el contenido inicial de nitrógeno en abril fue inferior que en los demás meses excepto diciembre, y en enero superior a los demás meses excepto febrero ($p < 0.05$). La relación C/N inicial fue superior en abril y en enero fue inferior que en los demás meses excepto febrero ($p < 0.05$) (figura IV.3.8.A,B,C).

En el mes de diciembre el contenido interno de carbono fue inferior significativamente al iniciar el experimento que tras una semana de exposición a los tratamientos P y PAB. El contenido de nitrógeno en el inicial fue superior que tras la exposición a PA y PAB. Y la relación C/N fue inferior al iniciar el experimento que tras la semana de exposición a los tres tratamientos lumínicos ($p < 0.05$) (figura IV.3.8.A,B,C).

En el mes de enero el contenido inicial de carbono en PAB fue inferior al contenido en PA. El nitrógeno fue superior significativamente al iniciar el experimento que tras la exposición a

PAB, y éste que la exposición a P y PA. La misma relación que para el nitrógeno pero en sentido inverso se observó para la relación C/N, el inicial inferior que PAB y este inferior que P y PA ($p < 0.05$) (figura IV.3.8.A,B,C).

En el mes de febrero el contenido inicial de carbono fue significativamente inferior que éste tras la semana de exposición en PAB, y el contenido de nitrógeno inicial superior que éste tras la semana de exposición a los tres tratamientos lumínicos. La relación C/N fue inferior en el inicial que en el resto ($p < 0.05$) (figura IV.3.11.A,B,C).

En el mes de marzo el contenido inicial de carbono fue inferior que el del tratamiento P y el contenido inicial de nitrógeno superior que tras los tres tratamientos. La relación C/N fue inferior al iniciar el experimento que tras los tratamientos P y PA ($p < 0.05$) (figura IV.3.11.A,B,C).

En el mes de abril el contenido de carbono fue significativamente inferior en P, seguido de PAB y por último PA, que no se diferenció del inicial. El contenido inicial de nitrógeno fue superior significativamente que en el tratamiento P ($p < 0.05$). Y en la relación C/N no se detectaron diferencias significativas entre el inicial y los tratamientos lumínicos ($p > 0.05$) (figura IV.3.11.A,B,C).

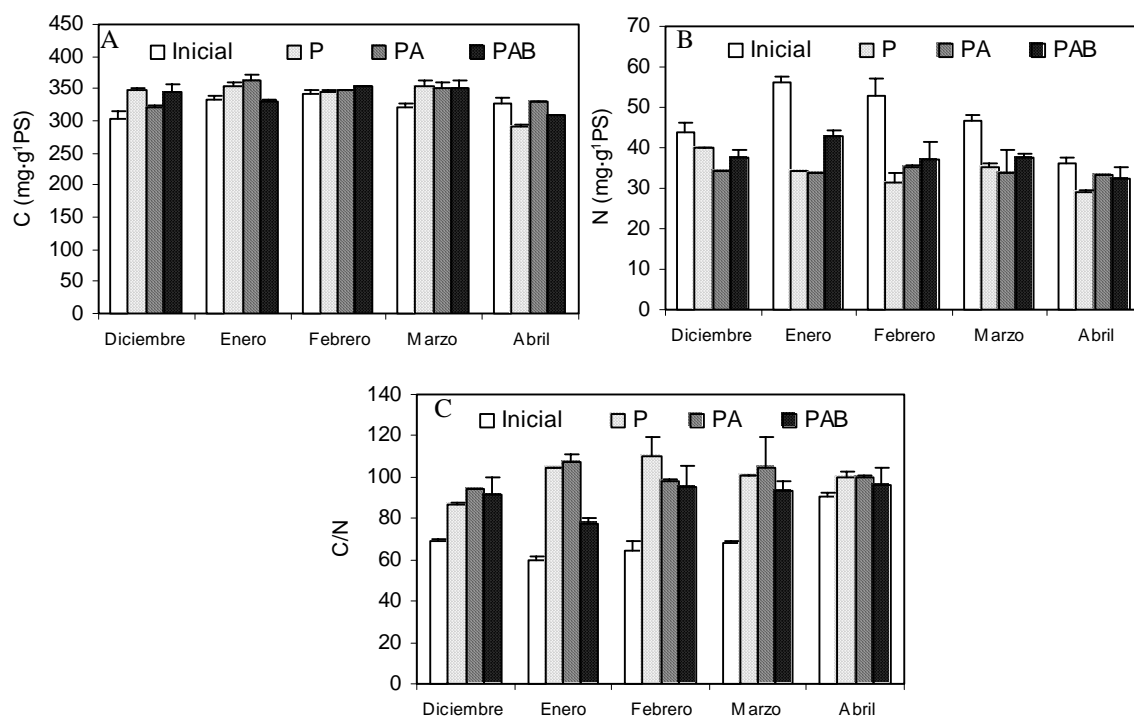


Figura IV.3.8. Contenido interno de carbono (A), nitrógeno (B) y la relación C/N (C) al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

Contenido de MAAs:

El contenido inicial de MAAs fue el mismo en los distintos meses de experimentación ($p > 0.05$). En los meses de diciembre, enero, febrero y marzo el contenido de MAAs no varió entre tratamientos ni respecto al valor inicial ($p > 0.05$). En abril la concentración de MAAs fue inferior significativamente en los tratamientos PA y PAB ($p < 0.05$) (figura IV.3.9).

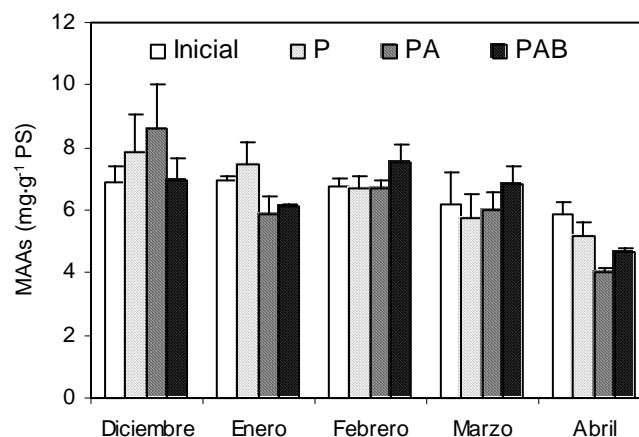


Figura IV.3.9. Concentración de MAAs al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

En el contenido total de MAAs no se mantuvieron constantes las proporciones relativas entre los tipos. La proporción inicial de shinorine fue significativamente superior en marzo que en los meses de diciembre y abril. La proporción inicial de porphyra-334 fue significativamente inferior en marzo que en el resto de los meses, y además en enero y en febrero fue superior que en diciembre. La proporción de palythine fue superior en diciembre y en marzo y en febrero la proporción fue la menor. La proporción de asterina-330 fue significativamente superior en los meses de diciembre y marzo que en enero ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.A-D).

En el mes de diciembre se incrementó la proporción de shinorine respecto al valor inicial en todos los tratamientos, después de los 7 días de cultivo la proporción fue significativamente inferior en PA que en los otros dos tratamientos lumínicos ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.A). Sin embargo, el porcentaje de porphyra-334 después de la semana de cultivo fue menor que en el valor inicial ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.B). Las proporciones relativa de palythine y asterina-330 se incrementaron significativamente en el tratamiento PA respecto al valor inicial ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.C,D).

En el mes de enero la proporción de shinorine se incrementó con respecto al inicial en los tratamientos P y PAB ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.A). Sin embargo, el porcentaje de porphyra-334 cayó significativamente en todos los tratamientos después del cultivo, igual que ocurría en el

mes de diciembre (figura IV.3.10.B). Las proporciones de palythine y asterina-330 se incrementaron en todos los tratamientos lumínicos con respecto al inicial, en mayor medida en el tratamiento PA ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.C,D).

En el mes de febrero la proporción de shinorine se incrementó significativamente respecto al inicial en el tratamiento PAB (figura IV.3.10.A). La proporción de porphyra-334 cayó en todos los tratamientos respecto al inicial y además la proporción en el tratamiento P fue significativamente superior que en PA y PAB ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.B). La proporción de palythine no varió significativamente entre tratamientos ($p > 0.05$) (figura IV.3.10.C). Para asterina-330 se produjo una caída significativa de la proporción en PAB respecto al tratamiento PA ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.D).

En el mes de marzo no se detectaron diferencias significativas en las proporciones para ninguno de los tipos de MAAs ($p > 0.05$). Y en abril la proporción de shinorine cayó significativamente en el tratamiento PA y se incrementó en P (figura IV.3.10.A). La proporción de porphyra-334 cayó significativamente respecto al inicial en el tratamiento P ($p < 0.05$) (figura IV.3.10.B). Para palythine y asterina-330 no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos para el mes de abril ($p > 0.05$) (figura IV.3.10.C,D).

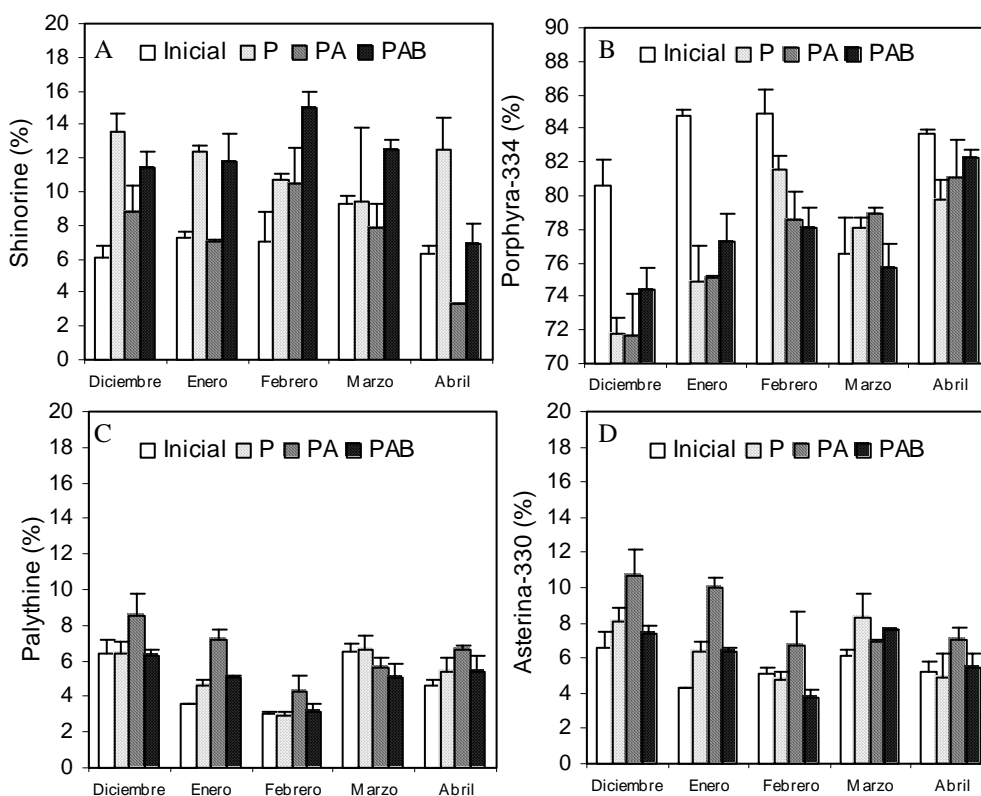


Figura IV.3.10. Proporción relativa de los MAAs, shinorine (A), porphyra-334 (B), palythine (C) y asterina-330 (D), al iniciar el experimento y tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.

Correlaciones:

Tabla IV.3.1. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables indicadas, tras la semana de exposición a los tratamientos lumínicos P, PA y PAB, a lo largo de los meses desde diciembre 2000 a abril 2001 para *P. leucosticta*.** Correlación significativa $p < 0.01$, * Correlación significativa $p < 0.05$ (n=20).

	PAR	UVA	UVB	F _v /F _m	Cl a	FB	PtS
UVA	0.990**						
UVB	0.971**	0.995**					
F _v /F _m	-0.220	-0.241	-0.254				
Cl a	-0.560*	-0.630**	-0.663**	0.204			
FB	-0.675**	-0.712**	-0.727**	0.578**	0.586**		
PtS	-0.889**	-0.910**	-0.914**	0.413	0.534	0.757**	
PEST	-0.698**	-0.668**	-0.635**	0.101	0.355	0.528*	0.556*
C	-0.565**	-0.517*	-0.471*	-0.217	0.256	0.103	0.393
N	-0.413	-0.412	-0.403	0.592**	0.272	0.698**	0.453*
MAAs	-0.749**	-0.769**	-0.785**	0.446*	0.572**	0.670**	0.752**
SH	-0.379	-0.362	-0.348	0.085	0.297	0.023	0.388
PR	0.327	0.353	0.378	0.221	-0.299	0.021	-0.319
PNE	0.198	0.151	0.102	-0.295	-0.094	-0.185	-0.121
AS	-0.153	-0.180	-0.208	-0.319	0.117	-0.048	0.122

	PEST	C	N	MAAs	SH	PR	PNE
C	0.336						
N	0.276	-0.024					
MAAs	0.462*	0.314	0.289				
SH	0.380	0.277	-0.157	0.501*			
PR	0.052	-0.306	0.313	-0.482*	-0.528*		
PNE	-0.507*	-0.192	-0.274	-0.047	-0.235	-0.614**	
AS	-0.261	0.243	-0.276	0.189	-0.122	-0.712**	0.835**

La dosis de radiación mensual recibida se correlacionó negativamente con el contenido de proteínas (FB, proteínas solubles y estructurales) y también con el contenido interno de C y de MAAs. La correlación fue positiva entre el contenido de nitrógeno y el rendimiento cuántico óptimo. El contenido interno de MAAs se correlacionó positivamente con el contenido pigmentario, de proteínas y de shinorine, y negativamente con el contenido de porphyra-334. Entre los diferentes tipos de MAAs, de nuevo se repite la correlación negativa entre shinorine y porphyra-334, positiva entre palythine y asterina-330 y también negativa entre porphyra-334 y palythine y asterina-330 (tabla IV.3.1).

IV.4. Discusión.

IV.4.1. Irradiancias PAR.

Hay estudios en los que se asocia un incremento del contenido interno de MAAs con incrementos en la irradiancia PAR del cultivo, en el dinoflagelado *Alexandrium excavatum* (Carreto *et al.*, 1990a), en diatomeas céntricas (Riegger y Robinson, 1997) y en *Phaeocystis antarctica* (Prymnesiofita) (Newman *et al.*, 2000). En macroalgas también se observó un incremento de MAAs a medida que las dosis de radiación PAR recibidas eran superiores, concretamente en *Bostrychia moritziana* y *Caloglossa leprieunii* (Karsten *et al.*, 2000) y en *Chondrus crispus* (Karsten *et al.*, 1998a; Franklin *et al.*, 1999). Aunque hay otros autores que afirmaron que el cultivo con PAR, sin RUV, en el dinoflagelado *Symbiodinium microadriaticum* no derivó en una variación del contenido de MAAs (Banaszak y Trench, 1995). Los resultados obtenidos en este capítulo mostraron una disminución en la concentración de MAAs tras una semana de cultivo en luz continua en distintas irradiancias PAR, se podría suponer que el crecimiento de los talos estaría diluyendo el contenido inicial de MAAs y de ahí la caída en la concentración total. Sin embargo, en el tratamiento de menor irradiancia ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) el contenido de MAAs no varió respecto al valor inicial después del periodo de experimentación, se podría explicar teniendo en cuenta que la energía disponible para los talos en este tratamiento es muy pequeña (IBE para la fotosíntesis (Fork, 1963) $7 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), de manera que el crecimiento estaría en un segundo plano respecto al mantenimiento de un metabolismo basal y la supervivencia.

Puesto que para la máxima radiación a la que se sometió la planta ($300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) procedente de la lámpara de halogenuros Optimarc, la disminución del contenido interno de MAAs después de la semana de cultivo fue inferior que para la máxima radiación procedente de las lámparas Osram ($135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), se podría pensar que la acumulación de MAAs difería en función de la fuente de iluminación, además se produjo una caída de la proporción relativa de porphyrina-334 en el primero de los casos, y un incremento de shinorine en el segundo. Hay autores que sugirieron que la calidad espectral de la luz de incubación influía en la acumulación de MAAs (Carreto *et al.*, 1990a; Franklin *et al.*, 2001). Las diferencias fundamentales en la calidad lumínica de las lámparas Optimarc y Osram son la mayor emisión de luz roja y roja lejana, y la menor emisión de azul y amarilla en la primera de ellas. Además la relación Rojo/Rojo lejano también difirió en ambas lámparas, mientras que la Optimarc se caracterizó por una relación de 1.1, el valor para la Osram fue de 3.6, en esta última lámpara, la cantidad de rojo lejano era muy pequeña. La relación Rojo/Rojo lejano para la lámpara de halogenuros es similar a la que se puede encontrar en la superficie del mar y la de la lámpara Osram es más característico de profundidades de unos 2 metros (Figuerola, 1996). Sin embargo, a irradiancias

intermedias ($70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) no se reflejó el efecto de la calidad lumínica de las lámparas empleadas en el cultivo. En estas irradiancias intermedias y también cuando los talos se incubaban a $135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la proporción relativa de shinorine respecto al total de MAAs tras el cultivo fue superior que en el valor inicial. Además la concentración de MAAs y el contenido de shinorine se correlacionaron negativamente, de manera que quizá además de estar diluyéndose el contenido de MAAs debido al crecimiento de los talos, se estaría sintetizando y acumulando preferentemente shinorine. La menor caída del contenido interno de MAAs en el tratamiento de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ emitidos por la lámpara Optimarc, se podría explicar no tanto por las diferencias en las calidades lumínicas de las lámparas de incubación, sino porque a estas altas irradiancias de PAR los talos tendrían una tasa relativa de crecimiento menor (Aguilera, 1997) y por ello, la dilución del contenido de MAAs también sería inferior.

Debido a que en el tratamiento de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ se produjo una caída en el contenido de porphyra-334, mientras que no se observó el incremento de shinorine que se observaba en los demás tratamientos, y sí un incremento en palythine y asterina-330. Se podría pensar, según las conclusiones extraídas en capítulos anteriores, que a esta elevada irradiancia el efecto de la dilución en la acumulación de MAAs fuese ínfimo, y que por el contrario, se podría relacionar la caída del contenido total de MAAs con la conversión de shinorine y/o porphyra-334 en gadusol, que supondría un mecanismo adicional de fotoprotección por acumulación de sustancias antioxidantes. De hecho se encontró una correlación negativa entre el contenido de porphyra-334 y asterina-330, y positiva para asterina-330 y palythine, al igual que para estos dos últimos MAAs y la irradiancia del cultivo. Es probable que las altas irradiancias de PAR produzcan el mismo efecto que la RUV y bajo estas circunstancias se concluyó en el capítulo II que los talos acumulan preferentemente palythine y asterina-330, frente a shinorine y porphyra-334. Pero, con este nuevo resultado también se podría sugerir que quizá la señal lumínica que deriva en este comportamiento sea la incubación en altas irradiancias de PAR, más que las altas irradiancias de RUV.

Aún manteniendo una alta concentración de MAAs tras la semana de cultivo en el tratamiento lumínico de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, se produjo una caída en la actividad fotosintética de *P. leucosticta*, además esta caída se correlacionó negativamente con el porcentaje de palythine y asterina-330. A pesar de ello, la caída de la tasa fotosintética fue inferior que en el experimento realizado a corto plazo con esta misma especie, se podría relacionar con una menor capacidad de aclimatación de los talos empleados en ese experimento, puesto que su fase macroscópica se encontraban muy próxima a desaparecer. Parece que los MAAs no estaban protegiendo totalmente a los talos de una irradiancia PAR elevada, este resultado podría asociarse a que las moléculas de MAAs presentes en *P. leucosticta* absorben en el rango de 320 a 334 nm y no por

encima de 400 nm. La caída de la actividad fotosintética tampoco se correlacionó con el contenido pigmentario, puesto que sí cayó la concentración de clorofila *a* en el tratamiento de mayor irradiancia PAR, al igual que ocurría con el rendimiento cuántico óptimo; sin embargo, en el tratamiento de $135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ también se produjo una caída de la concentración de clorofila y no se observó ningún cambio en el rendimiento. Se puede sugerir que la caída de la concentración de clorofila *a* en el tratamiento de $135 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pudiera estar relacionada con un mayor crecimiento del talo y, por lo tanto, con una dilución del contenido interno de este pigmento, además de a una aclimatación a altas irradiancias PAR que conduciría a la disminución del contenido pigmentario. En el tratamiento de $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, al producirse un menor crecimiento del talo (Aguilera, 1997), tal y como se apuntó anteriormente, se podría atribuir la caída en el contenido de clorofila *a*, además de a la aclimatación a altas irradiancias, al efecto negativo de esas elevadas irradiancias PAR en la molécula durante el periodo de 7 días en luz continua (Rüdiger y López-Figueroa, 1992). De hecho en el experimento a corto plazo no se observó caída alguna de la concentración de clorofila, que era un 47% superior en su valor inicial respecto a este experimento, a pesar de que la irradiancia con la que se incubaron los talos en el tratamiento AP fue superior. El contenido de FC cayó en todos los tratamientos por igual tras el periodo de experimentación, y el de FE también disminuyó excepto en el tratamiento de $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (lámparas Osram), al igual que ocurría con las proteínas solubles.

Se observó que *P. leucosticta* acumulaba preferentemente clorofila *a* frente a ficobiliproteínas cuando la energía que se le estaba suministrando a los talos era baja, muy probablemente para mantener la actividad fotosintética. Se conoce que la proteólisis de las ficobiliproteínas provee a las células de los aminoácidos y microelementos necesarios para la supervivencia de las mismas (Aráoz y Häder, 1997).

IV.4.2. Calidad lumínica.

Además del efecto de la irradiancia, la calidad de luz con la que se iluminaba el cultivo de *P. leucosticta* influía en la actividad fotosintética de la planta, en el contenido pigmentario, proteínico y también en los MAAs. Se ha descrito que las luces roja y verde modulan la síntesis pigmentaria, mientras que la luz azul influencia los procesos metabólicos, como la respiración, la degradación de carbohidratos y la síntesis pigmentaria (Tsekos *et al.*, 2002).

Después de 7 días cultivando los talos a iguales irradiancias, se observó que la luz roja condujo a un mayor valor de la tasa de transporte electrónico máxima, de la pendiente inicial de la curva TTE-E, además la tasa relativa de crecimiento también fue superior en luz roja que en azul. En esta misma especie, Figueroa y colaboradores (1995a), también observaron una mayor tasa y eficiencia fotosintética (cuando la fotosíntesis se expresa en términos de contenido total

de pigmentos) y un mayor crecimiento en luz roja después de incubarse en un medio rico en nitrógeno y en esas dos calidades lumínicas (Figuroa *et al.*, 1995a). A partir del espectro de acción para la fotosíntesis de *P. perforata* (Fork, 1963) se calculó la IBE para cada una de los tratamientos lumínicos (figura IV.2.1.B), se observa que para la luz azul es de $14 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, muy inferior al resto de las calidades de luz. El menor valor de fotosíntesis en la región del azul probablemente se deba a una baja eficiencia en la transferencia de la energía por parte de los carotenoides, que absorben esas longitudes de onda, a la clorofila. La disminución de la tasa de fotosíntesis en el rojo se produce a partir de 650 nm (Fork, 1963), sin embargo, el filtro empleado en el cultivo abarcó también la banda desde 600 nm, capaz de ser absorbida por la ficocianina, por lo tanto, la luz roja empleada podría excitar ambos fotosistemas. Aguilera y colaboradores (2000) observaron que el rendimiento cuántico óptimo no se veía influenciado por los tratamientos lumínicos (azul, rojo y blanco). Estos autores atribuyeron el alto valor de F_v/F_m en los talos adaptados a luz azul, además de que posiblemente existiese un pequeño solapamiento entre el PSII y el PSI en esta calidad lumínica (Figuroa *et al.*, 1995a), que provocaría una baja eficiencia para la hidrólisis del agua, también estaría indicando que la demanda de electrones permanece alta en luz azul, como la asimilación de carbono era baja, la demanda vendría de la asimilación de nitrógeno inorgánico (Aguilera *et al.*, 2000). Aunque cabe destacar, que al emplearse como fuente de nitrógeno inorgánico amonio, la demanda electrónica es inferior que si el medio se supliera de otros compuestos inorgánicos de nitrógeno no reducidos.

El precultivo durante una semana de los talos de *P. leucosticta* en un medio de cultivo sin nitrógeno inorgánico, permitió que al añadir amonio se produjese una elevada asimilación del mismo, reflejándose en un incremento del contenido interno de nitrógeno y de los componentes nitrogenados, que no se había observado en anteriores experimentos en los que los talos no se precultivaron en condiciones de limitación de nitrógeno inorgánico.

El contenido interno de clorofila *a* fue el mismo tras la incubación de los talos de *P. leucosticta* en luz azul y roja, Figuroa y colaboradores (1995b) tampoco observaron diferencias en esta misma especie incluso después de dos semanas de cultivo. Aunque tras 4 semanas el contenido de clorofila *a* fue superior en luz azul que en luz roja (Figuroa *et al.*, 1995a). A pesar de que la concentración de ficoeritrina era superior en luz azul que en roja, al igual que en los artículos citados anteriormente, la de ficocianina no estaba tan influenciada por estas calidades lumínicas, mientras que en los artículos anteriores se observó que el incremento de FE fue superior que el de FC en luz azul respecto al valor inicial después de las cuatro semanas de cultivo (Figuroa *et al.*, 1995a,b). Aunque en ambos casos se observó una mayor relación FE/FC en luz azul que en roja. En este sentido, se puede sugerir que el mayor porcentaje de luz

azul que presentaba la lámpara Osram respecto a la Optimarc en la incubación de *P. leucosticta* durante una semana en luz continua a $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (experimento IV.1), podría explicar la ausencia de caídas en el contenido de FE. En periodos de 24 horas la luz roja inducía la disminución de pigmentos en la cianobacteria *Anabaena* sp., mientras que la luz azul, verde y amarilla los incrementaba (Sinha *et al.*, 1998). Después de 4 semanas de cultivo en luz azul se encontraron un gran número de ficobilisomas bien formados en *P. leucosticta* localizados en gran número en las lamelas tilacoidales que cruzan el pirenoide, mientras que en luz roja, y especialmente en verde no se encontraron ficobilisomas bien formados (Tsekos *et al.*, 2002). Sin embargo, en los resultados presentados en este capítulo no se refleja el efecto negativo de la luz roja en la acumulación pigmentaria, y además la inducción de la clorofila fue dos veces superior que la de las ficobiliproteínas en todas las calidades de luz, a pesar de que otros autores determinaron que la inducción del contenido de ficobiliproteínas era dos veces superior que el de clorofila en luz azul (López-Figueroa y Niell, 1990). En cualquier caso, la disposición de los ficobilisomas en luz azul podría explicar la alta eficiencia en la canalización de la energía hacia el centro de reacción, que se refleja en un mayor rendimiento cuántico óptimo de fluorescencia. Se sugiere, por lo tanto, un desacoplamiento entre la captación de luz y la asimilación de C en luz azul, que se refleja en el mayor rendimiento cuántico óptimo y en la menor TTE en luz azul. Carmona (1999) sugirió este mismo proceso de desacoplamiento en *Gracilaria tenuistipitata* para explicar el menor crecimiento y el comportamiento fotosintético en esta calidad lumínica.

La aclimatación a bajas irradiancias se ha descrito en términos de una rápida acumulación de FE en relación a clorofila *a* (Algarra *et al.*, 1991), concretamente en *P. leucosticta* las relaciones FE/FC y FE/Cl *a* fueron superiores en luz azul que en roja. Sin embargo, no se encontró que la relación FE/Cl *a* fuese mucho mayor en verde que en azul y rojo, ni que FC/Cl *a* fuese mucho menor en azul que en verde y rojo, tal y como indicaron López-Figueroa y Niell (1991). La mayor acumulación de FE en luz azul frente a la luz roja, podría estar compensando relativamente la baja capacidad fotosintética en esta banda (Lüning y Dring, 1985). Después del cultivo, *P. leucosticta* presentó una mayor concentración de proteínas solubles y estructurales en luz azul, que al igual que para FE podría explicar la ausencia de caídas de proteínas solubles en $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (experimento IV.1). El resultado para proteínas solubles coincide con el encontrado por Figueroa y colaboradores (1995b), sin embargo, ellos encontraron un resultado opuesto para proteínas estructurales.

En luz roja los talos dirigen la mayoría de la energía producida en la fotosíntesis hacia crear nueva biomasa, por lo tanto, el crecimiento es mayor en esa banda. Debido a que la eficiencia tanto fotosintética como en la inversión para el carbono es alta se minimiza la demanda para la síntesis de nuevos componentes fotosintéticos. En otras algas rojas, como *P. palmata* (Lüning,

1992), *Gracilaria* sp. (Beer y Levy, 1983) y *G. sesquipedale* (Carmona, 1999) se determinaron similares tasas de crecimiento en luz roja y azul. Sin embargo, en *P. leucosticta* cultivada en luz azul la energía producida por la fotosíntesis no se usa en el crecimiento de los talos, sino en mantener unos niveles altos de proteínas, incluidas ficobiliproteínas. También en *Gracilaria tenuistipitata* se observó un menor crecimiento en luz azul (Carmona, 1999). Se ha descrito que en luz azul se produce un desacoplamiento entre el metabolismo de C y N, probablemente la luz azul afectase al metabolismo de lípidos en las células de *Porphyra* de igual modo que la oscuridad lo hace en las plantas vasculares (Tsekos *et al.*, 2002).

La absorción se incrementó a medida que avanzaba el periodo de experimentación y sólo se observó un valor ligeramente superior en luz blanca respecto a la luz roja. No se observó una mayor absorción en azul que en roja, tal y como determinaron en *P. leucosticta* tras un periodo de 14 días de experimentación (Aguilera *et al.*, 2000). A pesar de ello, otros autores han determinado que existe una baja eficiencia de la captación de luz en luz azul debido a un mayor empaquetamiento pigmentario (Figueroa *et al.*, 1995a). Efectivamente en un trabajo reciente se ha descrito que los cambios que se producen a nivel del área protoplasmática, en el espaciado de los tilacoides, en los cambios en la estructura, forma y tamaño de los ficobilisomas y en la acumulación de plastoglobulinas, muestran que la luz monocromática (azul, roja y verde) provoca cambios pronunciados en el efecto de empaquetamiento y consecuentemente en la eficiencia de la absorción de luz (Tsekos *et al.*, 2002).

En un medio rico en nitrógeno el contenido de C y N por disco de *P. leucosticta* se incrementaba en luz roja debido a la gran expansión del disco en esa calidad de luz (Figueroa *et al.*, 1995b). En nuestro trabajo, en el que también se suplió el cultivo con grandes cantidades de nitrógeno inorgánico (amonio), no se encontraron diferencias en el contenido de carbono entre las luces roja y azul (normalizado a peso seco) y sí en luz blanca, en la que se incrementó. Además también se observó un mayor contenido de C por disco en luz roja que en luz azul (datos no mostrados). El contenido de nitrógeno fue inferior tras el cultivo en luz roja que en blanca, azul o verde. Los contenidos iniciales de C y N para el mes de estudio fueron superiores que aquellos encontrados en *P. leucosticta*, sobre todo en términos de nitrógeno (Hernández *et al.*, 1993b). La relación C/N caía en todos los tratamientos por la acumulación de nitrógeno, esto también ocurrió en luz roja en una primera fase en la que el crecimiento de los discos aún no era tan patente (primeros 3 días), sin embargo, tras los 7 días de cultivo, la acumulación de nitrógeno no disminuyó y, por lo tanto, el ratio C/N se incrementaba.

Parece ser que la estimulación del metabolismo de N en luz azul estaba controlada en *P. leucosticta* por un fotorreceptor azul, al igual que sugirieron para *C. elongata* (López-Figueroa, 1993) y en cianobacterias (Kumar *et al.*, 1986), aunque no se producía la expansión del talo

debido a la baja eficiencia fotosintética (Figueroa *et al.*, 1995b). La captura de nitrato era superior en luz roja que en azul probablemente por la mayor superficie/volumen de las células en el primero de los casos (Figueroa *et al.*, 1995a). En microalgas verdes se ha descrito que la luz azul incrementaba el contenido de proteínas y que la luz roja el de carbohidratos (Kowallik, 1987). Se observó la activación por luz azul de la nitrato reductasa y el incremento de la captura de nitrato y la formación de amonio en el alga verde *Chlorella kessleri* (Kamiya, 1997). Debido a que se observa un incremento en el espesor de la pared celular y una pequeña área protoplasmática en luz roja (Tsekos *et al.*, 2002), se propone que el C se acumularía en dicha pared en forma de polisacáridos, aunque también podría acumularse como floridósidos que han sido descritos como importantes productos de reserva en este género (Karsten *et al.*, 1993).

La acumulación de MAAs se vio favorecida en luz blanca y en luz azul, teniendo en cuenta que los MAAs son compuestos nitrogenados, se comportan del mismo modo que otros de ellos, aunque tal y como se apuntó anteriormente, tras la incubación durante una semana en luz continua (experimento IV.1) no se observó la influencia de un mayor porcentaje de luz azul en las lámparas Osram en la acumulación de MAAs, como ocurría para FE y proteínas solubles. A pesar de que tanto en luz blanca como en azul se observe un incremento de MAAs, las proporciones relativas entre los distintos tipos fueron diferentes. La luz azul favorecía la acumulación de palythine y asterina-330, mientras que shinorine estaba menos presente y porphyrina-334 se mantenía invariante, sin embargo, el resto de calidades incluida la blanca, favorecían la acumulación de shinorine a expensas de una caída en los otros tres MAAs. Es más, al contrario que el resto de MAAs, el contenido en shinorine se correlacionó positivamente con la IBE, con la eficiencia fotosintética, con el contenido de clorofila *a* y con el área de los discos. Y de nuevo se determinó una correlación negativa entre shinorine y los demás MAAs y positiva entre porphyrina-334, palythine y asterina-330. En *C. crispus* se obtuvieron similares resultados que en *P. leucosticta*, el MAA palythine, que era el más abundante en esta especie, se sintetizaba en luz azul y en luz blanca, por el contrario, en luz verde o roja no se detectó incremento en la concentración de ninguno de los MAAs (Franklin *et al.*, 2001). Sin embargo, en *P. leucosticta* la respuesta en el cultivo con luz blanca se asemeja a la respuesta más común, que es la del resto de calidades lumínicas y no a la azul, como ocurría en *C. crispus* (Franklin *et al.*, 2001). Ya en otros trabajos anteriores se había descrito que el cultivo en luz azul del dinoflagelado *Alexandrium excavatum* incrementaba el contenido de las sustancias que absorbían RUV, aunque no en el mismo grado que la luz blanca (Carreto *et al.*, 1990b). Y posteriormente un efecto dependiente de la especie lo determinaron Riegger y Robinson (1997), en diatomeas antárticas que respondía a longitudes de onda entre 370 y 460 nm mientras que *Phaeocystis antarctica* respondía entre 305 y 340 nm. En la cianobacteria *Gloeocapsa* sp. la RUV a 320 nm era la más efectiva incrementando el contenido de MAAs, mientras que las luces

azul, verde y roja no inducían la acumulación de estas moléculas (García-Pichel *et al.*, 1993). Se propusieron dos fotorreceptores en la síntesis de MAAs en *C. crispus*, debido a que por un lado se observaba la acumulación de palythine en luz azul y también porque se observa que cuando la luz azul precedía a la radiación UVA la cantidad de shinorine era mucho mayor que la que cabría esperar. Estos dos fotorreceptores, azul y UVA, actuaban sinérgicamente (Franklin *et al.*, 2001). Posteriormente se determinó en esta misma especie, realizando un espectro de acción para la fotoinducción de MAAs, que la radiación UVA era la más efectiva en término de síntesis de MAAs, concretamente observaron un máximo de inducción a 340 nm (Kräbs, 2003; Kräbs *et al.*, en preparación). Tal y como se ha descrito anteriormente, en *P. leucosticta* para una misma irradiancia, la presencia de luz azul de banda ancha y luz azul acompañada de otras bandas de radiación estimularía la síntesis de MAAs, por lo tanto, se podría pensar también en la presencia de un fotorreceptor azul en este proceso. Pero además, debido a que como se ha indicado existen diferencias en el porcentaje en que aparecen los distintos tipos de MAAs, se propone que la luz azul proporcionaría a los talos la maquinaria necesaria para que tuviesen lugar las reacciones de interconversión desde shinorine hacia palythine y asterina-330, probablemente induciendo la actividad y/o síntesis del grupo de enzimas que participan en dichas reacciones (figura IV.4.1).

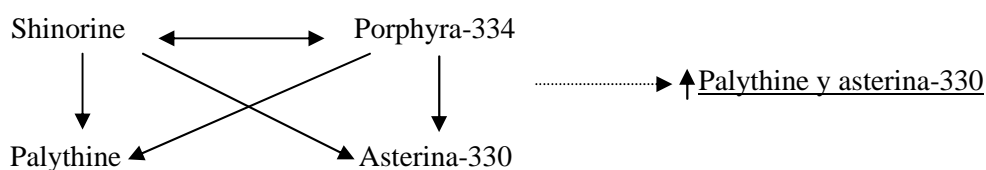


Figura IV.4.1. Esquema de las posibles reacciones de interconversión entre los MAAs que se producirían durante la incubación de *P. leucosticta* en luz azul, determinadas a partir de las correlaciones observadas entre los mismos.

IV.4.3. Efecto de la RUV y PAR a lo largo de un ciclo de la fase gametofítica.

Tras la incubación de los talos de *P. leucosticta* recolectados en los meses de diciembre, enero y febrero se observó que la alta irradiancia PAR fue la responsable de las pequeñas caídas del rendimiento cuántico óptimo, sin observarse un efecto aditivo de la RUV, sin embargo, la presencia de la radiación UVB en febrero, marzo y abril derivaba en unas caídas de los rendimientos cuánticos menores respecto al tratamiento en el que estaba presente sólo la radiación UVA. Un efecto positivo de la radiación UVB ante los procesos de reparación de la fotosíntesis fue descrito en el alga parda *Dictyota dichotoma* (Flores-Moya *et al.*, 1999) y posteriormente en *Posidonia oceanica* (Figueroa *et al.*, 2002). Cuando la fase macroscópica (haploide) de *P. leucosticta* se encontraba próxima a desaparecer en el mes de marzo-abril, como indicativo de que la planta había iniciado la fase reproductiva, en la que se produce la

transformación de células vegetativas en células reproductoras y se mueren el resto de células vegetativas, los talos eran más sensibles a las altas irradiancias PAR y/o RUV del cultivo, probablemente los mecanismos de reparación y protección no se encontraban activos en su totalidad. Además, en general, los pigmentos fotosintéticos y las proteínas, bien antes o tras la experimentación, fueron inferiores en concentración conforme los talos se aproximaban a la desaparición en su fase macroscópica. También en el contenido total de MAAs se refleja este hecho, dicho contenido se mantuvo invariante tras la experimentación en los 4 primeros meses, sin embargo, en abril se observó una caída en el contenido de estos compuestos cuando la RUV estaba presente en el cultivo, concretamente la caída fue inferior en presencia de la radiación UVB. De nuevo parece que la presencia de esta banda está favoreciendo, en este caso, en términos de evitar una mayor pérdida de MAAs. Aunque al contrario de lo que se afirma en la literatura, que se produciría una mayor acumulación de MAAs en presencia de RUV (Karsten *et al.*, 1998b), en *P. leucosticta* no se observó incremento alguno del contenido interno de MAAs respecto al valor inicial. En algunos de los meses de experimentación, también la presencia de radiación UVB favorece que se mantenga el contenido de proteínas solubles, o bien que la caída de la concentración sea inferior que cuando no estaba presente esta banda.

Al no mantenerse los talos en condiciones de limitación de nitrógeno previamente al comienzo del experimento, no se observaron los incrementos en el contenido interno de nitrógeno, ni en los compuestos nitrogenados, como en el caso del estudio de la calidad lumínica, a pesar de que el cultivo se realizó en un medio rico en este nutriente (con adición de medio Provasoli). De hecho, se observa en general que aunque se parta de un mayor contenido interno inicial de nitrógeno, tras la semana de experimentación dicho contenido tiende a decrecer hasta mantenerse en torno a 40 mg·g⁻¹PS. Sin embargo, el contenido de carbono únicamente disminuyó después de la experimentación en el mes de abril, indicativo de que en esa fase los talos poseen una menor capacidad de fijación de carbono inorgánico.

El contenido inicial de FC fue inferior en el mes de abril y el de FE no varió a lo largo del ciclo, a pesar de que está descrita la mayor plasticidad de la FE en el ficobilisoma (Algarra y Rüdiger, 1993). Tras el periodo de experimentación, el contenido de alguna de las ficobiliproteínas se veía influenciada por la RUV, en este caso, la presencia de la radiación UVB inducía un descenso superior del contenido que sólo en presencia de UVA y PAR. Además, en el mes de abril tanto la alta irradiancia PAR como la RUV influían negativamente en el contenido de FE, como indicativo de que la planta había iniciado su fase reproductiva. En *Calothrix pulvinata* se observó un descenso progresivo del contenido de FE y FC conforme aumentaba el tiempo de exposición a la radiación UVB (Sinha y Häder, 1998). Sin embargo, el contenido de clorofila *a* en *P. leucosticta* no se veía influenciado por la presencia de altas

irradiancias PAR ni por la RUV. Comparando estos resultados con los obtenidos en el experimento IV.1 en el que se incubaron los talos en luz continua, se observa que a pesar de que la concentración inicial de clorofila *a* era muy inferior respecto a este caso, se producía una caída adicional tras la incubación a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, probablemente debido a que los mecanismos de reparación estuviesen dañados en esas condiciones de luz continua tras más de dos días de incubación, puesto que en el experimento realizado con esta misma especie a corto plazo no se observaban esas caídas. En la cianobacteria *Anabaena* sp. se observó un descenso más pronunciado del contenido de ficocianina que de clorofila *a* cuando la RUV estaba presente en el cultivo (Sinha *et al.*, 1998). Y concretamente en *P. leucosticta* se determinó que la presencia de la RUV solar hacía disminuir el contenido tanto de clorofila *a* como de ficobiliproteínas, respecto a la ausencia de esta banda espectral (Figueroa *et al.*, 1997). Las diferencias fundamentales con respecto a este último trabajo fueron las menores irradiancias a las que se vieron expuestas las algas. En el ciclo diario en el que se determinó la evolución del contenido pigmentario, la irradiancia máxima PAR fue $1955 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, la de UVA $45 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ y la de UVB $1.2 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ (Figueroa *et al.*, 1997). Además, también hay que tener en cuenta que las lámparas artificiales no simulan al 100% la emisión espectral de la radiación solar.

En el mes de enero la concentración de clorofila *a* inicial fue superior que en el resto de los meses de experimentación, coincidiendo con el máximo contenido de nitrógeno interno inicial y con el mayor recubrimiento rocoso por parte de esta especie. Se podría pensar que el autosombreado de unos talos sobre otros resultaría en la acumulación de más clorofila *a* para la captación de la energía lumínica. Otros autores describieron un decremento en la concentración de clorofila *a* al final del ciclo de vida de la fase gametofítica como consecuencia de la senescencia o "muerte programada", momento en el que se movilizan gran cantidad de sustancias de reserva hacia la reproducción para la producción de espermatidas (Hernández *et al.*, 1993b). Además se producía una disminución del crecimiento al final del ciclo asociada a la limitación de fosfato (Flores-Moya *et al.*, 1998). Al principio del ciclo se ha descrito que la producción primaria de esta especie está limitada por nitrógeno (Hernández *et al.*, 1993b), aunque en un trabajo posterior se indica que el crecimiento en la primera fase no está limitado por ningún nutriente (Flores-Moya *et al.*, 1998).

Respecto a los diferentes tipos de MAAs se observó un claro incremento en la proporción inicial de porphyrina-334 conforme se avanzaba en los meses de experimentación respecto a shinorine, mientras que en general, los otros dos MAAs, palythine y asterina-330 estuvieron presentes en su valor inicial en un mayor porcentaje en el mes de marzo, coincidiendo con el incremento en las dosis mensuales de radiación solar, tal y como se reflejó en el capítulo II, y que se atribuía a la participación de las reacciones de interconversión entre MAAs. Sin

embargo, en el mes de abril, en el que las dosis medias mensuales eran superiores que en marzo, no se observó la acumulación preferente de palythine y asterina-330, se sugiere que los mecanismos mediante los cuales tendrían lugar estas reacciones no estarían activos, por estar preparándose los talos para la senescencia. Cabe destacar que tras la semana de experimentación en los primeros meses, diciembre, enero y febrero, se favorecía la acumulación de palythine y asterina-330 frente a shinorine y porphyra-334 en el tratamiento PA, de modo que la radiación UVB tenía un efecto negativo en la acumulación de aquellos MAAs; tal y como ocurría con shinorine y palythine (MAAs mayoritarios) en *C. crispus* (Kräbs *et al.*, 2002).

Tomando todos los datos de MAAs de manera global, se corroboran la correlaciones que se habían determinado en anteriores capítulos entre los diferentes tipos de MAAs, de nuevo se repite la correlación negativa entre shinorine y porphyra-334, positiva entre palythine y asterina-330 y también negativa entre porphyra-334 y palythine y asterina-330. Con todo ello, se sigue sugiriendo la interconversión de shinorine y/o porphyra-334 hacia palythine y asterina-330, cuando las dosis de radiación son muy elevadas. Sin embargo, no parece ser que en este experimento shinorine estuviese asumiendo el papel de precursor de sustancia antioxidante (gadusol), tal y como se sugirió en anteriores capítulos, puesto que en general, tampoco se observó disminución alguna en la concentración total de MAAs, excepto en presencia de RUV en el mes de abril, provocada fundamentalmente por la proximidad de la senescencia de los talos.

CAPÍTULO V

Efecto combinado de la RUV y la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de tres especies del género *Porphyra*.

V.1. Efecto combinado de la RUV y la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de *P. columbina*.

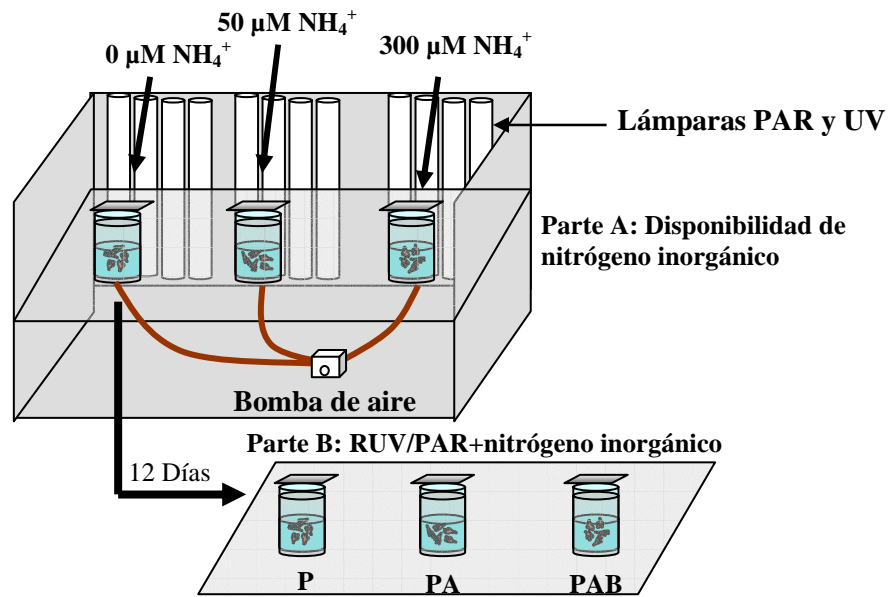
V.1.1. Diseño experimental:

Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.

Los talos empleados para este experimento fueron recolectados el 15 de noviembre de 2001 y se mantuvieron durante una semana en precultivo a 15° C en cilindros de metacrilato (Plexiglas®), empleando agua de mar artificial (Marinemix hw-Professional) a 33‰ con adición de fosfato (10 μM) y sin adición de nitrógeno inorgánico, con burbujeo de aire constante en la cámara de cultivo Sanyo MLR 350 de la Estación de Fotobiología Playa Unión a 15° C en 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR (lámparas Truelite) con un fotoperiodo de 14h luz:10h oscuridad. Se cambió el medio una vez durante el precultivo. Se cortaron discos de 1.2 cm de diámetro. El experimento se llevó a cabo en los mismos cilindros de metacrilato, en la cámara de cultivo a 15° C bajo un fotoperiodo de 14:10 y con una irradiancia PAR de 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Truelite) y 15 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ de radiación UVA y 0.9 $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVB. La RUV se consiguió empleando 5 lámparas Q-Panel. Durante 6 días se cultivaron los discos en tres concentraciones de cloruro amónico: 0, 50 y 300 μM que se consiguieron adicionando al agua de mar artificial con fosfato, el cloruro amónico según las concentraciones anteriores. Se tomaron medidas al iniciar el experimento, a los 3 y a los 6 días de cultivo y se midieron: los rendimientos cuánticos efectivo y óptimo, curvas TTE-E y evolución de oxígeno, ambas calculadas tras periodos de incubación de 15 minutos bajo las irradiancias crecientes señaladas en el apartado M.9 (material y métodos), el crecimiento (material y métodos, opción A) y la absorbancia (empleando el radiómetro plano Licor Li-189), También se midió el contenido pigmentario (clorofila *a* y ficobiliproteínas) y de MAAs (figura V.1.1).

Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.

Transcurridos los 6 días de la parte A, se cambió el medio de cultivo a los discos que habían estado expuestos al tratamiento sin adición de cloruro amónico y se mantuvieron otros 6 días más sin nitrógeno inorgánico. Tras esos 12 días los discos se sometieron a 3 tratamientos lumínicos: P, PA y PAB, con la adición previa de cloruro amónico (300 μM), la misma cantidad para los tres tratamientos indicados. Transcurridos 1 y 3 días se midió la TTE, y el contenido de clorofila *a* y de MAAs (figura V.1.1).



Parte A: Disponibilidad de nitrógeno inorgánico

- Rendimientos cuánticos efectivo y óptimo
- Curvas TTE-E
- Curvas TFB-E

Tiempos de muestreo:

- Inicial
- 2 días de exposición
- 6 días de exposición

- Compuestos nitrogenados:
- Clorofila *a*
 - Ficobiliproteínas
 - MAAs

- Inicial
- 2 días de exposición
- 6 días de exposición

- Crecimiento
- Absortancia

- Inicial
- 2 días de exposición
- 6 días de exposición

Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico

- TTE
- Clorofila *a*
- MAAs

- Inicial
- 1 día de exposición
- 3 días de exposición

Figura V.1.1. Esquema del diseño experimental.

V.1.2. Resultados:

V.1.2.1. Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.

Respuesta fotosintética:

Los rendimientos cuánticos efectivo y óptimo disminuyeron significativamente a lo largo del tiempo respecto al valor inicial en todos los tratamientos. Estas caídas fueron significativamente superiores en el tratamiento al que no se le adicionó nitrógeno inorgánico ($p < 0.05$) (figura V.1.2.A,B).

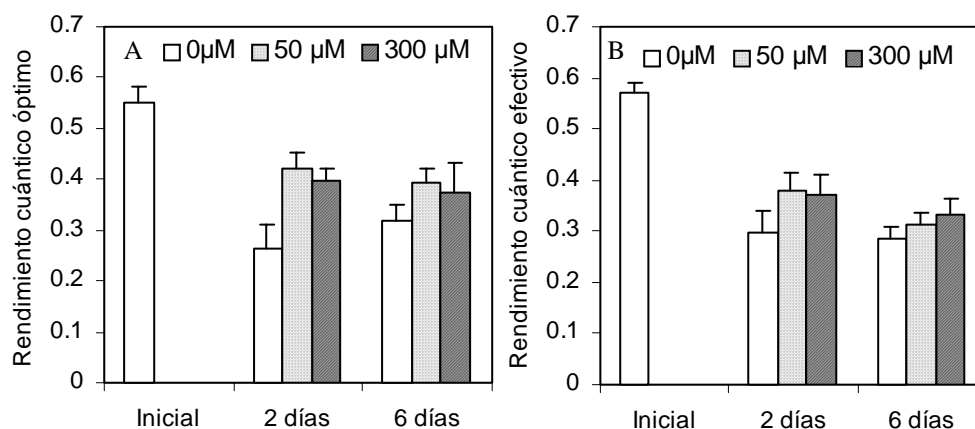


Figura V.1.2. Rendimientos cuánticos óptimo (A) y efectivo (B) al iniciar el experimento y tras los 2 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 µM) para *P. columbina*.

La $TFB_{m\acute{a}x}$ se incrementó significativamente conforme la concentración de amonio era mayor en el medio de cultivo ($p < 0.05$) (figura V.3.A,B; tabla V.1.1). Los discos cultivados a 300 µM de amonio se caracterizaron por poseer una mayor $TFB_{m\acute{a}x}$ y una mayor tasa de respiración en oscuridad que aquellos cultivados en 0 y 50 µM de cloruro amónico. Estos dos parámetros también se incrementaron significativamente desde el día 2 al 6 de cultivo en los tratamientos de 50 y 300 µM de amonio ($p < 0.05$). La eficacia fotosintética (Φ_{O_2}), valor de la pendiente de la curva, se incrementó en todos los tratamientos a los 2 días ($p < 0.05$), sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0.05$) (figura V.1.3.A,B; tabla V.1.1).

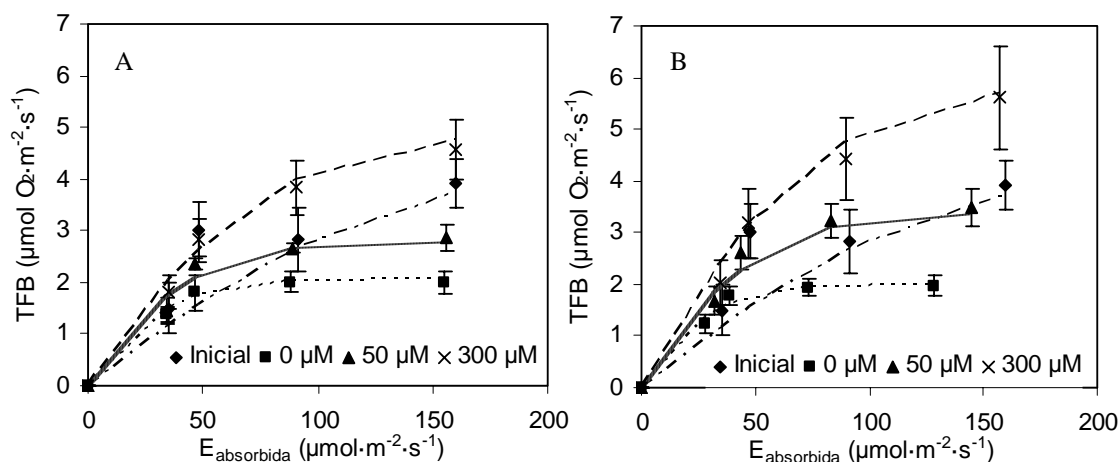


Figura V.1.3. Tasa de fotosíntesis bruta (expresada como $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) al iniciar el experimento y tras los 2 (A) y 6 días (B) de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM) para *P. columbina*.

Tabla V.1.1. Tasa de fotosíntesis bruta (TFB_{max} , $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), eficiencia fotosintética (Φ_{O_2} , $\mu\text{mol O}_2\cdot(\mu\text{mol fotones})^{-1}$) y respiración en oscuridad (R_0 , $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) en *P. columbina* después de 2 y 6 días de experimentación. Los valores representan el valor medio \pm desviación estándar tras ajustar los datos para cada réplica a la ecuación del tipo Jassby y Platt (1976).

		Amonio (μM)	TFB_{max}	Φ_{O_2}	R_0
Inicial			4.46 ± 0.088	0.034 ± 0.003	0.27 ± 0.090
2 días	0 μM		2.06 ± 0.143	0.055 ± 0.003	0.93 ± 0.096
	50 μM		2.81 ± 0.200	0.058 ± 0.008	0.91 ± 0.149
	300 μM		4.94 ± 0.440	0.061 ± 0.010	0.97 ± 0.148
6 días	0 μM		2.0 ± 0.20	0.060 ± 0.009	0.44 ± 0.040
	50 μM		3.41 ± 0.19	0.063 ± 0.008	0.86 ± 0.083
	300 μM		5.93 ± 1.00	0.073 ± 0.009	1.23 ± 0.270

Las tasas de transporte electrónico calculadas para las 5 irradiancias crecientes señaladas en el apartado de material y métodos (las mismas que para el cálculo de las curvas TFB-E) se ajustaron a una línea recta, cuya pendiente inicial no varió significativamente para ninguno de los tratamientos entre el valor inicial y los valores a los 2 días de cultivo ($p > 0.05$). Sin embargo, después de 6 días los valores de la pendiente y de la $\text{TTE}_{\text{máx}}$ fueron significativamente superiores en los talos cultivados en 300 μM de amonio respecto a los talos cultivados sin adición de nitrógeno inorgánico ($p < 0.05$) (figura V.1.4.A,B).

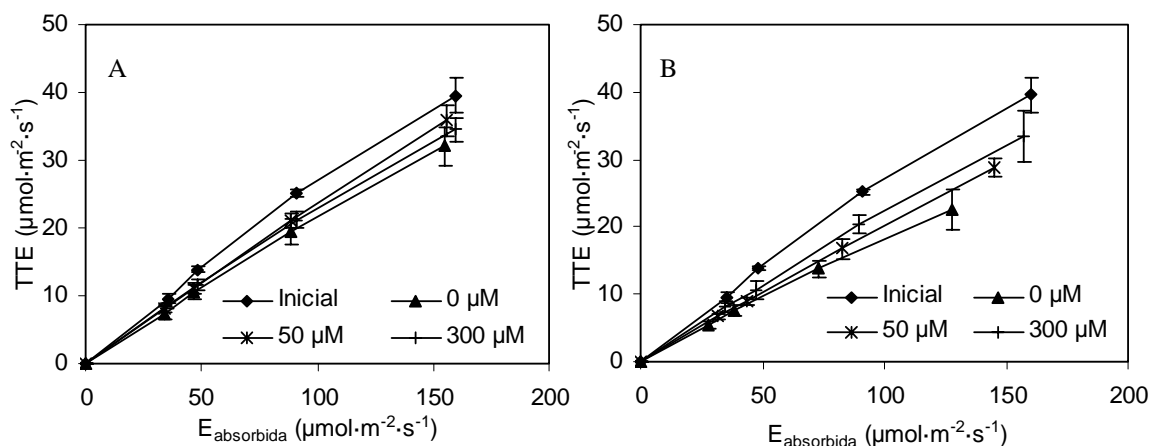


Figura V.1.4. Tasa transporte electrónico (expresada como $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) al iniciar el experimento y tras los 2 (A) y 6 días (B) de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM) para *P. columbina*.

La relación TTE/TFB (calculada con los datos que se representan en las figuras V.1.3 y V.1.4) permaneció próxima al valor teórico de 1 molécula de oxígeno necesita 4 electrones del PSII, a bajas irradiancias y cuando la concentración de nitrógeno era alta en el cultivo. Después de 2 días de experimentación, la relación fue aproximadamente dos veces superior a una irradiancia de 300 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ respecto a 66 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, y después de 6 días la relación TTE/TFB disminuyó a altas irradiancias, lo cual era indicativo de que se necesitaban menos electrones para producir una molécula de oxígeno (tabla V.1.2).

Tabla V.1.2. Relación entre TTE ($\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y la TFB ($\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) para cada una de las irradiancias de cultivo y para cada uno de los tratamientos a lo largo del experimento.

Irradiancia ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)	Inicial	0 $\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$		50 $\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$		300 $\mu\text{M NH}_4\text{Cl}$	
		2 días	6 días	2 días	6 días	2 días	6 días
66	6.4±2.2	5.4±0.9	4.5±0.8	5.6±1.0	4.0±0.7	4.7±0.9	4.1±1.0
90	4.6±0.8	5.9±1.0	4.3±0.6	4.7±0.4	3.4±0.5	4.1±0.7	3.4±0.8
171	8.9±1.9	9.7±0.2	7.2±0.9	8.0±0.5	5.2±0.7	5.5±0.1	4.6±0.9
300	10.1±1.4	16.0±2.3	11.4±1.9	12.5±1.4	8.3±1.0	7.6±1.1	5.9±1.3

La función que relaciona la fotosíntesis bruta y la TTE no es lineal sino hiperbólica, el valor máximo de la función TFB vs TTE se incrementó significativamente a 50 y 300 μM de amonio ($p < 0.05$) (datos no mostrados).

Crecimiento:

La tasa relativa de crecimiento fue significativamente superior en el tratamiento de 300 μM de amonio, seguida del tratamiento de 50 μM y por último, del tratamiento en el que no se adicionó nitrógeno al medio ($p < 0.05$). Los valores para las TRC ($\% \cdot \text{d}^{-1}$) después de los 6 días de experimentación fueron de 1.89 ± 1.22 , 7.21 ± 2.06 y de 10.61 ± 2.16 en los tratamientos de 0, 50 y 300 μM de cloruro amónico, respectivamente.

Contenido pigmentario (clorofila a y ficobiliproteínas):

La concentración de clorofila *a* en los tratamientos de 50 y 300 μM de amonio disminuyó significativamente después de 6 días de experimentación respecto al valor inicial ($p < 0.05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas durante todo el periodo de experimentación la concentración de clorofila *a* en el tratamiento al que no se le adicionó nitrógeno inorgánico ($p > 0.05$) (figura V.1.5).

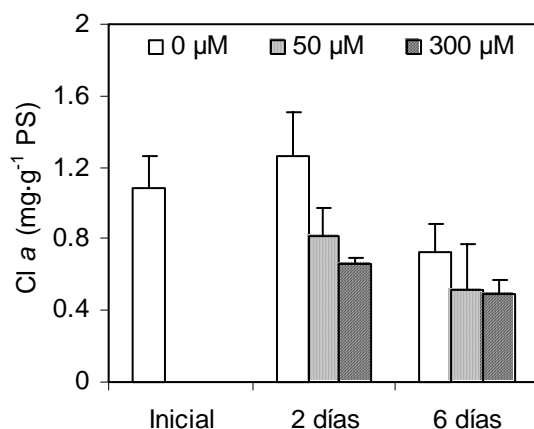


Figura V.1.5. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras los 2 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM) para *P. columbina*.

La concentración tanto de ficocianina como ficoeritrina, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) después de los 6 días de cultivo en los dos tratamientos de menor concentración de cloruro de amonio (0 y 50 μM). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la concentración de FE y FC en el tratamiento de 300 μM de amonio durante los 6 días de cultivo ($p > 0.05$) (figura V.1.6.A,B).

La relación FE/FC a los 6 días fue significativamente superior conforme se incrementaba el contenido de amonio en el cultivo ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas a lo largo del tiempo para los tratamientos de 50 y 300 μM de amonio ($p > 0.05$) (figura V.1.7).

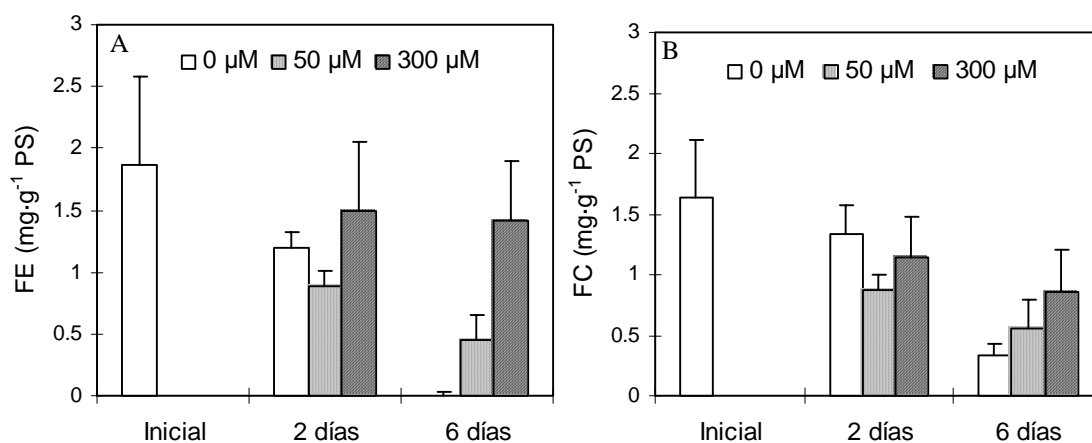


Figura V.1.6. Concentración de ficoeritrina (A) y ficocianina (B) al iniciar el experimento y tras los 2 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM) para *P. columbina*.

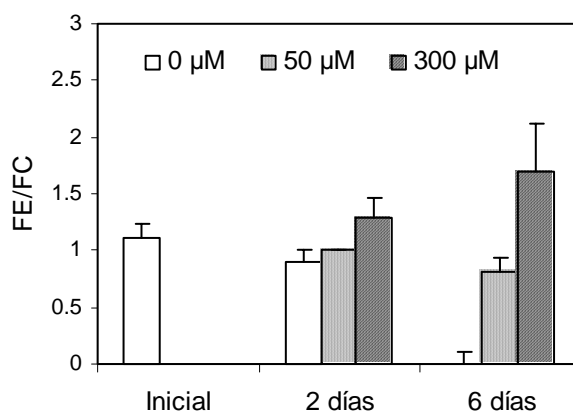


Figura V.1.7. Relación FE/FC al iniciar el experimento y tras los 2 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM) para *P. columbina*.

Absortancia:

A los 6 días de cultivo se observó una caída significativa de la absorbancia en el tratamiento al que no se adicionó cloruro amónico, de manera que la absorbancia fue significativamente superior en ese tratamiento que en el de 300 μM de cloruro amónico ($p < 0.05$) (figura V.1.8).

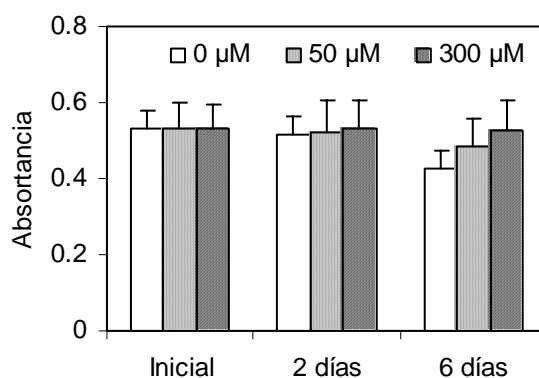


Figura V.1.8. Absorbancia de los discos de *P. columbina* tras la cultivo durante 2 y 6 días a los tratamientos de 0, 50 y 300 μM de cloruro amónico.

Contenido de MAAs:

La concentración de MAAs a los 2 y 6 días no varió significativamente en los tratamientos de 0 y 50 μM de amonio ($p > 0.05$), sin embargo, los discos cultivados a 300 μM de cloruro amónico incrementaron significativamente su contenido interno de MAAs después de los 6 días de experimentación respecto al valor inicial ($p < 0.05$) (figura V.1.9).

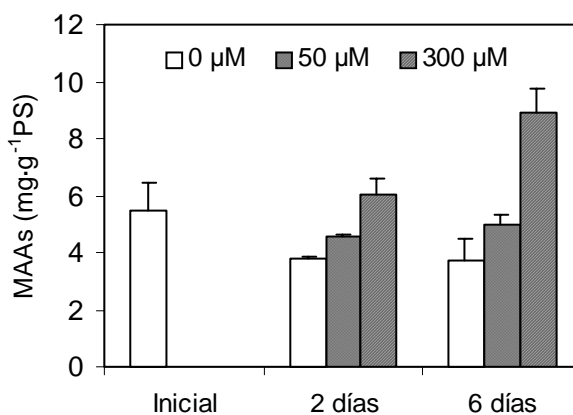


Figura V.1.9. Concentración de MAAs al iniciar el experimento y tras los 2 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM) para *P. columbina*.

En todas las muestras, se mantuvieron las proporciones relativas entre los distintos tipos de MAAs, por lo que se representó en la figura el contenido total o lo que es lo mismo la suma de los MAAs individuales. El MAA más abundante fue porphyra-334, aproximadamente con un 80% del total de MAAs, y seguidamente, con un valor próximo al 20% estaba presente shinorine. Del resto hasta el 100%, aproximadamente un 2-3% formaban parte unas pequeñísimas cantidades de mycosporine-gly, palythine y asterina-330.

Relaciones pigmentarias:

La relación FB/Cl *a* (figura V.1.10.A) se incrementó a lo largo del tiempo de cultivo en el tratamiento de 300 μM de amonio. Además, el valor de esta relación resultó ser menor que el valor inicial en los otros 2 tratamientos de nitrógeno. La relación MAAs/Cl *a* se incrementó a lo largo del tiempo y además ésta fue mayor a medida que la concentración de nitrógeno inorgánico se incrementaba en el medio de cultivo, alcanzándose así el valor máximo después de 6 días de incubación en el tratamiento de 300 μM de amonio. Además, la relación entre MAAs y ficobiliproteínas, se incrementó a lo largo del experimento, correlacionándose inversamente con la concentración de amonio y alcanzándose el valor más alto en ausencia de nitrógeno inorgánico en el medio (figura V.1.10.B,C).

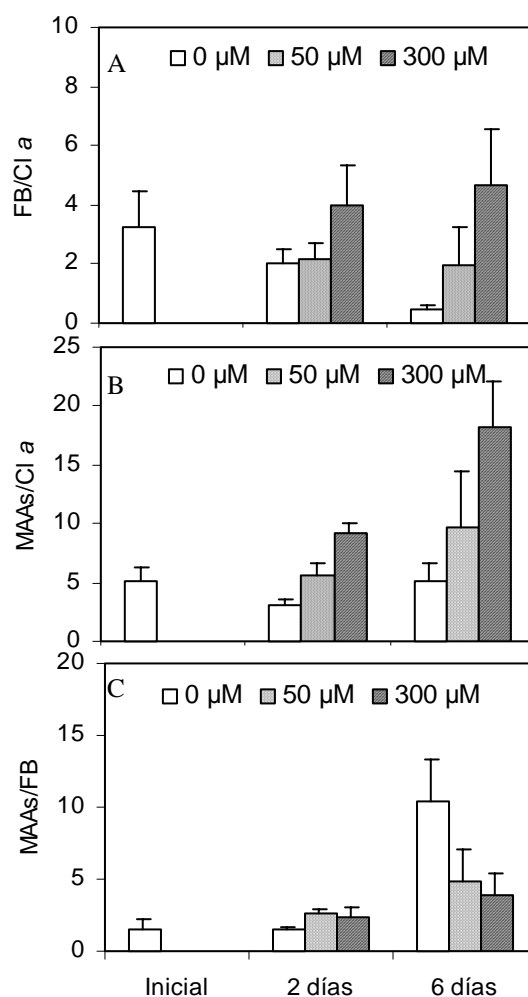


Figura V.1.10. Relación FB/Cl a (A), MAAs/Cl a (B) y MAAs/FB (C) al iniciar el experimento y tras los 2 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM) para *P. columbina*.

Correlaciones:

Tabla V.1.3. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables y parámetros indicados en la cultivo de *P. columbina* a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 50 y 300 μM). ** Correlación significativa p< 0.01, * Correlación significativa p<0.05 (n=7).

	TFB _{máx}	α	F _v /F _m	a	Cl a	FB	A
α	0.177						
F _v /F _m	0.381	-0.810*					
a	0.608	0.841*	-0.517				
Cl a	-0.475	-0.721	0.337	-0.870*			
FB	0.519	-0.529	0.721	-0.095	0.485		
A	0.596	-0.215	0.533	0.284	0.230	0.889**	
MAAs	0.939**	0.406	0.150	0.777	-0.552	0.353	0.483

Únicamente se determinaron correlaciones significativas positivas entre el contenido interno de MAAs y la $TFB_{m\acute{a}x}$, entre la eficiencia fotosintética y el área de los discos y entre la absorbancia y el contenido de ficobiliproteínas. Y se determinaron correlaciones negativas entre el rendimiento cuántico óptimo y la eficiencia fotosintética y entre el área de los discos y el contenido de clorofila *a* (tabla V.1.3).

V.1.2.2. Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.

Respuesta fotosintética:

La tasa de transporte electrónico calculada para la irradiancia del cultivo, fue inferior significativamente después de los 3 días en el tratamiento PAB (26.6) que en P (34.2) ($p < 0.05$) (figura V.1.11).

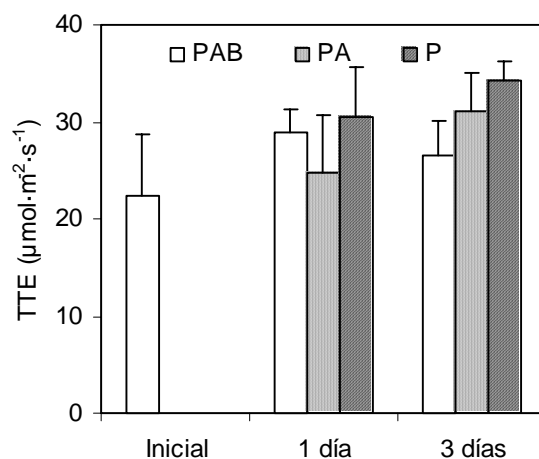


Figura V.1.11. TTE al iniciar el experimento de la parte B (RUV/PAR) y tras los días 1 y 3 de exposición a los tres tratamientos lumínicos PAB, PA y P. Cultivo en $300 \mu\text{M}$ de cloruro amónico con *P. columbina*.

Contenido pigmentario (clorofila *a*):

La concentración de clorofila *a* no varió significativamente durante los 3 días de experimentación ($p > 0.05$) (figura V.I.12).

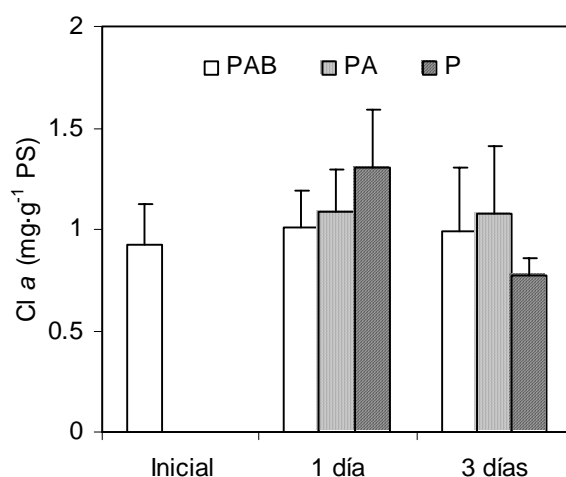


Figura V.1.12. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento de la parte B (RUV/PAR) y tras los días 1 y 3 de exposición a los tres tratamientos lumínicos PAB, PA y P. Cultivo en 300 μ M de cloruro amónico con *P. columbina*.

Contenido de MAAs:

La concentración de MAAs se incrementó significativamente, en todos los tratamientos por igual, tras un día de experimentación ($p < 0.05$). Después de 3 días el contenido de MAAs fue significativamente inferior en aquellos discos expuestos a PAR exclusivamente, en comparación con aquellos expuestos a los tratamientos PA y PAB ($p < 0.05$) (figura V.1.13).

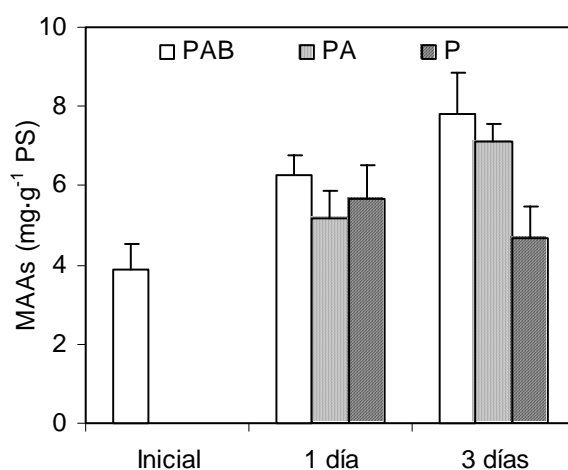


Figura V.1.13. Concentración de MAAs al iniciar el experimento de la parte B (RUV/PAR) y tras los días 1 y 3 de exposición a los tres tratamientos lumínicos PAB, PA y P. Cultivo en 300 μ M de cloruro amónico con *P. columbina*.

V.2. Efecto combinado de la RUV y la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de *P. leucosticta*.

V.2.1. Diseño experimental:

V.2.1.1. *Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.*

Los talos empleados para este experimento fueron recolectados el 18 de febrero de 2002 y se mantuvieron durante dos semanas en precultivo a 15° C en cilindros de metacrilato (Plexiglas®), empleando agua de mar artificial (Instant Ocean Salt) a 33‰ con adición de fosfato (10 µM) y sin adición de nitrógeno inorgánico, con burbujeo de aire constante e iluminados con 50 µmol·m⁻²·s⁻¹ de PAR (lámparas Truelite) con un fotoperiodo de 12h luz:12h oscuridad. Se cambió el medio cada 6 días durante el precultivo. Se cortaron discos de 1.2 cm de diámetro. El experimento se llevó a cabo en los mismos cilindros de metacrilato en la cámara de cultivo a 15° C bajo un fotoperiodo de 12:12 y con una irradiancia PAR de 300 µmol·m⁻²·s⁻¹ PAR, 15 W·m⁻² de radiación UVA y 0.9 W·m⁻² de UVB. La radiación PAR se consiguió con una lámpara Optimarc, empleando una placa difusora (Plexiglas® gs Weiss 017) para disminuir la irradiancia emitida por dicha lámpara, y la RUV se consiguió empleando 4 lámparas Q-Panel. Debido a que la lámpara Optimarc emite radiación UVC, se emplearon filtros Ultraphan 295 que cortan esta banda. Durante una semana se cultivaron los discos en tres concentraciones de cloruro amónico: 0, 100 y 300 µM, que se consiguieron adicionando al agua de mar artificial con fosfato, el cloruro amónico. Se midió al iniciar el experimento y tras los 3 y a los 7 días de cultivo: los rendimientos cuánticos efectivo y óptimo (PAM-2000), curvas TTE-E (Diving-PAM), crecimiento (según M.11.2. material y métodos), pigmentos (clorofila *a* y ficobiliproteínas), proteínas solubles, C y N internos, MAAs, absortancia, y amonio en el agua de mar.

V.2.1.2. *Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.*

Para estudiar el efecto diferencial de la RUV y PAR se llevó a cabo un experimento con talos de *P. leucosticta* crecidos en laboratorio a 10±2° C a partir de monosporas, estos talos crecieron en condiciones de bajo nitrógeno y por lo tanto, eran muy diferentes a los talos “salvajes”, principalmente en su contenido interno de nitrógeno. El experimento se llevó a cabo en recipientes de vidrio (PYREX 1 L) en una cámara de cultivo a 10±2° C bajo un fotoperiodo de 16h luz:8h oscuridad. Se empleó agua de mar artificial (Marinemix hw-Professional) a 35‰ con adición de fosfato (10 µM), con burbujeo de aire constante. La irradiancia de cultivo en PAB fue de 80 µmol·m⁻²·s⁻¹ de PAR, 9 W·m⁻² de UVA y 0.55 W·m⁻² de UVB. La PAR se consiguió con lámparas fluorescentes Osram y la RUV se consiguió empleando 2 lámparas Q-Panel. Durante 6 días se cultivaron los talos en tres tratamientos distintos: 1. radiación PAB sin

adición de cloruro amónico al agua de mar artificial con fosfato, 2. radiación PAB y adición de 300 μM de cloruro amónico, 3. PAR y adición de 300 μM de cloruro amónico. Se tomaron medidas al iniciar el experimento, a los 3 y a los 6 días de cultivo y se midió: rendimiento cuántico óptimo (PAM-2000), pigmentos (clorofila *a* y ficobiliproteínas) y MAAs.

V.2.2. Resultados:

V.2.2.1. Parte A: Disponibilidad de nitrógeno inorgánico.

Respuesta fotosintética:

Al igual que ocurría en *P. columbina*, se produjo una caída de los rendimientos cuánticos efectivo y óptimo durante el cultivo. Sin embargo, estas caídas fueron mayores y de igual magnitud en los tratamientos en los que no se adicionó cloruro amónico y en el de 100 μM ($p < 0.05$) (figura V.2.1.A,B).

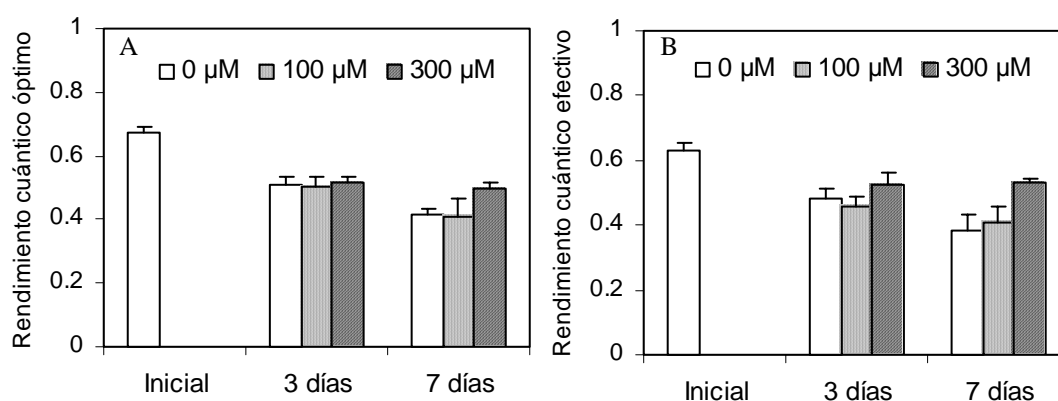


Figura V.2.1. Rendimientos cuánticos óptimo (A) y efectivo (B) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Tras los ajustes de las curvas TTE-E (Jassby y Platt, 1976) no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, ni respecto al inicial, tras los 3 días de cultivo ($p > 0.05$). Sin embargo, tras los 7 días se incrementó significativamente la pendiente inicial de la curva TTE-E y la $\text{TTE}_{\text{máx}}$ en los discos que habían estado expuestos a los tratamientos con 100 y 300 μM de cloruro amónico ($p < 0.05$). Sin observarse diferencias significativas en el tratamiento al que no se adicionó cloruro amónico ($p > 0.05$) (figura V.2.2).

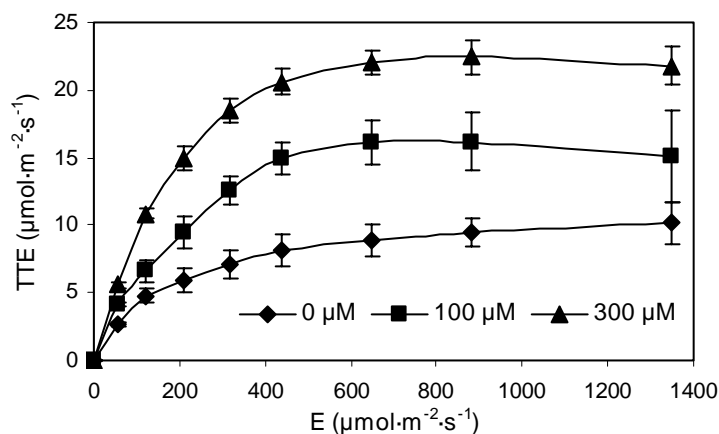


Figura V.2.2. Curvas tasa de transporte electrónico vs irradiancia tras los 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Crecimiento:

Al contrario que en *P. columbina*, en la que la TRC fue superior a medida que el contenido de cloruro amónico en el cultivo se incrementaba. En *P. leucosticta* la TRC después de los 7 días de cultivo no varió significativamente entre tratamientos ($p > 0.05$). Los valores de dichas tasas (en $\% \cdot \text{d}^{-1}$) fueron de 5.56 ± 0.55 (para 0 μM), 7.39 ± 1.99 (para 100 μM) y 6.63 ± 1.06 (para 300 μM).

Contenido pigmentario (clorofila a y ficobiliproteínas):

La concentración de clorofila *a* a los 7 días en *P. leucosticta* fue inferior significativamente en el tratamiento al que no se adicionó cloruro amónico respecto al cultivo a concentraciones de 100 y 300 μM de amonio ($p < 0.05$) (figura V.2.3).

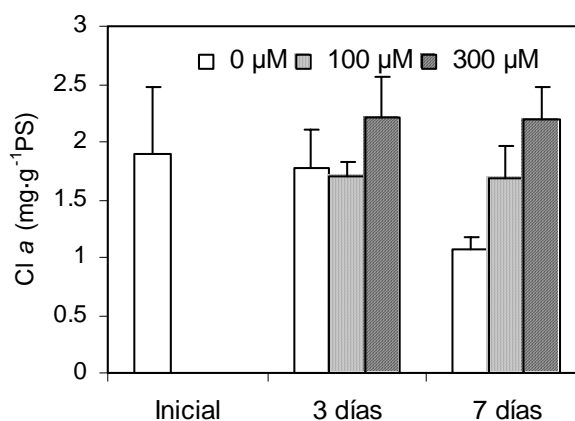


Figura V.2.3. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Al igual que ocurría en *P. columbina*, en *P. leucosticta* el contenido interno de FE y FC en los tratamientos de 0 y 100 μM de cloruro amónico cayó significativamente a medida que avanzábamos en el periodo de experimentación ($p < 0.05$) (figura V.2.4.A,B). En *P. leucosticta* se observó una caída del contenido de FC en 300 μM después de los 7 días de cultivo, mientras que se mantenía el contenido inicial en *P. columbina*. En *P. leucosticta* la relación FE/FC se comportó de igual modo en los tratamientos de 100 y 300 μM de cloruro amónico, observándose un incremento significativo a los 7 días de cultivo ($p < 0.05$). La relación fue inferior significativamente a los 7 días en el tratamiento de 0 μM que cuando se adicionaba cloruro amónico al medio de cultivo ($p < 0.05$) (figura V.2.4.C).

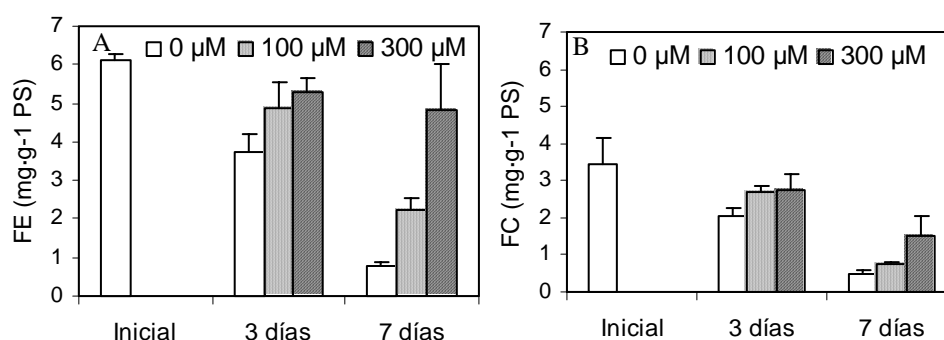


Figura V.2.4. Concentración de FE (A) y FC (B) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

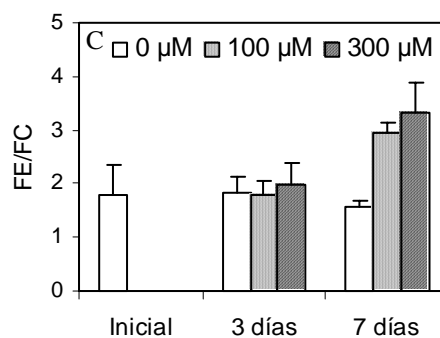


Figura V.2.4. Relación FE/FC (C) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Contenido de proteínas solubles:

Se produjo una caída significativa de la concentración de proteínas solubles en 0 μM y 100 μM después de los 7 días de cultivo. A los 3 días de cultivo la concentración de proteínas solubles fue inferior en el tratamiento en el que no se adicionó cloruro amónico que en el de 300 μM de amonio. A los 7 días la concentración fue significativamente superior en 300 μM que en 0 y 100 μM ($p < 0.05$) (figura V.2.5).

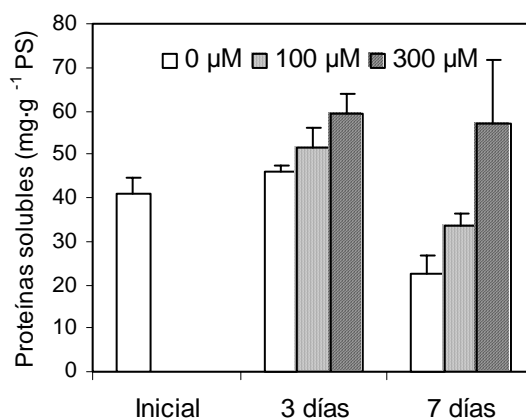


Figura V.2.5. Concentración de proteínas solubles al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Carbono y nitrógeno total. Relación C/N:

El contenido interno de carbono se incrementó significativamente a los 3 días de cultivo en el tratamiento de 100 μM de cloruro amónico ($p < 0.05$), manteniéndose dicho valor hasta el final del experimento. En los otros dos tratamientos no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (figura V.2.6.A). El contenido interno de nitrógeno disminuyó significativamente en los tratamientos sin amonio y con 100 μM después de los 3 y 7 días de cultivo, respectivamente ($p < 0.05$). En el tratamiento de 300 μM de cloruro amónico se observó un incremento significativo del contenido interno de nitrógeno ya a los 3 días de experimentación ($p < 0.05$). Fijando el tiempo, tanto a los 3 como a los 7 días de cultivo el contenido de nitrógeno era significativamente superior en 300 μM que en 100 μM , y en 100 μM que en ausencia de nitrógeno inorgánico ($p < 0.05$) (figura V.2.6.B). La relación C/N se comportó inversamente a como lo hacía el nitrógeno, en 0 y 100 μM de cloruro amónico se incrementaba la relación conforme avanzaba el experimento y en 300 μM se observó una pequeña caída de dicha relación ya a los 3 días de cultivo ($p < 0.05$) (figura V.2.6.C).

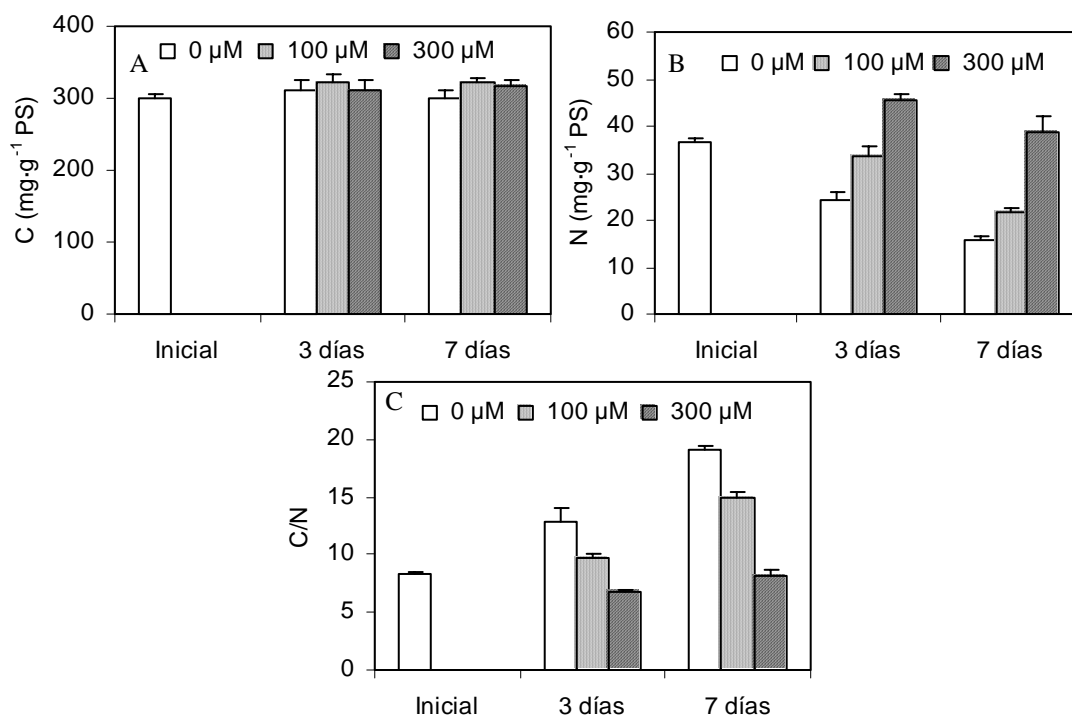


Figura V.2.6. Contenido interno de C (A), N (B) y relación C/N (C) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Absortancia:

Al igual que ocurría en *P. columbina*, se observó una caída significativa de la absortancia a los 7 días de cultivo en el tratamiento de 0 μM. Pero además en *P. leucosticta* se observó un incremento significativo de la misma en 300 μM de cloruro amónico. A los 7 días, conforme el contenido de cloruro amónico en el cultivo era superior la absortancia se incrementaba ($p < 0.05$). Aunque siempre fue inferior que en *P. columbina*, también el valor inicial (figura V.2.7).

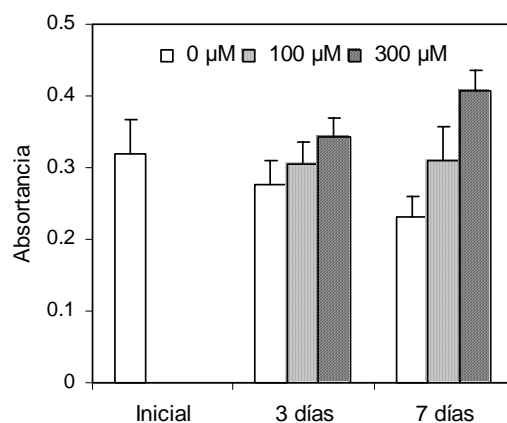


Figura V.2.7. Absortancia de los discos al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Contenido de MAAs:

Al igual que en *P. columbina*, en *P. leucosticta* se produjo un incremento de concentración de MAAs a los 7 días de cultivo en el tratamiento de 300 μM . Además se produjo una caída significativa del contenido interno en los tratamientos de 0 y 100 μM ($p < 0.05$) (figura V.2.8). El inicial estaba compuesto aproximadamente por un 85% de porphyra-334 y un 5% tanto de shinorine, como de palythine y de asterina-330. Durante el periodo de experimentación la proporción relativa de porphyra-334 no cambió significativamente ($p > 0.05$), mientras que la de shinorine se incrementó a los 3 días en todos los tratamientos y continuó subiendo hasta el final del experimento en el tratamiento de 300 μM . Las proporciones relativas de asterina-330 y palythine disminuyeron significativamente ya a los 3 días en todos los tratamientos ($p < 0.05$) (figura V.2.9.A,B,C,D).

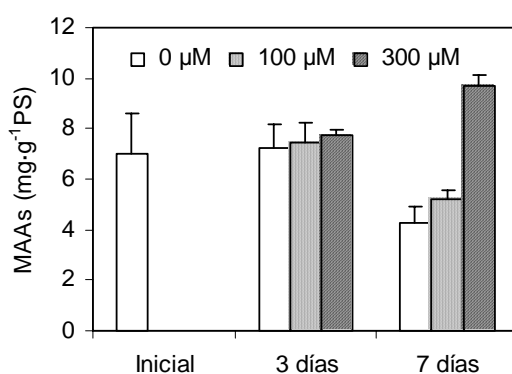


Figura V.2.8. Concentración de MAAs al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

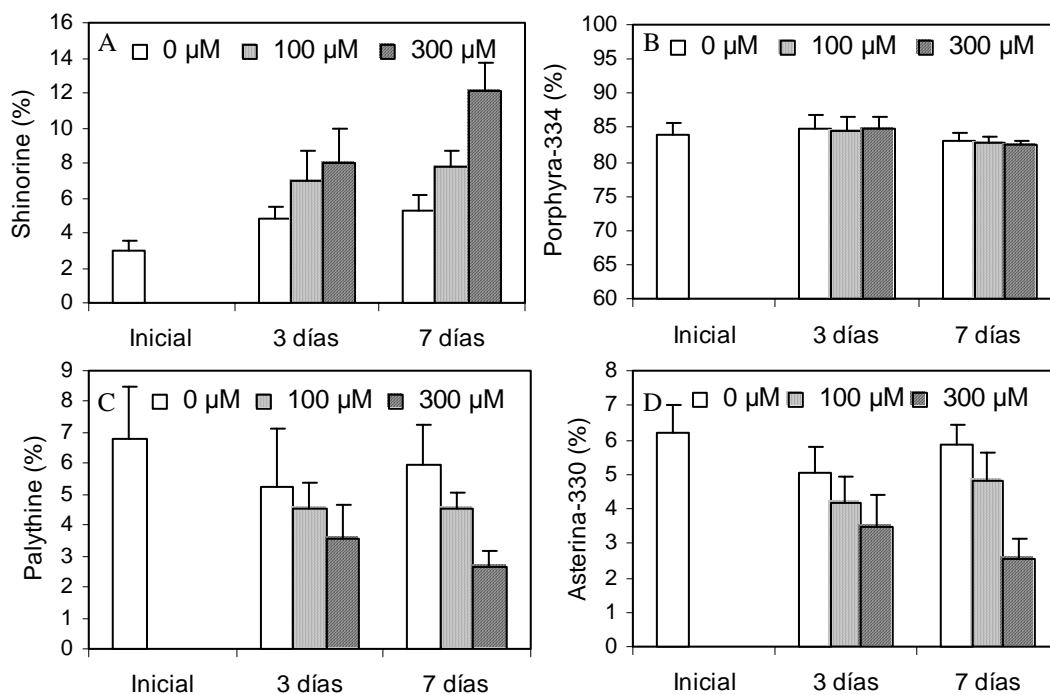


Figura V.2.9. Proporción relativa de shinorine(A), porphyra-334 (B) palythine (C) y asterina-330 (D) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Tabla V.2.1. Coeficientes de correlación de Pearson para los MAAs en el cultivo de *P. leucosticta* a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM). ** Correlación significativa $p < 0.01$, * Correlación significativa $p < 0.05$ ($n=21$).

	MAAs	SH	PR	PNE
SH	0.455*			
PR	0.077	-0.398		
PNE	-0.508*	-0.869**	-0.096	
AS	-0.585**	-0.824**	-0.175	0.967**

Se observó una correlación positiva entre la concentración de MAAs y el contenido de shinorine y negativa entre dicha concentración y el contenido de palythine y asterina-330. Estos dos últimos MAAs se correlacionaron positivamente. Y shinorine se correlacionó negativamente con ambos (tabla V.2.1).

Relaciones pigmentarias:

La relación FB/PtS disminuyó significativamente respecto al inicial a medida que avanzaba el cultivo, además la disminución fue más acusada a los 7 días conforme había menos amonio ($p < 0.05$) (figura V.2.10.A). Podríamos pensar que se estaban movilizandando las ficobiliproteínas de manera que podrían actuar como sustancia de reserva de nitrógeno.

La relación MAAs/Cl *a* no se incrementó en el tratamiento de 300 μM de cloruro amónico, como ocurría en *P. columbina*. Pero, al igual que en dicha especie se observó que la relación en el tratamiento de mayor concentración de amonio era superior a los otros dos tratamientos ($p < 0.05$) (figura V.2.10.C). La relación MAAs/FB también siguió el mismo patrón en *P. leucosticta* que en *P. columbina* (figura V.2.10.D).

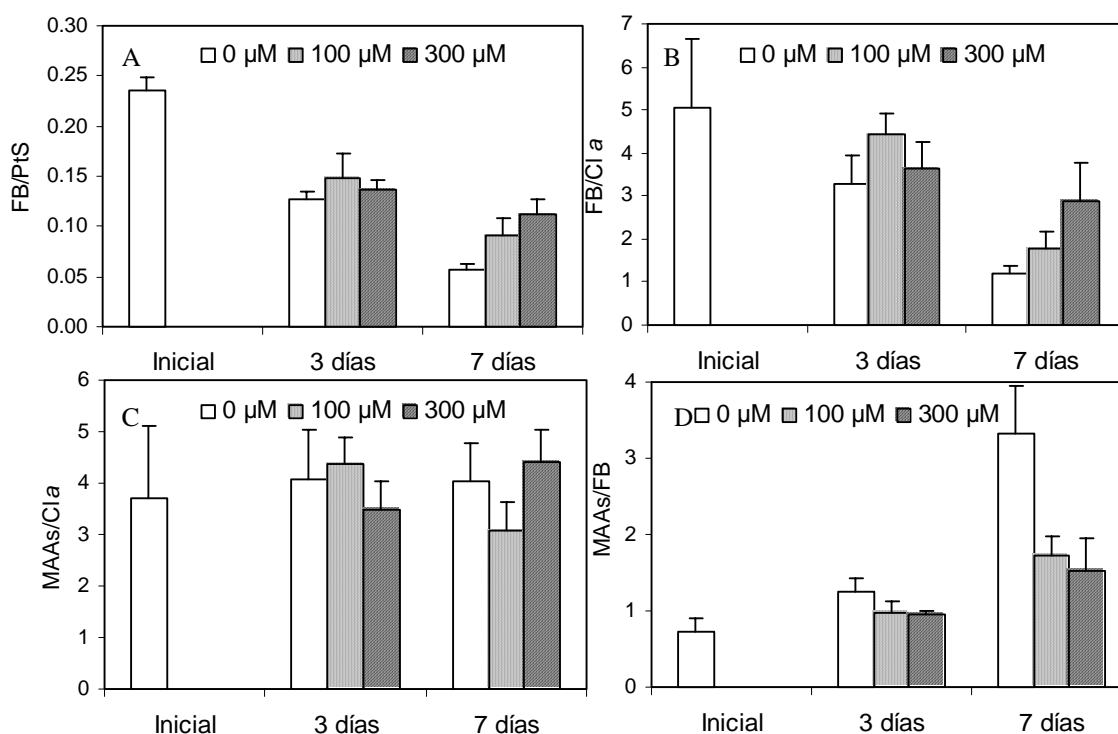


Figura V.2.10. Relación FB/PtS(A), FB/Cl a (B), MAAs/Cl a (C) y MAAs/FB (D) al iniciar el experimento y tras los 3 y 7 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. leucosticta*.

Correlaciones:

Tabla V.2.2. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables indicadas en el cultivo de *P. leucosticta* a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM). ** Correlación significativa $p < 0.01$, * Correlación significativa $p < 0.05$ (n=7).

	Φ_{PSII}	a	Cl a	FB	PtS	N	C/N	A
a	-0.505							
Cl a	0.688	-0.263						
FB	0.880**	-0.729	0.742					
PtS	0.523	-0.423	0.896**	0.731				
N	0.739	-0.465	0.890**	0.851*	0.882**			
C/N	-0.804*	0.512	-0.916**	-0.926**	-0.896**	-0.968**		
A	0.550	0.127	0.887**	0.527	0.766*	0.774*	-0.781*	
MAAs	0.621	-0.244	0.859*	0.691	0.914**	0.798*	-0.849*	0.848*

Se determinó una correlación positiva entre el rendimiento cuántico efectivo y la concentración de FB y negativa con la relación C/N. El contenido interno de N se correlacionó positivamente con los compuestos nitrogenados. Y el contenido de MAAs se correlacionó positivamente con el de clorofila a y proteínas solubles, al igual que con la absorbancia (tabla V.2.2).

V.2.2.2. Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.

Respuesta fotosintética:

El rendimiento cuántico óptimo se mantuvo en el tratamiento en el que no se exponían los talos a la RUV, sin embargo, siempre que la RUV estaba presente se producía una caída ya a los 3 días de cultivo y la caída se mantenía hasta el final del experimento ($p < 0.05$) (figura V.2.11).

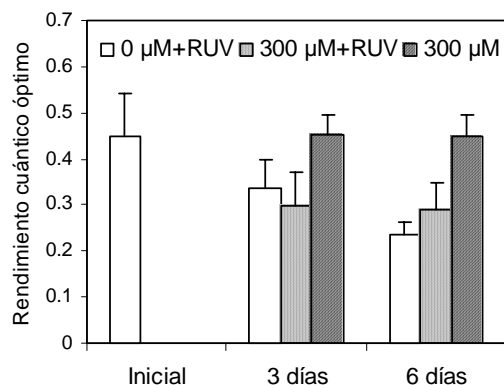


Figura V.2.11. Rendimiento cuántico óptimo tras 3 y 6 días de cultivo a los tratamientos 0 μM de cloruro amónico+RUV, 300 μM de cloruro amónico+RUV y 300 μM de cloruro amónico sin RUV para *P. leucosticta*.

Contenido pigmentario (clorofila *a* y ficobiliproteínas):

La concentración de clorofila *a* se comportó de igual modo que el rendimiento cuántico óptimo (figura V.2.12).

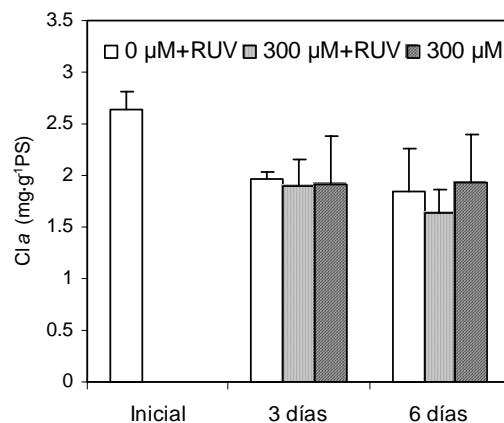


Figura V.2.12. Concentración de clorofila *a* tras 3 y 6 días de cultivo a los tratamientos 0 μM de cloruro amónico+RUV, 300 μM de cloruro amónico+RUV y 300 μM de cloruro amónico sin RUV para *P. leucosticta*.

Cuando la RUV estaba presente se producía una caída del contenido interno de FE, FC y, en consecuencia, FB a los 3 días de cultivo, al igual que ocurría con las variables anteriores. Pero en estos casos continuó la caída hasta el final del experimento ($p < 0.05$) (figura V.2.13.A,B). También se produjo una caída significativa de las ficobiliproteínas a los 6 días de cultivo

incluso cuando la RUV no estaba presente ($p < 0.05$). La relación FE/FC a los 6 días de cultivo cayó significativamente en el tratamiento al que no se adicionó cloruro amónico y se incrementó cuando había amonio en el cultivo ($p < 0.05$) (figura V.2.13.C). Dicho incremento fue superior cuando la RUV no estaba presente.

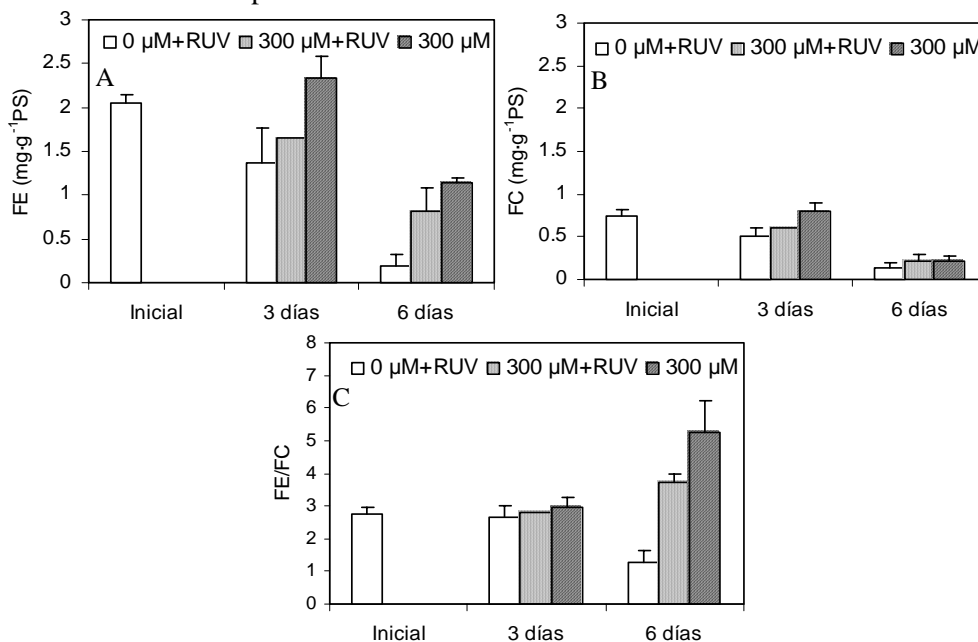


Figura V.2.13. Concentración de FE (A), FC (B) y relación FE/FC (C) tras 3 y 6 días de cultivo a los tratamientos 0 μM de cloruro amónico+RUV, 300 μM de cloruro amónico+RUV y 300 μM de cloruro amónico sin RUV para *P. leucosticta*.

Contenido de MAAs:

El contenido de MAAs se incrementó significativamente en los tratamientos en los que estaba presente la RUV, el incremento se produjo ya a los 3 días de cultivo cuando se adicionaba amonio al medio y se desplazó a los 6 días de cultivo cuando no se suplementó el medio con nitrógeno inorgánico ($p < 0.05$). Cuando no estaba presente la RUV no se observaron diferencias a lo largo del periodo de experimentación ($p > 0.05$) (figura V.2.14).

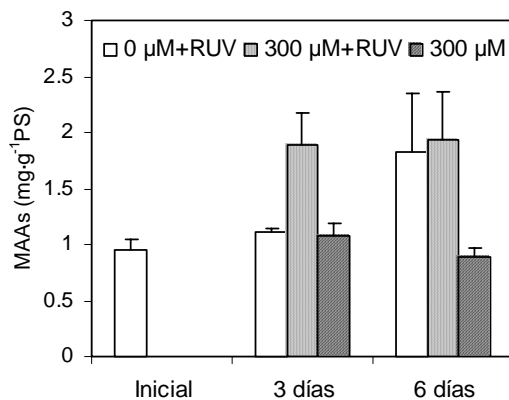


Figura V.2.14. Concentración de MAAs tras 3 y 6 días de cultivo a los tratamientos 0 μM de cloruro amónico+RUV, 300 μM de cloruro amónico+RUV y 300 μM de cloruro amónico sin RUV para *P. leucosticta*.

V.3. Efecto combinado de la RUV y la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la acumulación de MAAs y en el estado fotosintético de *P. umbilicalis*.

V.3.1. Diseño experimental:

V.3.1.1. Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.

Los talos empleados para este experimento fueron recolectados el 15 de octubre de 2002 y se mantuvieron durante dos semanas en precultivo a $10\pm 2^\circ$ C en cilindros de vidrio (PYREX), empleando agua de mar artificial (Marinemix hw-Professional) a 35‰ con adición de fosfato ($10\ \mu\text{M}$) y sin adición de nitrógeno, con burbujeo de aire constante y en $40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR (lámparas fluorescentes Osram) con un fotoperiodo de 16h luz:8h oscuridad. Se cambió el medio cada 6 días durante el precultivo. Se cortaron discos de 1.2 cm de diámetro. El experimento se llevó a cabo en recipientes de vidrio (PYREX 1 L) en la cámara de cultivo a 15° C bajo un fotoperiodo de 16:8. La irradiancia de cultivo en PAB fue de $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR (lámparas Osram), $9\ \text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVA y $0.55\ \text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ de UVB. La RUV se consiguió empleando 2 lámparas Q-Panel.

Durante una semana se cultivaron los discos de *P. umbilicalis* en tres recipientes PYREX 1 L con distintas concentraciones de cloruro amónico: 0, 100 y 300 μM , en cada uno de ellos. Los tres tratamientos estuvieron sometidos al mismo tratamiento lumínico PAB.

V.3.1.2. Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.

Paralelamente se cultivaron en otros tres recipientes PYREX los discos de *P. umbilicalis*, precultivados como se indicó en el primer párrafo del diseño experimental, en tres tratamientos lumínicos, PAB, PA y P. Las irradiancias fueron las mismas que se indicaron anteriormente, pero en el segundo tratamiento prescindimos de la radiación UVB y en el último de toda la RUV. En los tres tratamientos lumínicos se adicionó cloruro amónico hasta alcanzar una concentración de 300 μM .

En ambos casos se tomaron medidas al iniciar el experimento, a los 3 y a los 6 días de cultivo y se midió: rendimiento cuántico óptimo (PAM-2000), curvas TTE-E (Diving-PAM), crecimiento (M.11.1 material y métodos), pigmentos (clorofila *a* y ficobiliproteínas), proteínas solubles y estructurales, absortancia y MAAs.

V.3.2. Resultados:

V.3.2.1. Parte A: disponibilidad de nitrógeno inorgánico.

Respuesta fotosintética:

Al igual que ocurría en *P. columbina* y en *P. leucosticta*, en este caso también se produjo una caída del rendimiento cuántico óptimo a los 3 días de cultivo que se mantuvo hasta el final del experimento en los tratamientos de 0 y 100 μM de amonio ($p < 0.05$). Sin embargo, en *P. umbilicalis* no se observó caída del rendimiento en el tratamiento de 300 μM de cloruro amónico ($p > 0.05$) (figura V.3.1).

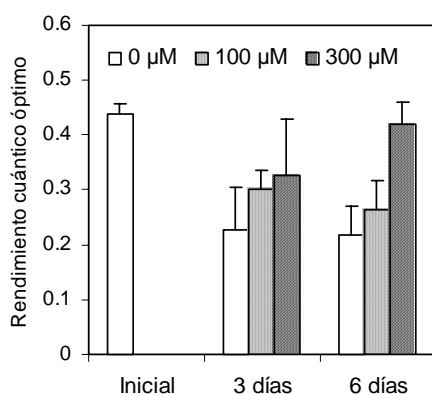


Figura V.3.1. Rendimiento cuántico óptimo al iniciar el experimento y tras los 3 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. umbilicalis*.

Tabla V.3.1. Ajuste de las curvas TTE-E (Jasbby y Platt, 1976). $\text{TTE}_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y pendiente inicial ($\mu\text{mol e}^{-}\cdot(\mu\text{mol fotones})^{-1}$) de la curva al iniciar y tras 3 y 6 de cultivo en los tratamientos de 0, 100 y 300 μM de cloruro amónico para *P. umbilicalis*. Las distintas letras en los tratamientos de amonio indican que la $\text{TTE}_{\text{máx}}$ o la pendiente son distintas para un día concreto ($p < 0.05$).

		TTE_{máx}	Pendiente
Inicial		9.70±0.90	0.11±0.04
3 días	0 μM	6.23±0.83 ^a	0.04±0.01 ^a
	100 μM	5.75±1.89 ^a	0.06±0.01 ^a
	300 μM	7.78±1.37 ^a	0.09±0.01 ^b
6 días	0 μM	13.01±3.27 ^a	0.02±0.00 ^a
	100 μM	30.17±5.82 ^b	0.06±0.02 ^b
	300 μM	37.11±5.14 ^b	0.10±0.02 ^c

A los 6 días de cultivo se produjo un incremento en la $\text{TTE}_{\text{máx}}$ en los tratamientos en los que se adicionó nitrógeno inorgánico ($p < 0.05$). La pendiente inicial de la curva no cambió a lo largo del experimento en los tratamientos de 100 y 300 μM , sin embargo, se produjo una caída

significativa de la pendiente a los 3 días de cultivo en el tratamiento al que no se adicionó cloruro amónico ($p < 0.05$) (tabla V.3.1).

Crecimiento:

En *P. umbilicalis*, al igual que en *P. columbina*, se observó después de los 6 días de cultivo una TRC mayor en el tratamiento de 300 μM que en el que no se adicionó nitrógeno inorgánico ($p < 0.05$). Los valores de las tasas relativas de crecimiento ($\% \cdot \text{d}^{-1}$) a los 6 días de cultivo fueron: 4.20 ± 1.04 (0 μM), 6.37 ± 1.03 (100 μM) y 7.71 ± 2.00 (300 μM).

Contenido pigmentario (clorofila a y ficobiliproteínas):

A los 6 días de cultivo la concentración de clorofila *a* fue significativamente superior en 300 μM de cloruro amónico que en 0 μM ($p < 0.05$) (figura V.3.2).

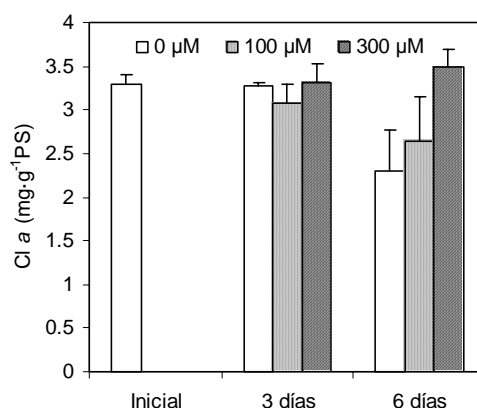


Figura V.3.2. Concentración de clorofila *a* al iniciar el experimento y tras los 3 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. umbilicalis*.

Se produjo una caída significativa del contenido de FE a los 6 días de cultivo en el tratamiento al que no se adicionó cloruro amónico ($p < 0.05$). En los demás casos no se detectaron diferencias significativas en el contenido de FE ($p > 0.05$) (figura V.3.3.A). La caída del contenido de FC fue significativa en los tratamientos de 0 y 100 μM de cloruro amónico a los 6 días de cultivo ($p < 0.05$) (figura V.3.3.B). La relación FE/FC a los 6 días de cultivo fue significativamente superior en el tratamiento de 0 μM que en 100 μM y en 300 μM de cloruro amónico ($p < 0.05$) (figura V.3.3.C).

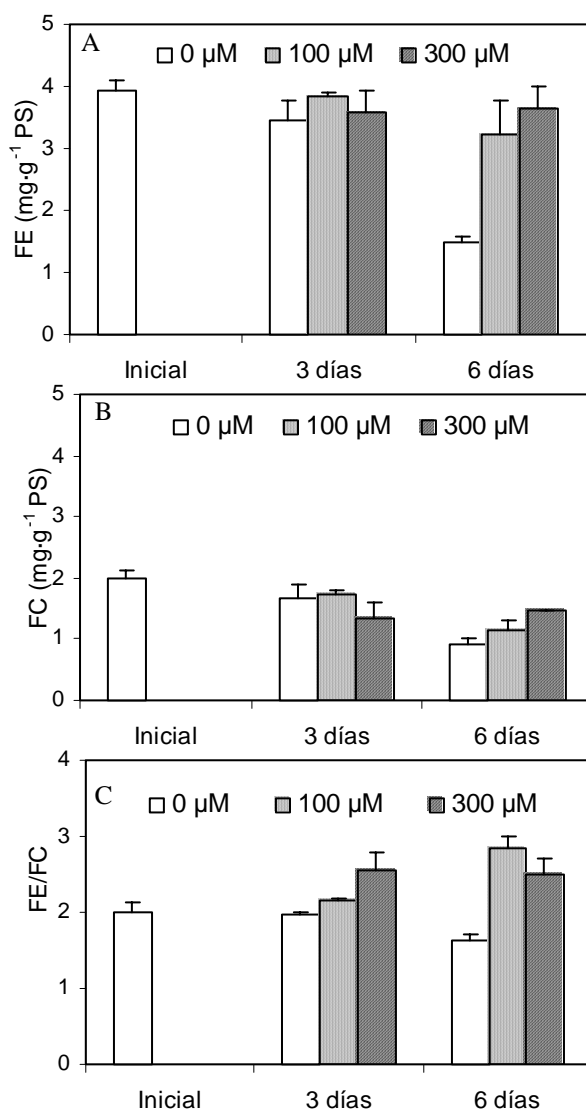


Figura V.3.3. Contenido en FE (A), FC (B) y relación FE/FC (C) al iniciar el experimento y tras los 3 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 µM) para *P. umbilicalis*.

Contenido de proteínas solubles e estructurales:

Al igual que en *P. leucosticta*, en *P. umbilicalis* cayó el contenido de proteínas solubles en los tratamientos de 0 y 100 µM, pero esta caída era ya significativa a los 3 días de cultivo en 0 µM ($p < 0.05$). Tampoco en *P. umbilicalis* se produjo cambios en la concentración en el tratamiento de 300 µM de cloruro amónico ($p > 0.05$) (figura V.3.4.A). A los 6 días de cultivo se observó que el contenido de proteínas estructurales era significativamente inferior en 0 µM que en 300 µM de amonio, aunque las diferencias fueron inferiores que para proteínas solubles ($p < 0.05$) (figura V.3.4.B).

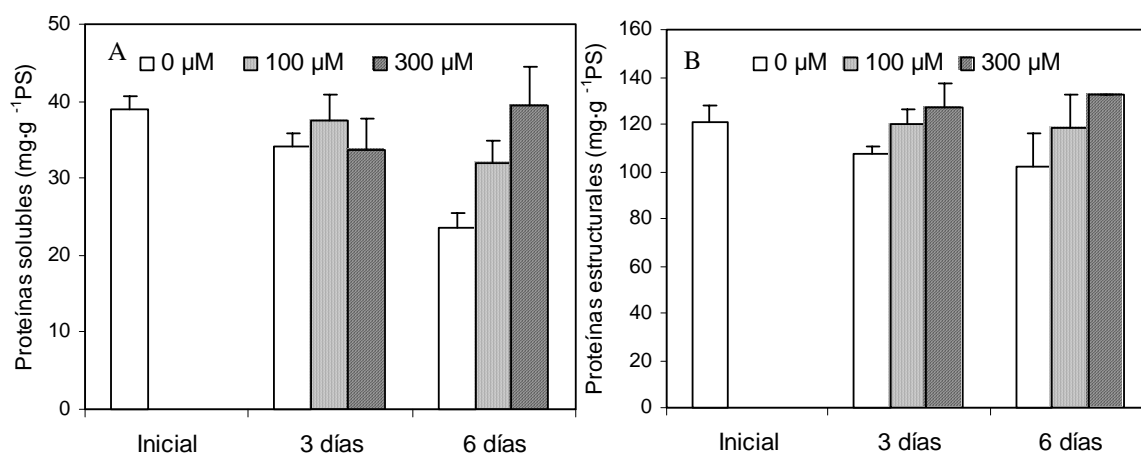


Figura V.3.4. Contenido en proteínas solubles (A) y proteínas estructurales (B) al iniciar el experimento y tras los 3 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. umbilicalis*.

Absortancia:

El comportamiento y también los valores de absortancia en *P. umbilicalis* fueron los mismos que en *P. columbina*. Se produjo una caída significativa a los 6 días de cultivo en el tratamiento al que no se adicionó cloruro amónico, de manera que la absortancia fue significativamente inferior que en los otros dos tratamientos ($p < 0.05$) (figura V.3.5).

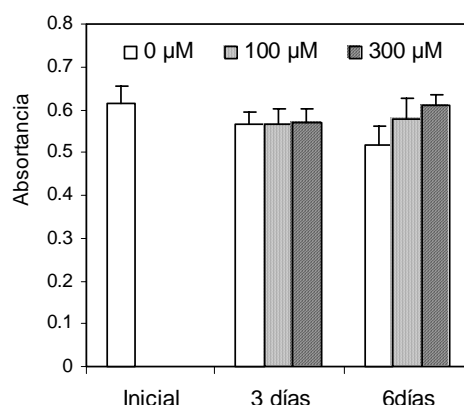


Figura V.3.5. Absortancia de los discos al iniciar el experimento y tras los 3 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. umbilicalis*.

Contenido de MAAs:

El contenido total de MAAs estuvo formado por un 90% porphyrina-334 y un 9% de shinorine, también se detectó una pequeña cantidad de palythine y asterina-330. Estas proporciones relativas no variaron a lo largo del periodo de experimentación. Tampoco el contenido total de MAAs varió en ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$), al contrario que ocurría en las otras dos especies de *Porphyra*. Pero a los 6 días de cultivo el contenido de MAAs en 0 μM de amonio fue significativamente inferior que en 300 μM ($p < 0.05$) (figura V.3.6).

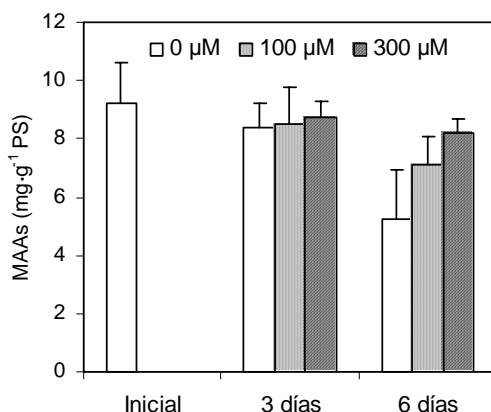


Figura V.3.6. Contenido en MAAs al iniciar el experimento y tras los 3 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. umbilicalis*.

Relaciones pigmentarias:

Al contrario de lo que ocurría con las otras especies de *Porphyra*, en *P. umbilicalis* no se observó ningún cambio significativo en las relaciones FB/PtS, FB/Cl *a*, MAAs/Cl *a* ni en MAAs/FB ($p > 0.05$) (figura V.3.7.A,B,C,D).

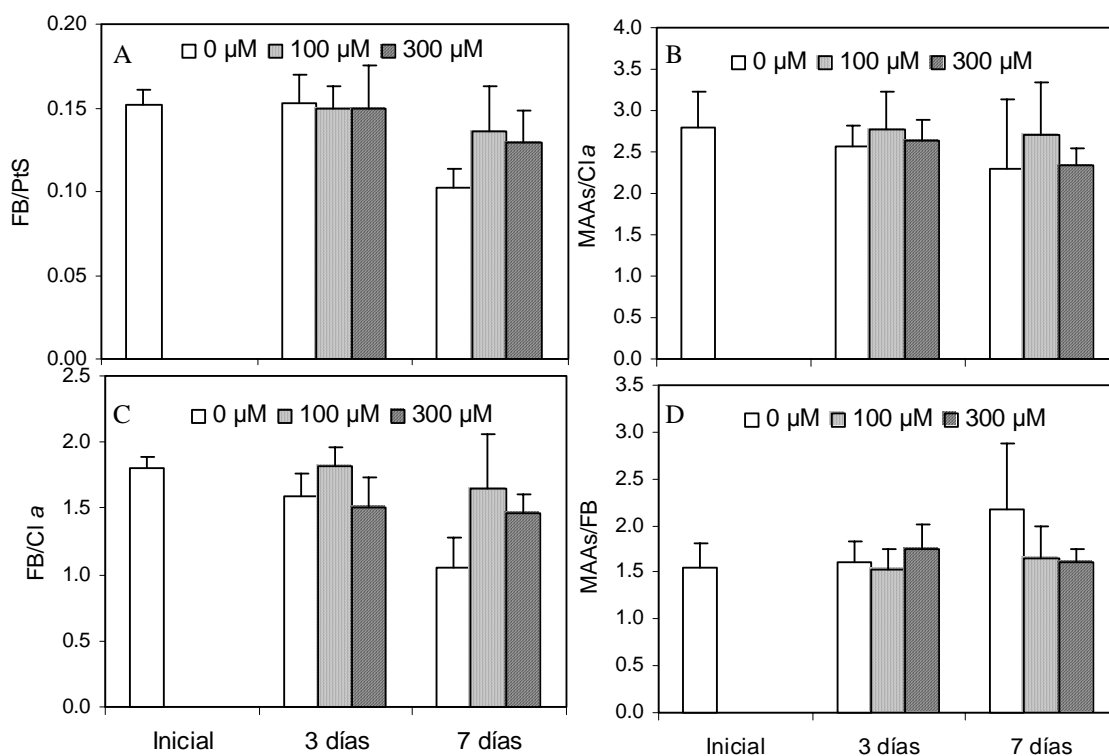


Figura V.3.7. Relaciones FB/PS (A), MAAs/Cl *a* (B), FB/Cl *a* (C) y MAAs/FB (D) al iniciar el experimento y tras los 3 y 6 días de cultivo a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μM) para *P. umbilicalis*.

Correlaciones:

Tabla V.3.2. Coeficientes de correlación de Pearson para las variables y parámetros indicados para el cultivo de *P. umbilicalis* a tres concentraciones de cloruro amónico (0, 100 y 300 μ M). ** Correlación significativa $p < 0.01$, * Correlación significativa $p < 0.05$ (n=7).

	TTE _{máx}	α	F _v /F _m	a	Cl a	FB	PtS	PEST	A
α	0.270								
F _v /F _m	0.283	0.937**							
a	0.854*	0.010	0.000						
Cl a	-0.009	0.747	0.681	-0.100					
FB	-0.159	0.687	0.621	-0.291	0.850*				
PtS	0.124	0.778*	0.778*	-0.035	0.873*	0.938**			
PEST	0.434	0.869*	0.786*	0.396	0.697	0.601	0.746		
A	0.385	0.907**	0.876**	0.054	0.775*	0.783*	0.891**	0.771*	
MAAs	-0.232	0.740	0.637	-0.349	0.896**	0.974**	0.889**	0.627	0.758*

Entre las correlaciones significativas cabe destacar que el rendimiento cuántico óptimo se correlacionó positivamente con la eficiencia fotosintética, y ambos se correlacionaron positivamente con el contenido de proteínas y con la absorbancia. Y la concentración de MAAs se correlacionó positivamente con el contenido pigmentario, de proteínas solubles y también con la absorbancia de los talos (tabla V.3.2).

V.3.2.2. Parte B: RUV/PAR+nitrógeno inorgánico.

Respuesta fotosintética:

A los 3 días de experimentación se produjo una caída significativa del rendimiento cuántico óptimo respecto al inicial en todos los tratamientos, en los tratamientos PAB y PA este valor se mantuvo hasta el final del experimento, sin embargo, en P se recuperó alcanzándose de nuevo el valor inicial ($p < 0.05$) (figura V.3.8).

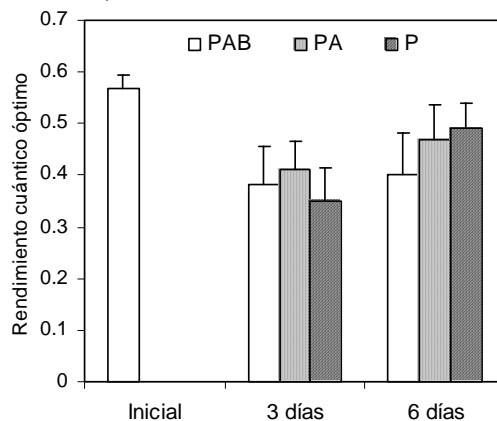


Figura V.3.8. Rendimiento cuántico óptimo al inicio y después de 3 y 6 días de exposición a los tratamientos lumínicos PAB, PA y P para *P. umbilicalis*.

Tabla V.3.3. Ajuste de las curvas TTE-E (Jasby y Platt, 1976). $TTE_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y pendiente inicial ($\mu\text{mol e}^{-}\cdot(\mu\text{mol fotones})^{-1}$) de la curva al iniciar y tras 3 y 6 de cultivo en los tratamientos PAB, PA y P para *P. umbilicalis*. Las distintas letras en los tratamientos lumínicos indican que dentro del día (3 ó 6), la $TTE_{m\acute{a}x}$ o la pendiente son distintas ($p<0.05$).

		$TTE_{m\acute{a}x}$	Pendiente
Inicial		13.93±1.60	0.14±0.01
3 días	PAB	9±0.54 ^a	0.12±0.02 ^a
	PA	13.38±2.20 ^a	0.14±0.01 ^a
	P	9.03±1.18 ^b	0.09±0.01 ^b
6 días	PAB	33.95±3.82 ^a	0.09±0.01 ^a
	PA	34.65±8.37 ^a	0.12±0.02 ^{a,b}
	P	39.84±4.84 ^a	0.13±0.01 ^b

En el tratamiento PAB se observó una caída significativa de la $TTE_{m\acute{a}x}$ a los 3 días y una posterior recuperación, superándose significativamente a los 6 días de cultivo el valor inicial ($p<0.05$). La pendiente fue significativamente inferior a los 6 días que al iniciar el experimento ($p<0.05$). En el tratamiento PA no se observaron diferencias significativas en el tiempo para el valor de $TTE_{m\acute{a}x}$ ($p>0.05$), sin embargo se observó una caída significativa de la pendiente a los 6 días ($p<0.05$). El valor de $TTE_{m\acute{a}x}$ en el tratamiento P se incrementó significativamente a los 6 días y la pendiente cayó significativamente a los 3 días, pero se recuperó a los 6 días de experimentación ($p<0.05$) (tabla V.3.3).

Contenido pigmentario (clorofila *a* y ficobiliproteínas):

La clorofila *a* no varió significativamente respecto al inicial en los tratamientos PAB ni PA ($p>0.05$), únicamente en el tratamiento P se observó un incremento significativo de la concentración después de los 6 días de cultivo ($p<0.05$) (figura V.3.9).

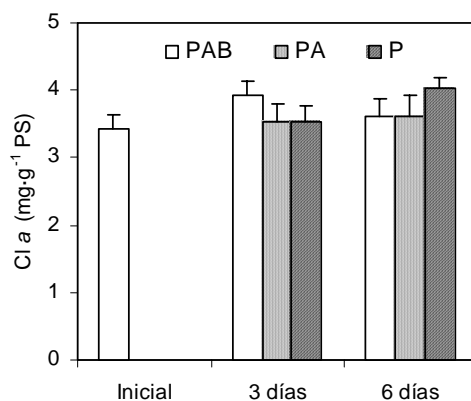


Figura V.3.9. Concentración de clorofila *a* al inicio y después de 3 y 6 días de exposición a los tratamientos lumínicos PAB, PA y P para *P. umbilicalis*.

La concentración interna de FE, de FC y, en consecuencia, de FB no varió significativamente a lo largo del periodo de experimentación en ninguno de los tratamientos lumínicos ($p > 0.05$). La concentración de FE se mantuvo en torno a $5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$ y la de FC en torno a $2.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$ (datos no mostrados). A los 6 días de cultivo la relación FE/FC se incrementó significativamente en el tratamiento lumínico P ($p < 0.05$) (figura V.3.10).

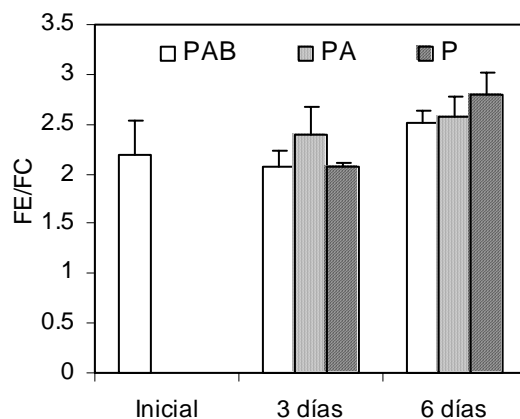


Figura V.3.10. Relación FE/FC al inicio y después de 3 y 6 días de exposición a los tratamientos lumínicos PAB, PA y P para *P. umbilicalis*.

Contenido de MAAs:

El contenido en MAAs no varió significativamente a lo largo de los días de experimentación entre tratamientos, ni con respecto al valor inicial, se mantuvo en torno a $9.1 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$ ($p > 0.05$) (figura V.3.11). El total estaba compuesto por un 90% aproximadamente de porphyra-334, un 9% de shinorine y una pequeñísima cantidad de palythine y asterina-330. El porcentaje de los MAAs individuales no varió a lo largo del experimento, por lo que se muestra en la figura la concentración total ($p > 0.05$).

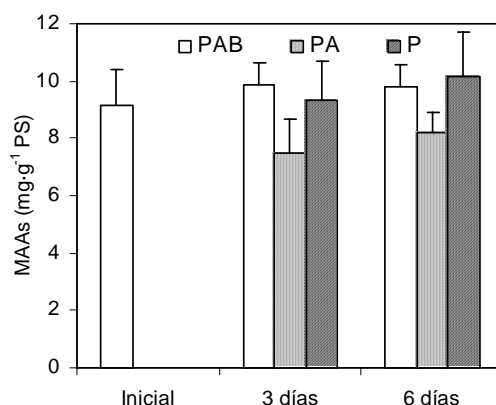


Figura V.3.11. Concentración de MAAs al inicio y después de 3 y 6 días de exposición a los tratamientos lumínicos PAB, PA y P para *P. umbilicalis*.

V.4. Síntesis de los resultados del capítulo.

En las tablas siguientes se recogen las IBE ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) calculadas a partir del espectro de acción para la fotosíntesis de *P. perforata* (Fork, 1963) y a partir del espectro de acción estimado para la inhibición de la fotosíntesis de cloroplastos aislados de espinaca ($\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$) (Jones y Kok, 1966). También se recogen las DBE ($\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$) para los tiempos en los que se realizó el muestreo para cada una de las especies de *Porphyra* estudiadas (tablas V.4.1 y V.4.2).

Tabla V.4.1. IBE para la fotosíntesis en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fork, 1963) y para la fotoinhibición en $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ (Jones y Kok, 1966) para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

IBE	<i>P. columbina</i>		<i>P. leucosticta</i>		<i>P. umbilicalis</i>	
	Fork	Jones y Kok	Fork	Jones y Kok	Fork	Jones y Kok
	203	5.2	210	5.2	101	3.2

Tabla V.4.2. DBE ($\text{KJ}\cdot\text{m}^{-2}$) en los tiempos de muestreo para cada una de las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

DBE	<i>P. columbina</i>		<i>P. leucosticta</i>		<i>P. umbilicalis</i>	
	Fork	Jones y Kok	Fork	Jones y Kok	Fork	Jones y Kok
2 ó 3 días	4446	524	5922	675	3801	552
6 ó 7 días	13338	1572	13818	1572	7602	1104

Con el fin de visualizar más fácilmente las diferencias entre los resultados obtenidos en este capítulo para las tres especies de *Porphyra*, se recogen en las tablas V.4.3-10 algunos de los datos de la parte A (disponibilidad de nitrógeno inorgánico).

La primera fila de cada tabla representa el valor inicial para la variable o parámetro. La segunda y tercera fila representan la diferencia entre el valor en una de las concentraciones, 50/100 μM y 300 μM de amonio, respectivamente, y el valor en ausencia de dicho compuesto tras los 6 días de experimentación.

Tabla V.4.3. $\text{TTE}_{\text{máx}}$ y pendiente inicial de las curvas TTE-E (Diving-PAM) para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>		<i>P. leucosticta</i>		<i>P. umbilicalis</i>	
	$\text{TTE}_{\text{máx}}$	α	$\text{TTE}_{\text{máx}}$	α	$\text{TTE}_{\text{máx}}$	α
Inicial	11	0.09	10.2	0.05	9.7	0.11
50/100 μM -0 μM	2.8	0.01	6.6	0.03	17.2	0.04
300 μM -0 μM	19.4	0.05	12.7	0.06	24.1	0.08

Tabla V.4.4. Rendimiento cuántico óptimo para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial	0.55	0.68	0.44
50/100 μM -0 μM	0.07	0.00	0.04
300 μM -0 μM	0.06	0.09	0.20

Tabla V.4.5. Tasa relativa de crecimiento (TRC) para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Área inicial (cm^2)	1.1	1.1	1.1
50/100 μM -0 μM	5.3	1.8	2.2
300 μM -0 μM	8.7	1.1	3.5

Tabla V.4.6. Contenido de clorofila *a* para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial	1.1	1.9	3.3
50/100 μM -0 μM	-0.2	0.6	0.3
300 μM -0 μM	-0.2	1.1	1.2

Tabla V.4.7. Contenido de ficoeritrina y ficocianina para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>		<i>P. leucosticta</i>		<i>P. umbilicalis</i>	
	FE	FC	FE	FC	FE	FC
Inicial	1.9	1.6	6.1	3.5	3.9	2
50/100 μM -0 μM	0.5	0.2	1.5	0.3	1.7	0.2
300 μM -0 μM	1.4	0.5	4.0	1.0	2.2	0.5

Tabla V.4.8. Contenido de proteínas solubles para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial		40.7	39.1
50/100 μM -0 μM	No se analizaron	10.7	8.23
300 μM -0 μM		34.3	15.9

Tabla V.4.9. Contenido de MAAs para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial	5.5	7	9.2
50/100 μM -0 μM	1.2	0.9	1.9
300 μM -0 μM	5.1	5.4	2.9

Tabla V.4.10. Absortancia para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial	0.53	0.32	0.61
50/100 μM -0 μM	0.05	0.08	0.06
300 μM -0 μM	0.09	0.18	0.09

En las tablas V.4.11-14 se recopilan los resultados para las relaciones pigmentarias de las tres especies del género *Porphyra*. Se representa en la primera fila el valor inicial, y en las siguientes, los valores de la relación para cada una de las concentraciones de amonio después de los 6 días de cultivo.

Tabla V.4.11. Relación ficobiliproteínas/clorofila *a* para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial	3.24±1.22	5.06±1.57	1.8±0.1
0 µM	0.49±0.14	1.21±0.19	1.05±0.22
50/100 µM	1.97 ±1.28	1.79±0.37	1.64±0.42
300 µM	4.67±1.87	2.89±0.87	1.46±0.14

Tabla V.4.12. Relación ficobiliproteínas/proteínas solubles para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial		0.24±0.03	0.15±0.01
0 µM		0.06±0.01	0.1±0.01
50/100 µM		0.09±0.01	0.14±0.03
300 µM		0.11±0.04	0.13±0.02

Tabla V.4.13. Relación MAAs/clorofila *a* para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial	5.08±1.26	3.69±1.42	2.8±0.44
0 µM	5.12±1.50	4.03±0.74	2.29±0.85
50/100 µM	9.68±4.79	3.09±0.56	2.7±0.64
300 µM	18.27±3.77	4.41±0.62	2.34±0.19

Tabla V.4.14. Relación MAAs/ficobiliproteínas para las tres especies de *Porphyra* estudiadas.

	<i>P. columbina</i>	<i>P. leucosticta</i>	<i>P. umbilicalis</i>
Inicial	1.57±0.6	0.73±0.17	1.56±0.24
0 µM	10.38±2.93	3.34±0.61	2.17±0.7
50/100 µM	4.92±2.12	1.72±0.25	1.64±0.36
300 µM	3.91±1.45	1.53±0.42	1.6±0.15

V.5. Discusión.

Los datos que se han obtenido en estos experimentos revelan que no sólo la calidad y cantidad de energía recibida en el cultivo influyen en la síntesis y acumulación de MAAs (Karsten *et al.*, 1998b; Franklin *et al.*, 2001), sino que también influye la disponibilidad de amonio en el medio de cultivo, al ser los MAAs compuestos que poseen nitrógeno en su estructura química. Una concentración alta de cloruro amónico incrementó el contenido de MAAs en *P. columbina* y en *P. leucosticta*, sin embargo, no se observó incremento alguno en la concentración de MAAs en *P. umbilicalis* después de la adición de nitrógeno inorgánico al cultivo. Quizá debido a que la concentración inicial de MAAs en esta especie era superior, ya que a pesar de que no se observó un incremento cuando se cultivaban los discos con 300 μM de amonio, sí se observaron diferencias entre este tratamiento y aquel en el que no se adicionaba nitrógeno inorgánico. Podemos sugerir que las células de *P. umbilicalis* poseían ya en un inicio la máxima concentración que pueden alcanzar; esta misma explicación fue la que dieron algunos autores cuando observaron en esta misma especie que no acumulaba mayores cantidades de MAAs en presencia de RUV (Gröniger *et al.*, 1999), al igual que en *Bangia atropurpurea* al no observar paralelismo entre los picos de RUV durante un ciclo estacional y el contenido de MAAs (Karsten y West, 2000). En ausencia de amonio, las células de *P. leucosticta* disminuyeron el contenido interno de MAAs a medida que avanzaba el cultivo. Se ha descrito que durante la fase de limitación de nitrógeno se mantiene el crecimiento gracias al consumo de las reservas nitrogenadas, entre ellas los aminoácidos (Mizuta *et al.*, 1994), ya que entre los aminoácidos se encuentran los MAAs, se podría pensar que también estarían siendo consumidos para suplir el déficit de nitrógeno.

Respecto a la composición de MAAs, únicamente se encontraron diferencias durante el cultivo en *P. leucosticta*, en la que el contenido de MAAs se correlacionó positivamente con el porcentaje de shinorine. Se favorecía la acumulación de shinorine conforme aumentaba tanto el amonio en el medio de cultivo como el contenido interno de MAAs, se podría pensar que al tratarse del primer MAA en la ruta de síntesis se acumularía gracias a que la síntesis de MAAs se veía favorecida bajo estas condiciones de cultivo. Por otro lado, a pesar de que al igual que en capítulos anteriores se determinó el mismo tipo de correlación entre los diferentes MAAs, no se evidencia que se estuviesen produciendo las reacciones de interconversión desde shinorine hacia palythine y asterina-330, como ocurría en luz azul o a altas dosis de radiación, a pesar de que también se estaba iluminando los cultivos con altas irradiancias de PAR y RUV. Incluso se podría pensar observando la figura V.2.9 que el contenido de palythine y asterina-330 disminuía a medida que se incrementaba el suplemento de amonio, pero no es cierto, puesto que al ser la concentración de MAAs superior, si se calcula la concentración de estos últimos MAAs se

observa que se mantenían invariantes. Probablemente en las otras dos especies de *Porphyra* no se observe dicho comportamiento puesto que las proporciones relativas de palythine y asterina-330 eran muy bajas desde el inicio del experimento.

También resulta interesante el que la estimulación de MAAs tras añadir una alta concentración de nutrientes al medio de cultivo, se producía siempre que los talos hubiesen crecidos en condiciones deficitarias de nitrógeno; y además, también dependía de si los talos estaban o no expuestos a la RUV. La incorporación de nitrógeno es más rápida en el alga cuando los talos han crecido en hambre de nitrógeno, López-Figueroa (1993) observó una mayor asimilación de este nutriente en los talos de *C. elongata* crecidos con limitación de nitrógeno frente a aquellos con un contenido nitrogenado superior. En presencia de RUV la estimulación de la acumulación de MAAs era superior, aunque de nuevo, no se detectó dicho incremento en *P. umbilicalis*, probablemente debido también a la alta concentración inicial de MAAs en los talos. *P. leucosticta* crecida en laboratorio a partir de monosporas, se caracterizaba por poseer una concentración de MAAs del orden de 9 veces inferior que los talos recolectados en el campo. En aquellos talos se observaba que incluso cuando en el medio no había nitrógeno inorgánico disponible y sí RUV, se movilizaban otros compuestos para proporcionar los intermediarios de la síntesis de MAAs, ya que se incrementaban en un 48%, mientras que disminuían otros compuestos nitrogenados como las ficobiliproteínas y la clorofila.

Tal y como hemos indicado, el incremento de MAAs fue función de la calidad espectral de la radiación recibida, en *P. columbina* la radiación UVA fue la más efectiva en términos de estimulación de la acumulación (se observó un incremento del 29%), mientras que la radiación UVB fue la menos efectiva (un 5% de incremento), las muestras expuestas a radiación PAR exclusivamente mostraron un incremento medio de concentración respecto a los casos anteriores (concretamente un 16%). El que se incrementase el contenido interno de MAAs en presencia de PAR, sin RUV, ha conducido a ciertos autores a proponer que la inducción de MAAs estaba regulada por los fotones absorbidos por los pigmentos fotosintéticos que superaban la capacidad bioquímica de la célula para procesar la energía (Moisan y Mitchell, 2001). Por lo tanto, debe existir un proceso de retroalimentación desde el aparato fotosintético hacia las rutas bioquímicas que regulan la expresión genética de las enzimas que intervienen en la síntesis de MAAs. De este modo, la acumulación de MAAs dependería de la estimulación y/o inhibición de estas rutas metabólicas (Moisan y Mitchell, 2001). La radiación UVA poseía un efecto inductor en la acumulación de MAAs en dinoflagelados (Carreto *et al.*, 1990b) y también en *C. crispus* (Franklin *et al.*, 2001). Sin embargo, los MAAs se sintetizaban en respuesta a la radiación UVA+UVB en *Stylophora pistillata*, y no en presencia de UVA únicamente (Shick *et al.*, 1999). Y en presencia de sólo radiación UVB en cianobacterias (Sinha *et al.*, 2001). Como la radiación

PAR y la RUV covarían en la naturaleza, Moisan y Mitchell (2001) continuaban explicando la posible inducción de los MAAs según el mecanismo al que se apuntó anteriormente. Aunque la síntesis de shinorine no dependía directamente de la fotosíntesis, al menos en experimentos de 7 días de duración, ya que este MAA se acumulaba incluso en ausencia de PAR (Karsten *et al.*, 1998a). En los resultados obtenidos en este capítulo, a pesar de que en *P. columbina* se incrementaba la concentración de MAAs cuando la RUV no estaba presente en el cultivo y siempre y cuando se adicionase cloruro amónico al medio, en los talos de *P. leucosticta* crecidos a partir de monosporas, no se observó dicho incremento en presencia de PAR sin RUV.

Nos planteamos si los MAAs estaban interviniendo bajo estas condiciones de cultivo como sustancias fotoprotectoras frente a la RUV. En principio, se observó una correlación positiva entre el contenido interno de MAAs en los talos y las $TFB_{m\acute{a}x}$, $TTE_{m\acute{a}x}$, eficiencia fotosintética y/o rendimientos cuánticos de fluorescencia. Y la actividad fotosintética no se veía afectaba en los talos que no estaban expuestos a la RUV. La limitación de nitrógeno incrementa la sensibilidad de la fotosíntesis ante la inhibición por la RUV en dinoflagelados, el principal mecanismo que intervenía en este incremento de sensibilidad era la menor eficiencia en la reparación, además del menor tamaño celular y de la menor concentración de MAAs (Litchman *et al.*, 2002). En las comunidades del microfitobentos también se observó que la limitación de nitrógeno incrementaba la sensibilidad ante la RUV (Wulff *et al.*, 2000). Para la reparación del daño provocado por la RUV se emplean varios mecanismos, mucho de los cuales necesitan del nitrógeno para la síntesis de enzimas o cofactores proteicos (Roy, 2000). La mayor concentración de MAAs en el tratamiento de 300 μ M de cloruro amónico podría explicar la menor inhibición del aparato fotosintético debido a la RUV, de manera que el alga podía incluso disminuir su contenido interno de clorofila en *P. columbina* y mantener aún así el rendimiento fotosintético. Aunque hay que tener en cuenta, que la disminución de la sensibilidad frente a la RUV no sólo se debería al incremento de MAAs, puesto que tal y como apuntaron los anteriores autores, los mecanismos de reparación también estarían más activos en los talos cultivados con mayor cantidad de nitrógeno inorgánico, además de poseer más cantidad de otros compuestos nitrogenados (como ficobiliproteínas y proteínas en general).

En un estudio que se realizó en dos especies de algas rojas del Ártico se determinó que aunque en ambas se acumulaban MAAs como respuesta a una exposición a RUV, sólo en *Devaleraea ramentacea*, y no en *Palmaria palmata*, existía una correlación directa entre el incremento de MAAs y la disminución de la sensibilidad fotosintética bajo RUV (Karsten *et al.*, 2003). Las mayores caídas del rendimiento cuántico óptimo se produjeron en *P. umbilicalis*, a pesar de que fue la especie que menor dosis de radiación recibió y de ser la de mayor contenido interno de MAAs. Al igual que ocurría en las tres especies de *Porphyra*, se ha descrito en la

literatura que los cultivos de fitoplancton presentaban mayores rendimientos cuánticos óptimos en presencia de nitrógeno que en ausencia de este nutriente, independientemente de la irradiancia del cultivo (Parkhill *et al.*, 2001). La reducción del rendimiento cuántico óptimo la relacionaron con la pérdida de la proteína D1 en condiciones de limitación de nitrógeno (Geider *et al.*, 1993). La fotosíntesis máxima caía en términos de área en algas crecidas en alta irradiancia, pero sólo en aquellas que tenían limitación de nitrógeno. En condiciones de luz limitante, la fotosíntesis máxima en *U. rotundata* disminuyó no sólo en términos de área, sino también en términos de nitrógeno, de manera que podría indicar que los componentes de la cadena de transporte de electrones limitaban las tasas de fotosíntesis máximas (Pérez-Lloréns *et al.*, 1996).

El origen de los MAAs parece estar en la ruta del ácido chiquímico, aunque en macroalgas aún no se ha demostrado. Debido a que esta ruta está unida funcionalmente a la fotosíntesis (Bentley, 1990) se podría sugerir que el mayor rendimiento fotosintético que se observó en el tratamiento de 300 μM de cloruro amónico pudiera estar relacionado con una mayor síntesis de anillos de ciclohexenimina para los MAAs. Se ha descrito que la síntesis de MAAs se produce cuando hay una elevada capacidad fotoquímica, para así proveer de los precursores necesarios para la síntesis siguiendo la ruta del ácido chiquímico (Zudaire y Roy, 2001). Además debido a que el medio de cultivo era rico en componentes nitrogenados se permitiría la inclusión de los restos nitrogenados al anillo en un paso posterior en la síntesis. Este proceso podría derivar en un mecanismo de retroalimentación positivo permitiendo un mejor funcionamiento del aparato fotosintético y un mayor crecimiento de las especies de *Porphyra*. Sin embargo, a pesar de que se ha demostrado que el empleo de inhibidores de la fotosíntesis implican también una disminución del contenido interno de MAAs en dinoflagelados (Carreto *et al.*, 1990b), la luz blanca estimulaba la biosíntesis de MAAs desproporcionadamente con respecto al incremento en la tasa fotosintética (Neale *et al.*, 1998). Además ya se apuntó anteriormente que se ha descrito la síntesis de shinorine, incluso en ausencia de PAR (Karsten *et al.*, 1998a). Por lo tanto, aunque en este capítulo se haya encontrado una relación positiva entre la fotosíntesis y el contenido de MAAs, únicamente se puede sugerir que dicha relación no es completa.

Se ha sugerido que las ficobiliproteínas tienen dos funciones, pigmentos accesorios y proteínas de reserva (Algarra y Rüdiger, 1993; Tandeau de Marsac y Houmard, 1993). En este estudio, las relaciones entre pigmentos accesorios y la clorofila *a* se incrementaron con la adición de nitrógeno, y esto en microfitobentos marino era indicativo de una limitación de nutrientes en el tratamiento no enriquecido (Wulff *et al.*, 2000). La mayor movilización de amonio se producía hacia las ficobiliproteínas principalmente, aunque también hacia los MAAs (se refleja en que la relación MAAs/FB está inversamente relacionada con la concentración de

amonio en el cultivo). En *P. leucosticta* no se observó variación alguna de la relación MAAs/Cl *a*, al contrario de lo que ocurría en la especie anterior, de hecho se observó una correlación entre el contenido de clorofila *a* y de MAAs positiva, que también se determinó en *P. umbilicalis*. En condiciones de limitación de nitrógeno los dinoflagelados tendían a acumular preferentemente el nutriente limitante en las clorofilas que en los MAAs (Lichtman *et al.*, 2002). También se observó en *P. leucosticta* que el nitrógeno se movilizaba de manera más efectiva hacia las ficobiliproteínas que hacia los MAAs, puesto que la relación MAAs/FB variaba inversamente con la concentración de amonio. Los valores para esta relación no fueron tan elevados como para el caso de *P. columbina*, puesto que la concentración de ficobiliproteínas en *P. leucosticta* fue muy superior que en la especie anterior. En *P. umbilicalis* ninguna de las relaciones pigmentarias variaron a lo largo del cultivo.

La concentración tanto de clorofila como de ficobiliproteínas, se incrementa en algas rojas con suplementos de nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo (López-Figueroa y Niell, 1991). En las especies de *Porphyra* estudiadas se observó que el contenido pigmentario era mayor al suplementar el medio con amonio que en ausencia de este elemento. En *Gracilaria edulis* se observó un incremento en la concentración de clorofila *a*, de aminoácidos y de nitrógeno en los tejidos después de 3 días de cultivo en altas concentraciones de nitrógeno inorgánico (Costanzo *et al.*, 2000). Pero la acumulación dependía tanto de la calidad de la luz (Figueroa *et al.*, 1995b) como de la cantidad (Algarra y Niell, 1990). En *P. columbina* se observó una disminución de la concentración de clorofila cuando el medio se enriquecía con cloruro amónico en presencia de PAB. Figueroa y colaboradores (1997) observaron una disminución del contenido de clorofila *a* asociado a la presencia de RUV. Además la concentración de clorofila *a* disminuyó 5 veces cuando los cultivos de algas enriquecidos con nutrientes se transplantaban desde una irradiancia de 10 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de PAR (Goericke y Montoya, 1998). Debido a que la TRC era muy superior en los tratamientos a los que se adicionaba amonio en *P. columbina*, se puede sugerir la dilución del contenido de clorofila *a*, de manera que aunque se haya producido una pequeña síntesis en presencia de amonio, este resultado haya quedado enmascarado por la dilución del contenido ante un crecimiento tan marcado. Sin embargo, en las otras dos especies de *Porphyra* no se observaron cambios en la concentración de clorofila *a* a lo largo del cultivo para ninguno de los tratamientos, pero sí se observó que después del periodo de experimentación, la concentración de clorofila era superior tras el cultivo a 300 μM de cloruro amónico respecto al tratamiento que no se suplementó con nitrógeno inorgánico. La dilución del contenido de clorofila *a* era menor para estos dos últimos casos, puesto que el crecimiento también lo era. Se podría pensar que la reducción del contenido pigmentario en limitación de nutrientes actuaría como mecanismo regulador del aparato

fotosintético, para balancear la demanda de energía necesaria para el mantenimiento y crecimiento de los talos, que era inferior en dichas condiciones.

En las especies de *Porphyra* estudiadas se observaron mayores cambios en el contenido de FE, que en el de FC o de clorofila, y de nuevo en *P. columbina* se observó el efecto de la dilución del contenido debido a un mayor crecimiento, puesto que las diferencias de ficobiliproteínas observadas, sobre todo de FE eran inferiores, incluso tratándose de la ficobiliproteína que presentaba mayores cambios en los demás casos. En condiciones de limitación de nitrógeno, el contenido de ficobiliproteínas disminuyó tanto en cianobacterias (Boussiba y Richmond, 1980; Schenk *et al.*, 1983) como en algas rojas (Talarico y Maranzana, 2000), por el contrario, el suplemento de una alta concentración de nitrógeno provocó un rápido incremento de las ficobiliproteínas alcanzando aproximadamente un 30-40% del total de proteínas solubles en cianobacterias (Tandeau de Marsac y Houmard, 1993). La FE presenta una gran plasticidad en el ficobilisoma (Algarra y Rüdiger, 1993), ésta se desacopla rápidamente de los mismos en algas rojas (Aguilera *et al.*, 1999a; Talarico y Maranzana, 2000) y cianobacterias (Sinha *et al.*, 1995). Cuando los organismos estaban exentos de algún nutriente esencial los ficobilisomas son específicamente degradados (Aráoz y Häder, 1997). En *Gracilariopsis lemaneiformis* la FC se veía menos influenciada por la disponibilidad de nitrógeno que la FE (Vergara *et al.*, 1995). En ausencia de nitrógeno inorgánico se disminuiría el contenido de ficobiliproteínas, como consecuencia de la movilización de estos compuestos nitrogenados y también debido a la influencia de la RUV, tal y como ocurría en *Porphyra laciniata* (López-Figueroa, 1992). La proteólisis de las ficobiliproteínas, que alcanzaba en las especies de *Porphyra* estudiada alrededor de un 20% de las proteínas solubles, proporcionaría a las células los aminoácidos y microelementos necesarios para su supervivencia. Parece ser que la disponibilidad de nitrógeno inorgánico minimizaba el efecto deletéreo de la RUV en las ficobiliproteínas. Se reflejó además en la parte B del experimento para *P. umbilicalis*, sin embargo, en ausencia de RUV y en presencia de amonio en los talos de *P. leucosticta* crecidos a partir de monosporas, también se observaron caídas en las ficobiliproteínas, aunque las caídas se retardaban hasta el final del experimento.

En diferentes algas se observó una reducción de la concentración de clorofila y proteínas solubles, entre ellas la Rubisco, en condiciones de bajo nitrógeno (Beardall *et al.*, 1991; Wulff *et al.*, 2000). Cuando la deficiencia en nitrógeno era acusada, se reducía temporalmente la síntesis de Rubisco y/o la reparación del PSII, resultando en una caída de la fotosíntesis máxima y de la tasa de crecimiento en *Ulva rotundata* (Henley *et al.*, 1991b). El contenido de proteínas solubles también fue inferior en las especies de *Porphyra* cuando el medio de cultivo era deficitario en nitrógeno inorgánico. Concretamente en *P. umbilicalis* también se observó un

menor contenido de proteínas estructurales, aunque para este caso las diferencias eran menores que en proteínas solubles. De hecho está descrito en *Laminaria japonica* que la primera fase de limitación de nitrógeno se caracteriza porque el contenido de nitrógeno soluble es suficiente para la demanda metabólica, sin embargo, la última fase de limitación aguda se caracteriza por una disminución gradual del contenido de nitrógeno inorgánico (Mizuta *et al.*, 1994). En *Euglena* se degradaban preferentemente las proteínas del cloroplasto frente a las proteínas mitocondriales en condiciones de limitación de nitrógeno, de manera que proporcionaban los aminoácidos necesarios en el estrés nutricional o para que continuase la división celular (Coleman *et al.*, 1988). En las especies de *Porphyra* estudiadas, ocurría lo mismo que en *C. elongata* y *G. lemaneiformis*, en las que las proteínas solubles no pigmentadas (calculadas como la diferencia entre las proteínas solubles y las ficobiliproteínas) se veían menos afectadas por la limitación de nitrógeno, además cuando se suplementaba el medio con nitrógeno inorgánico, se producía la estimulación preferencial de las ficobiliproteínas (Vergara y Niell, 1993; Vergara *et al.*, 1995). Quizá durante la limitación de nitrógeno, los ARN_i del citosol estuviesen uniendo los aminoácidos antes de que éstos se transportasen al cloroplasto, por ello la síntesis de proteínas del citosol estaría menos afectada por la limitación de nitrógeno (Vergara *et al.*, 1995).

En el estudio de la relación TFB/TTE además de la radiación, tanto en cantidad como en calidad, es muy importante estudiar la influencia de otras variables como la disponibilidad de carbono o de nitrógeno. En *P. columbina* se observó una relación entre la TTE por oxígeno producido próxima al valor teórico, de 1 molécula de oxígeno necesita de 4 electrones del PSII, sólo en condiciones de bajas irradiancias y alta concentración de amonio, sin embargo, cuando al incrementarse los procesos de disipación de energía se necesitan muchos electrones por molécula de oxígeno producida. Las pendientes de las curvas TTE vs TFB eran superiores cuando se incrementaba la asimilación de nitrógeno, como ocurría en *Ulva rotundata* o en *P. leucosticta*, en las que se observó un alto contenido interno de nitrógeno y también una elevada actividad nitrato reductasa (Figuerola *et al.*, 2003b), todo ello a pesar de que la vía que siguen los electrones para la asimilación de nitrógeno, concretamente para que el nitrito sea reducido a amonio, se desvía a nivel de la ferredoxina, no influenciando la evolución de oxígeno y sí la fijación de CO₂. El flujo de electrones depende además de los sumideros para la asimilación de carbono y de nitrógeno y también depende de la reacción de Mehler, en la cual el oxígeno actúa como aceptor final de electrones en la fotosíntesis y se reduce a ión superóxido que se elimina mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa. En fitoplancton los máximos rendimientos cuánticos en la fijación de carbono variaban aproximadamente en paralelo a la concentración de nitrato (Babin *et al.*, 1996). En el experimento llevado a cabo con *P. columbina*, el enriquecimiento del medio con amonio, conduciría a una súbita asimilación de nitrógeno que podría inhibir la actividad de la Rubisco incrementándose la respiración para

proveer a los talos de carbono (Turpin, 1991). Además se ha descrito en *Selenastrum minutum* que debido a la asimilación de nitrógeno, debe producirse un flujo rápido de carbono desde el cloroplasto, a través de la respiración, para suplir de los esqueletos carbonatados necesarios, este hecho afectaría al balance entre ATP y la demanda de electrones en la célula (Holmes *et al.*, 1989). La demanda adicional de energía necesaria para la reducción del nitrato, conduciría a que la asimilación de este compuesto no implicase una reducción tan marcada de la tasa de transporte electrónico o la evolución de oxígeno, como la asimilación de amonio (Quesada *et al.*, 2000).

A irradiancias moderadas, la TTE calculada a partir de Φ_{PSII} se aproximaba a la producción bruta de oxígeno en diversas especies de *Ulva* y en *P. columbina* (Beer *et al.*, 2000; Franklin y Badger, 2001) pero en *Ulva lactuca* a irradiancias elevadas la relación TTE/TFB se incrementó por encima del valor teórico de 4 (Longstaff *et al.*, 2002). Los niveles de nitrógeno afectaban a la relación TTE/TFB en *U. rotundata* (Henley *et al.*, 1991a,b). Figueroa y colaboradores (2003b) encontraron que las diferencias en la relación TTE/TFB en dos especies de *Ulva* podrían atribuirse a una distinta composición pigmentaria y absorción de las dos especies. Con la excepción de un estudio en *U. rotundata* (Henley *et al.*, 1991a, b), la posible relación entre la pérdida de linealidad de la relación TTE/TFB y el metabolismo del nitrógeno en macroalgas no se ha examinado en profundidad. Figueroa y colaboradores (2003b) observaron el mismo patrón tanto en algas con una alta tasa de asimilación de nitrógeno (*Ulva rotundata* y *P. leucosticta*) como en especies que incorporaban poco nitrógeno (*Ulva olivascens*).

SÍNTESIS

En la figura 2 de la introducción se representaron los aspectos que se han tratado a lo largo de los capítulos de este trabajo, concretamente se ha analizado el papel de la radiación lumínica y la disponibilidad de nutrientes en el metabolismo fotosintético y en la acumulación de MAAs.

1.-Radiación lumínica:

Según los antecedentes que se tenían en relación con la regulación de la síntesis de MAAs y su potencial papel fotoprotector, se esperaba encontrar una relación positiva entre la acumulación de MAAs y la dosis de RUV recibida. Sin embargo, de la variedad de resultados obtenidos no se deduce tal relación, de hecho sorprendentemente en muchos de los casos la relación fue inversa.

A partir de los resultados obtenidos, podemos sugerir la presencia de dos fotorreceptores, uno azul y otro UV/PAR, puesto que la incubación en luz azul al igual que a altas dosis de radiación PAR y/o RUV favorecen la acumulación preferencial de palythine y asterina-330, frente a shinorine y porphyra-334, probablemente por la acción de las reacciones de interconversión representadas en la figura S.1. Los fotorreceptores una vez que pasan a su forma activa, tras recibir la señal lumínica, activarían el mecanismo genético mediante el que se sintetizarían las enzimas involucradas en dichas reacciones. En este sentido, la acumulación preferente de palythine y asterina-330, actuando como moléculas pantalla de la RUV, absorberían la energía de las bandas más efectivas en términos de daño celular y la disiparía en forma de calor. Por otro lado, se podrían estar acumulando moléculas de gadusol, que al actuar como sustancia antioxidante eliminarían los radicales libres de oxígeno.

Por lo tanto, a pesar de la relación inversa encontrada entre las caídas del contenido interno de MAAs y las dosis de radiación recibidas, la acumulación de los MAAs con un máximo de absorción más próximo a la banda de radiación UVB y la posible acumulación de gadusol como molécula antioxidante, supondrían dos mecanismos fotoprotectores que actuarían para minimizar el daño producido a los diferentes componentes celulares y procesos biológicos, junto con otros mecanismos fotoprotectores y también reparadores del daño provocado por las altas irradiancias PAR y UV.

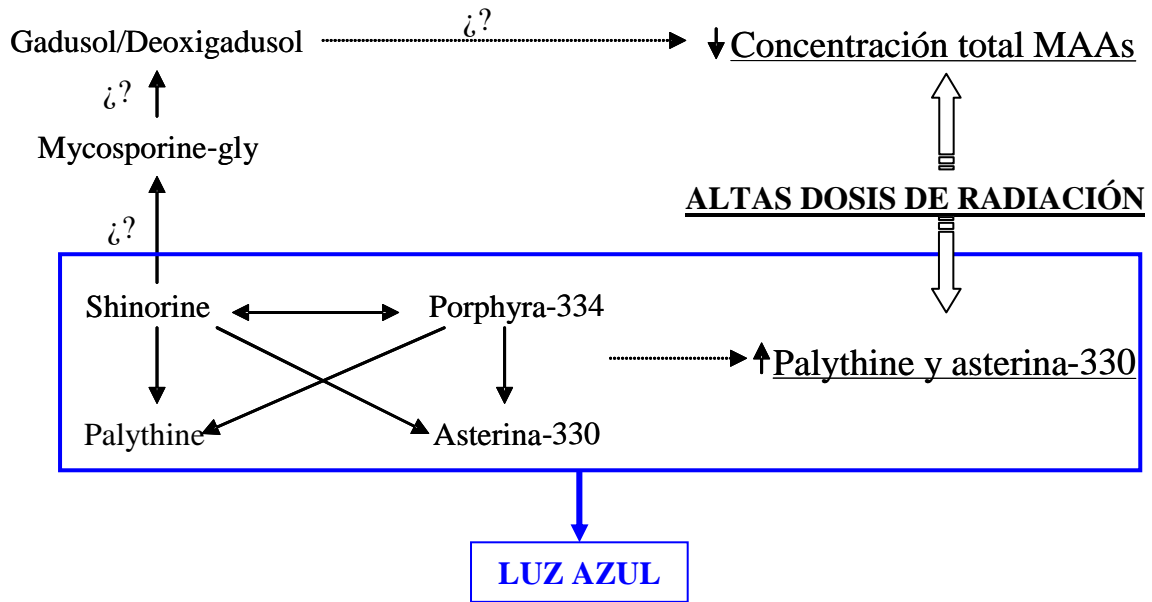


Figura S.1. Reacciones de conversión entre los MAAs y el gadusol. Implicaciones de la incubación a altas dosis de radiación y en luz azul.

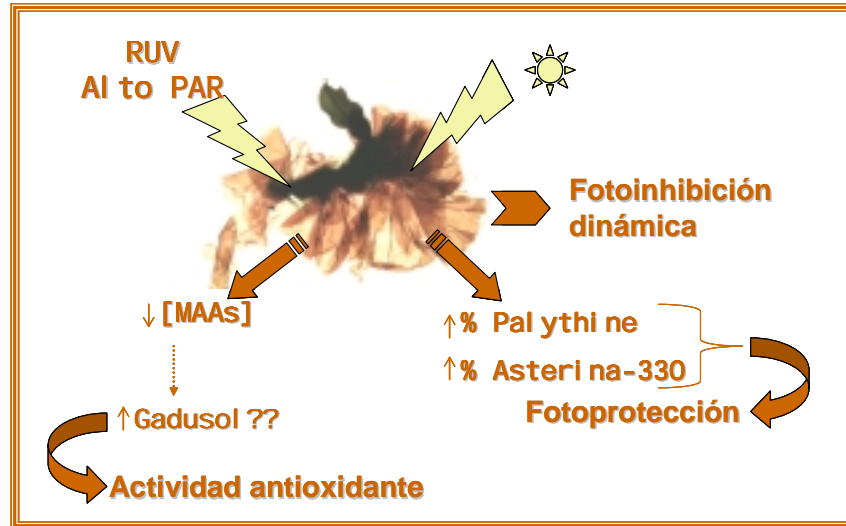


Figura S.2. Esquema en el que se sintetiza en *P. leucosticta* el efecto de altas dosis de radiación PAR y/o UV en la acumulación de MAAs.

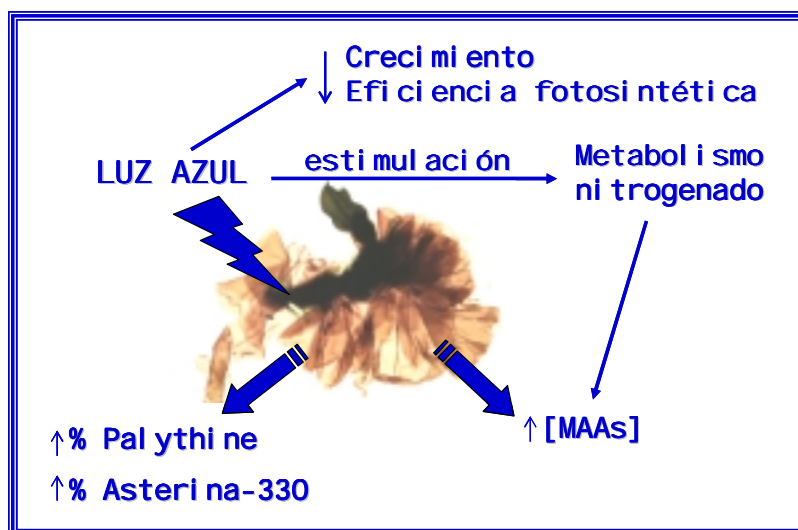


Figura S.3. Esquema en el que se sintetiza en *P. leucosticta* el efecto de la luz azul en la acumulación de MAAs.

En general, se puede concluir que la inducción, formación y acumulación de cada MAA es un proceso fisiológicamente muy flexible, aunque las reacciones de conversión entre los diferentes MAAs y el gadusol parecen ser una constante, siempre y cuando, se detecten los cuatro MAAs que intervienen en las mismas (figura S.1). Se supone que los mecanismos que participan en la acumulación de estas moléculas incluirían varios pasos enzimáticos que dependen de variables ambientales (radiación, turbidez del agua, disponibilidad de nutrientes), ecológicas (hábitat de crecimiento), fisiológicas (regulación de las actividades enzimáticas, ciclo reproductivo) y genéticas (la presencia de determinados genes). Hasta ahora no se conoce el mecanismo que lo inicia, ni tampoco los detalles de la ruta biosintética de cada MAA, aunque tal y como han sugerido otros autores (Franklin *et al.*, 2001; Hoyer *et al.*, 2002), la interacción entre varios fotorreceptores explicaría el comportamiento de los MAAs en cada organismo.

Lichtenthaler y colaboradores (1980) propusieron que en plantas vasculares la luz azul inducía el mismo tipo de adaptación de una planta de morfotipo sol. Quizá podríamos pensar en pterinas y flavinas como fotorreceptores azules, que han sido propuestas por otros autores en algas, plantas y animales (Rüdiger y López-Figueroa, 1992; Cashmore *et al.*, 1999). En la síntesis de MAAs en *C. crispus* también se propuso la acción de un fotorreceptor azul y otro de UVA, ambos actuando sinérgicamente (Franklin *et al.*, 2001). Curiosamente se ha demostrado que la radiación UVB induce selectivamente la transcripción del ARN_m para la primera enzima de la ruta del ácido chiquímico y para enzimas implicadas en la biosíntesis de flavonoides en plantas vasculares (Logemann *et al.*, 2000), pero no se demostró cuál era la señal que iniciaba

este mecanismo. Hasta el momento se desconoce la naturaleza de los fotorreceptores de RUV, aunque se han considerado varios candidatos. En una cianobacteria Portwich y García-Pichel (2000) propusieron un fotorreceptor UVB que actuaría en la síntesis de MAAs, la pterina reducida, lo dedujeron a partir de la respuesta ante la síntesis de los MAAs y el espectro de absorción de aquella molécula, y además demostraron que un inhibidor de la ruta de síntesis de la pterina y un antagonista del estado excitado de ésta, derivaban en una reducción de la síntesis de MAAs.

2.- Disponibilidad de nitrógeno:

Además de estudiar el efecto de la radiación lumínica en la acumulación de MAAs, también se planteó el estudio del efecto de la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo, puesto que los MAAs son moléculas que poseen en su estructura química nitrógeno, entre otros elementos. En este sentido, se observó que el cultivo de los talos de *Porphyra* en condiciones de limitación de nitrógeno fue el único modo mediante el cual se consiguió, tras el enriquecimiento del medio con amonio, incrementar el contenido de MAAs en esta especie, caracterizada por una concentración interna muy elevada. Además se observó un efecto aditivo de la RUV, concretamente en *P. columbina* la radiación UVA era la más efectiva en términos de una mayor acumulación de MAAs. Además los talos eran menos sensibles a la exposición a RUV en presencia de amonio en el cultivo, reflejándose en una mayor actividad fotosintética. El mayor contenido de MAAs, junto a concentraciones superiores de proteínas y otros compuestos nitrogenados, al igual que una mayor actividad de los mecanismos de reparación, estarían contribuyendo al incremento de la resistencia a la RUV.

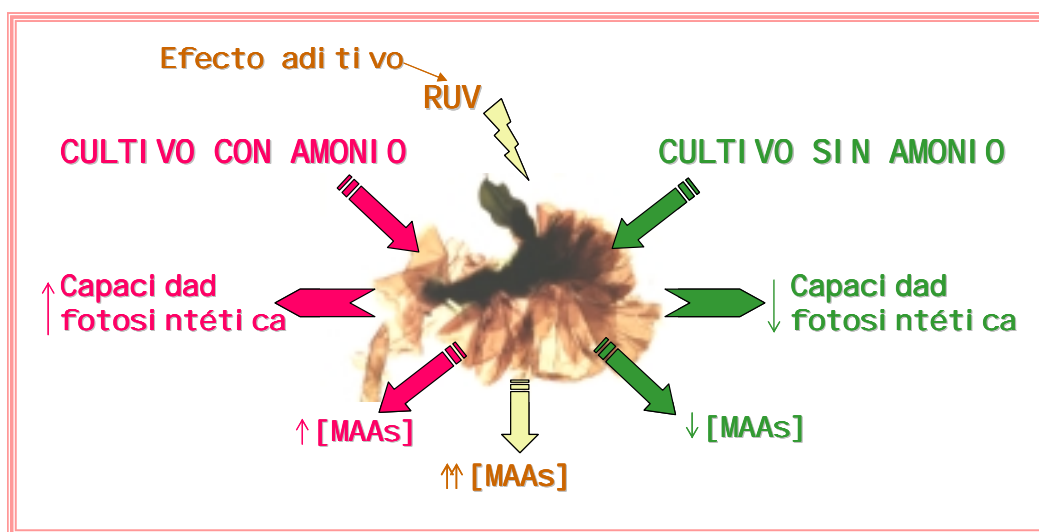


Figura S.4. Esquema en el que se sintetiza en *P. leucosticta* el efecto de la disponibilidad de nitrógeno inorgánico en la acumulación de MAAs.

CONCLUSIONES

1. Los MAAs (concretamente porphyra-334), son moléculas muy estables frente a cambios de temperatura y pH, de manera que junto con su alta capacidad de absorción, les hace potenciales moléculas fotoprotectoras.
2. La emisión de fluorescencia de los MAAs es baja cuando son excitados en longitudes de onda próximas a su máximo de absorción, conclusión a la que también llegaron otros autores (Shick *et al.*, 2000) que observaron que la energía absorbida por estas moléculas se disipa térmicamente.
3. El cultivo de *P. umbilicalis* en presencia de un herbicida inhibidor de la ruta del ácido chiquímico, no nos proporciona suficientes evidencias experimentales de que ésta sea la ruta a partir de la que deriva la síntesis de MAAs. El efecto herbicida se produce a nivel fotosintético provocando la inhibición de la actividad fotosintética y como consecuencia una caída en la concentración de aminoácidos, sin observarse una inhibición selectiva de la síntesis de aminoácidos aromáticos ni MAAs.
4. Las algas rojas presentan MAAs en distinta concentración y composición dependiendo de la especie. Las algas pardas y verdes no presentan MAAs, a lo sumo trazas de algunos de ellos. Entre las algas rojas, las mayores concentraciones de MAAs se encuentran en el orden Bangiales, y las menores en el Corallinales. En otros grupos taxonómicos las concentraciones de MAAs varían sin un patrón establecido según las especies y/o según su localización y/o época del año de recolección. El MAA común a todas las especies de algas rojas analizadas es shinorine, seguido de palythine, asterina-330 y porphyra-334, este último domina en el orden Bangiales; los MAAs menos comunes son palythanol y mycosporine-gly.
5. Existe una relación inversa entre el incremento de las dosis de radiación solar recibida y el contenido interno de MAAs en *Bangia atropurpurea*, *Porphyra leucosticta*, *Caulacanthus* sp., *Corallina* sp. y *Gelidium pusillum*.
6. La caída del contenido interno de MAAs a altas dosis de radiación va acompañada de un cambio en la composición relativa de los diferentes tipos de MAAs, se acumula preferentemente palythine y asterina-330, que poseen su máximo de absorción más próximo a las bandas más efectivas en términos de daño celular, mientras que shinorine y/o porphyra-334 podrían estar actuando como precursores de sustancias con capacidad antioxidante (gadusol). Por lo tanto, a pesar de la caída de MAAs, la acumulación de palythine y asterina-330, y probablemente la de gadusol, podrían tener un papel fotoprotector.

7. *P. columbina* y *P. leucosticta* presentan dos estrategias diferentes de aclimatación a altas dosis de radiación (RUV y PAR) en un periodo de tiempo corto. En ambas especies se produce fotoinhibición dinámica. En *P. leucosticta* las caídas del rendimiento cuántico en el periodo de exposición a altas irradiancias PAR y RUV son rápidas y drásticas, pero al ser trasferida a irradiancias bajas la recuperación es completa y también muy rápida. La disipación térmica (alto qN) parece ser la estrategia de aclimatación a altas irradiancias en *P. leucosticta*, mientras que en *P. columbina* la penetración de la RUV en el talo es inferior, siendo por lo tanto, también menor la fotoinhibición, gracias al mayor grosor del mismo.
8. En experimentos cortos la concentración y proporción relativa de los distintos tipos de MAAs en *P. columbina* presentan menores cambios que en *P. leucosticta*. En ésta la presencia de RUV deriva en una caída adicional del contenido interno de MAAs cuando la irradiancia PAR es alta, mientras que a irradiancias bajas y también en experimentos cortos con luz continua la presencia de RUV deriva en una acumulación preferencial de shinorine frente a porphyrin-334. Una acumulación preferente de shinorine también se observa en ambas especies, después del periodo de recuperación a bajas irradiancias, quizá por tratarse de uno de los primeros MAAs en la ruta de síntesis a partir del que podría derivar el resto y desde el que se podría revertir la reacción hacia gadusol. Tras el periodo de exposición *P. columbina* tipo sombra disminuye su concentración inicial de MAAs hasta igualar a la de tipo sol, y también iguala las proporciones relativas de los distintos tipos de MAAs.
9. Cuando la energía que se le suministra a los talos de *P. leucosticta* es baja, éstos tienden a acumular preferentemente clorofila *a* frente a ficobiliproteínas manteniendo una actividad fotosintética suficiente para su supervivencia.
10. En *P. leucosticta* la luz roja favorece la actividad fotosintética y el crecimiento mientras que la luz azul favorece la acumulación de compuestos nitrogenados, entre ellos, proteínas, ficobiliproteínas y MAAs. Además la luz azul a irradiancias moderadas produce el mismo efecto sobre la acumulación preferente de palythine y asterina-330 frente a shinorine, que las altas irradiancias PAR y RUV.
11. Cuando la fase macroscópica (haploide) de *P. leucosticta* se encuentra próxima a desaparecer en abril, los talos son más sensibles a la exposición a altas irradiancias de PAR y/o RUV a largo plazo en términos de actividad fotosintética; además, la mayor sensibilidad también se refleja en el contenido interno de pigmentos, proteínas y MAAs. En general, se observa un efecto positivo de la radiación UVB en los mecanismos de reparación fotosintéticos y en el contenido proteico y de MAAs.

12. Tras mantener los talos de *Porphyra* en condiciones de limitación de nitrógeno se incrementa la sensibilidad de la fotosíntesis provocada por la RUV. Se observa una rápida asimilación de amonio tras la adición de este compuesto, que se refleja en un mayor contenido de proteínas, pigmentos y también de MAAs, en este último caso, siempre y cuando la concentración inicial no sea muy elevada. En *P. leucosticta* se favorece la acumulación de uno de los primeros MAAs en la ruta de síntesis, shinorine, conforme se incrementa el amonio en el medio de cultivo. El incremento del contenido de MAAs es superior en presencia de RUV. Concretamente la radiación UVA es la más efectiva en *P. columbina*. Los niveles de amonio en el cultivo afectan a la relación entre las tasas de transporte electrónico y fotosíntesis bruta (TTE/TFB). La relación está próxima al valor teórico de 4 (4 electrones del PSII por molécula oxígeno producida) a alta concentración de amonio en el cultivo y baja irradiancia, mientras que bajo limitación de nitrógeno la relación es mucho más alta.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, N. L. y Shick, J. M. 1996. Mycosporine-like amino acids provide protection against ultraviolet radiation in eggs of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Photochem. Photobiol.* 64(1):149-58.
- Adams, N. L. y Shick, J. M. 2001. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Mar. Biol.* 138:267-80.
- Aguilera, J. 1997. Fotorregulación del crecimiento, morfología y fotosíntesis de *Porphyra leucosticta* Thuret in Le Jolis. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Málaga.
- Aguilera, J., Jiménez, C., Figueroa, F. L., Lebert, M. y Häder, D. -P. 1999a. Effect of ultraviolet radiation on thallus absorption and photosynthetic pigments in the red alga *Porphyra umbilicalis*. *J. Photochem. Photobiol.* 48:75-82.
- Aguilera, J., Gordillo, F. J. L., Karsten, U., Figueroa, F. L. y Niell, F. X. 2000. Light quality effect on photosynthesis and efficiency of carbon assimilation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *J. Plant Physiol.* 157:86-92.
- Aguilera, J., Bischof, K., Karsten, U., Hanelt, D. y Wiencke, C. 2002. Seasonal variation in ecophysiological patterns in macroalgae from an Arctic fjord. II. Pigment accumulation and biochemical defence systems against high light stress. *Mar. Biol.* 140:1087-95.
- Algarra, P. y Niell, F. X. 1990. Short-term pigment response of *Corallina elongata* Ellis et Soland to light intensity. *Aquat. Bot.* 36:127-38.
- Algarra, P., De la Viña, G. y Niell, F. X. 1991. Effects of light quality and irradiance level interactions on short-term pigment response of the red alga *Corallina elongata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 74:27-32.
- Algarra, P. y Rüdiger, W. 1993. Acclimation processes in the light harvesting complex red alga *Porphyridium purpureum* (Bory) Drew et Ross according to irradiance and nutrient availability. *Plant Cell Environ.* 16:149-59.
- Altamirano, M., Flores-Moya, A. y Figueroa, F. L. 2000. Long-term effect of natural sunlight under various ultraviolet conditions on growth and photosynthesis of intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) cultured *in situ*. *Bot. Mar.* 43:119-26.
- Altamirano, M., Flores-Moya, A. y Figueroa, F. L. 2003. Effects of UV radiation and temperature on growth germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquat. Bot.* 75:9-20.
- Arai, T., Nishijima, M., Adachi, K. y Sano, H. 1992. Isolation and structure of a UV absorbing substance from the marine bacterium *Micrococcus* sp. AK-334. MBI Report. Marine Biotechnology Institute. Tokyo (Japan). pp. 88-94.

- Aráoz, R. y Häder, D. -P. 1997. Ultraviolet radiation induces both degradation and synthesis of phycobilisomes in *Nostoc* sp.: a spectroscopic and biochemical approach. *FEMS Microb. Ecol.* 23:301-13.
- Augier, H. y Boudouresque, C. 1971. Devouverte des cystocarpes de *Feldmannophycus rayssiae* nov. Gen. (Rhodophycées, Gigartinales). *Bull. Soc. Phycol. Fr.* 16:25-30.
- Babin M., Morel A., Claustre H., Bricaud A., Kolber Z. y Falkowski P. G 1996. Nitrogen and irradiance-dependent variations of the maximum quantum yield of carbon fixation in eutrophic, mesotrophic and oligotrophic marine systems. *Deep-Sea Research I* 43:1241-72.
- Banaszak, A. T. y Trench, R. K. 1995. Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194:233-50.
- Banaszak, A. T., Lesser, M. P., Kuffner, I. B. y Ondrusek, M. 1998. Relationship between ultraviolet light (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194:233-50.
- Bandaranayake, W. M., Bemis, J. E. y Bourne, D. J. 1996. Ultraviolet absorbing pigments from the marine sponge *Dysidea herbacea*: isolation and structure of a new mycosporine. *Comp. Biochem. Physiol. C* 115:281-6.
- Bandaranayake, W. M., Bourne, D. J. y Sim, R. G. 1997. Chemical composition during maturing and spawning of the sponge *Dysidea herbacea* (Porifera: Demospongiae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 118:851-9.
- Bandaranayake, W. M. 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat. Prod. Rep.* 15:159-72.
- Bandaranayake, W. M. y Des Rocher, A. 1999. Role of secondary metabolites and pigments in epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. *Mar. Biol.* 133:163-9.
- Barsch, I. Comunicación personal, 1999.
- Beardall, J. Roberts, S. y Millhouse, J. 1991. Effects of nitrogen limitation on uptake of inorganic carbon and specific activity of ribulose- 1, 5 biphosphate carboxylase/oxygenase in green microalgae. *Can J. Bot.* 69:1146-50.
- Beer, S. y Levy, I. 1983. Effects of photon fluence rate and light spectrum composition on growth, photosynthesis and pigment relation in *Gracilaria* sp. *J. Phycol.* 19:516-22.
- Beer, S. y Eshel, A. 1985. Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 36:785-92.

- Beer S., Larsson C., Poryan O. y Axelsson L. 2000. Photosynthetic rates of *Ulva* (Chlorophyta) measured by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Eur J Phycol* 35:69-74.
- Bentley, R. 1990. The shikimate pathway-a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25:307-84.
- Bischof, K., Hanelt, D. y Wiencke, C. 1998. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar. Biol.* 131:597-605.
- Bischof, K., Kräbs, G., Hanelt, D. y Wiencke, C. 2000. Photosynthetic characteristics and mycosporine-like amino acids under UV radiation: a competitive advantage of *Mastocarpus stellatus* over *Chondrus crispus* at the Helgoland shoreline? *Helgol. Mar. Res.* 54:47-52.
- Björkman, O. 1987. Low-temperature chlorophyll fluorescence in leaves and its relationship to photon yield of photosynthesis in photoinhibition. *En: Kyle, D. J., Osmond, C. B. y Arntzen, C. J. (Eds.) Photoinhibition.* Elsevier, Amsterdam, pp. 123-44.
- Böhm, G. A., Pfliederer, W., Böger, P. y Scherer, S. 1995. Structure of a novel oligosaccharide-mycosporine-amino acid ultraviolet A/B sunscreen pigment from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Biol. Chem.* 270:8536-39.
- Bold, H. C. y Wynne, M. J. 1978. *Introduction to the Algae: Structure and Reproduction.* New-Jersey: Prentice-Hall, Inc.
- Bose, S., Herbert, S. K. y Fork, D. C. 1988. Fluorescence characteristics of photoinhibition and recovery in a sun and shade species of the red alga genus *Porphyra*. *Plant. Physiol.* 86:946-50.
- Boussiba, S. y Richmond, A. E. 1980. C-phycoyanin as a storage protein in the blue-green alga *Spirulina platensis*. *Arch. Microbiol.* 125:143-7.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.
- Bracher, A. U. y Wiencke, C. 2000. Simulation on the effects of naturally enhanced UV radiation on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 196:127-41.
- Brodie, J. Comunicación personal.
- Büdel, B., Karsten, U. y García-Pichel, F. 1997. Ultraviolet-absorbing scytonemin and mycosporine like amino acid derivatives in exposed, rock-inhabiting cyanobacterial lichens. *Oecologia* 112:165-72.
- Buma, A. G. J., Haneneb E. J., Van., L., Roza, M. J. W. Veldhuis y Gieskes, W. W. C. 1995. Monitoring Ultraviolet B-induced DNA damage in individual diatom cells by immunofluorescence thymine dimer detection. *J. Phycol.* 31:314-21.

- Buma, A. G. J., Engelen, A. H. y Gieskes, W. W. C. 1997. Wavelength-dependent induction of thymine dimers and growth rate reduction in the marine diatom *Cyclotella* sp. exposed to ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153:91-7.
- Caldwell, M. M., Camp, L. B., Warner, C. W. y Flint, S. D. 1986. Action spectra and their key role in assessing biological consequences of solar UV-B radiation change. En Worrest, R. C. y Caldwell, M. M. (Eds.) *Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life*. Springer, Berlin. pp. 87-111.
- Caldwell, M. M. y Flint, S. D. 1997. Uses of biological spectral weighting functions and the need for scaling for the ozone reduction problem. *Plant Ecol.* 128:66-76.
- Carefoot, T. H., Karentz, D., Pennings, S. C. y Young, C.L. 2000. Distribution of mycosporine-like amino acids in the sea hare *Aplysia dactylomela*: effect of diet on amounts and types sequestered over time in tissues and spawn. *Comp. Biochem. Physiol. C* 126:91-104.
- Carmona, R. 1999. Fotocontrol cualitativo del crecimiento, metabolismo y de la producción de biomasa de calidad en agarófitos. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Málaga.
- Carreto, J. I., Carignan, M. O., Daleo, D. y De Marco, S. G. 1990a. Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red-tide dinoflagellate *Alexandrium excavantum*: UV-protoprotective compounds? *J. Plankton Res.* 12:909-22.
- Carreto, J. I., Lutz, V. A., De Marco, S. G. y Carignan, M. O. 1990b. Fluence and wavelength dependence of mycosporine-like amino acid synthesis in the dinoflagellate *Alexandrium excavatum*. En: Graneli, E., Edler, L., Sundstrom, B., y Anderson, D. M. (Eds.) *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, Amsterdam. pp. 275-9.
- Carroll, A. K. y Shick, J. M. 1996. Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Mar. Biol.* 124:561-9.
- Casas, G. 2003. Comunicación personal.
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y.-J. y Liu, D. 1999. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284:760:5.
- Castenholz, R. W. 1997. Multiple strategies for UV tolerance in cyanobacteria. *The Spectrum* 10:10-6.
- Cockell, C. S. y Knowland, J. 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74:311-45.
- Coleman, L. W., Rosen, B. H. y Schwartzbach, S. D. 1988. Preferential loss of chloroplast proteins in nitrogen deficient *Euglena*. *Plant Cell Physiol.* 29(6):1007-14.
- Conde, F. R., Churio, M. S. y Previtali, C. M. 2000. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol.* 56:139-44.

- Conde-Álvarez, R. M. 2001. Variaciones espacio-temporales y ecofisiología de los Macrófitos acuáticos de la Laguna atalasoalinal de Fuente de Piedra (Sur de la Península Ibérica). Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Málaga.
- Cordi, B., Depledge, M. H., Price, D. N., Salter, L. F. y Donkin, M. E. 1997. Evaluation of chlorophyll fluorescence, in vivo spectrophotometric pigment absorption and ion leakage as biomarkers of UV-B exposure in marine macroalgae. *Mar. Biol.* 130:41-9.
- Costanzo, S. D., O'Donohue, M. J. y Dennison, W. C. 2000. *Gracilaria edulis* (Rhodophyta) as a biological indicador of pulsed nutrients in oligotrophic waters. *J. Phycol.* 36:680-5.
- Cox, C. 1995a. Glyphosate. Part 1: Toxicology. *J. Pesticide Reform* 15(3):14-20.
- Cox, C. 1995b. Glyphosate. Part 2: Human exposure and ecological effects. *J. Pesticide Reform* 15(4):14-19.
- Cullen, J. J., Neale, P. J. y Lesser, M. P. (1992). Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science* 258:646-50.
- Davidson, A. T., Bramich, D., Marchant, H. J. y McMinn, A. 1994. Effects of UVB irradiation on growth and survival of Antarctic marine diatoms. *Mar. Biol.* 119:507-15.
- Demming, B. y Björkman, O. 1987. Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescent (77K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta* 171:171-84.
- Demming-Adams, B. y Adams, W. W. III. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:599-626.
- Dionisio-Sese, M. L., Ishikura, M., Maruyama, T. y Miyachi, S. 1997. UV absorbing substances in the tunic of a colonial ascidian protect its symbiont, *Prochloron* sp., from damage by UV-B radiation. *Mar. Biol.* 128:455-61.
- Dixon, P. S. y Richardson, W. N. 1970. Growth and reproduction in red algae in relation to light and dark cycles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 175:764-77.
- Doucette, G. J. y Harrison, P. J. 1990. Some effects of iron and nitrogen stress on the red tide dinoflagellate *Gymnodinium sanguineum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 62:293-306.
- Drew, K. M. (1949). Conchocelis-phase in the life history of *Porphyra umbilicalis* (L.) Kütz. *Nature* 164:748-51.
- Dring, M. J., Makarov, V., Schoschina, E. Lorenz, M. y Lüning, K. 1996. Influence of ultraviolet-radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life-history stages of three species of Laminaria (phaeophyta). *Mar. Biol.* 126:183-91.
- Dunlap, W. C. y Chalker, B. E. 1986. Identification and quantification of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian. *Coral Reefs* 5:155-9.
- Dunlap, W. C., Chalker, B. E. y Oliver, J. K. 1986. Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef. Australia. III. UV-B absorbing compounds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 104:239-48.

- Dunlap, W. C. y Yamamoto, Y. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms-antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol. B* 112:105-14.
- Dunlap, W. C. y Shick, J. M. 1998. UV radiation absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* 34:418-30.
- Ehling-Schulz, M., Bilger, W. y Scherer, S. 1997. UV-B-induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Bacteriol.* 179:1940-45.
- Enríquez, S., Agustí, S. y Duarte, C. M. 1994. Light absorption by marine macrophytes. *Oecologia* 98:121-9.
- Evans, G. C. 1972. *The quantitative analysis of plant growth*. Blackwell, Oxford. 734 pp.
- Favre-Bonvin, J., Arpin, N. y Brevard, C. 1976. Structure de la mycosporine (P-310). *Can. J. Chem.* 54:1105-13.
- Favre-Bonvin, J., Bernillon, J., Salin, N. y Arpin, N. 1987. Biosynthesis of mycosporine: mycosporine-glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochem.* 26:2509-14.
- Figueroa, F. L., Aguilera, J. y Niell, F. X. 1995a. Red and blue light regulation of growth and photosynthetic metabolism in *Porphyra umbilicalis* (Bangiales, Rhodophyta). *Eur. J. Phycol.* 30:11-8.
- Figueroa, F. L., Aguilera, J., Jiménez, C., Vergara J. J., Robles, M. D. y Niell, F. X. 1995b. Growth, pigment synthesis and nitrogen assimilation in the red alga *Porphyra* sp. (Bangiales, Rhodophyta) under blue and red light. *Sci. Mar.* 59:9-20.
- Figueroa, F. L. 1996. Effects of light quality on nitrate reductase and glutamina synthetase activities in the red alga *Porphyra leucosticta* Thur. In Le Jol. and other macroalgae. *Sci. Mar.* 60(1):163-70.
- Figueroa, F. L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A. y Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151:81-90.
- Figueroa, F. L., Jiménez, C., Viñegla, B., Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J., Flores-Moya, A., Altamirano, M., Lebert, M. y Häder, D.-P. 2002. Effects of solar UV radiation on photosynthesis of the marine angiosperm *Posidonia oceanica* from southern Spain. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230:59-70.
- Figueroa, F. L., Escassi, L., Pérez-Rodríguez, E., Korbee, N., Giles, A. D. y Johnsen, G. 2003a. Effects of short-term irradiation on photoinhibition and accumulation of mycosporine-like amino acids in sun and shade species of the red algal genus *Porphyra*. *J. Photoch. Photobiol. B* 69:21-30.
- Figueroa, F. L., Conde-Álvarez, R. y Gómez, I. 2003b. En prensa. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynth. Res.*

- Flores-Moya, A., Altamirano, M., Cordero, M., Gonzalez, M. E. y Perez, M. G. 1997. Phosphorous-limited growth in the seasonal winter red algae *Porphyra leucosticta*. *Bot. Mar.* 40:187-91.
- Flores-Moya, A., Gómez, I., Viñegla, B., Altamirano, M., Pérez-Rodríguez, E., Maestre, C., Caballero, R. M. y Figueroa, F. L. 1998. Effects of solar irradiance on the endemic Mediterranean red alga *Rissoella verruculosa*: photosynthesis performance, pigment content and the activities of enzymes related to nutrient uptake. *New Phytol.* 139:673-83.
- Flores-Moya, A., Hanelt D., Figueroa, F. L., Altamirano, M., Viñegla, B. y Salles, S. 1999. Involvement of solar UV-B radiation in recovery of inhibited photosynthesis in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. *J. Photochem. Photobiol. B.* 49:129-35.
- Fork, D. C. 1963. Observations on the function of chlorophyll a and accessory pigment. *En: Photosynthetic mechanisms in green plants*. NAS-NRC. Publ. n°1145. Washington, D. C., S. pp. 352-361.
- Franklin, L. A., Levavasseur, G., Osmond, C. B., Henley, W. J. y Ramlis, J. 1992. Two components of onset and recovery during photoinhibition of *Ulva rotundata*. *Planta* 186:399-408.
- Franklin, L. A., Yakovleva, I., Karsten, U. y Lüning, K. 1999. Synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae) and the consequences for sensitivity to ultraviolet B radiation. *J. Phycol.* 35:682-93.
- Franklin L. A. y Badger M. R. 2001. A comparison of photosynthetic electron transport rates in macroalgae measured by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and mass spectrometry. *J. Phycol.* 37:756-67.
- Franklin, L. A., Kräbs, G. y Kuhlenskamp, R. 2001. Blue light and UVA radiation control the synthesis of mycosporine-like amino acids in *Chondrus crispus* (Florideophyceae). *J. Phycol.* 37:257-70.
- Gabrielson, P. W., Garbary, D. J. y Scagel, R. F. 1985. The nature of the ancestral red alga: inferences from a cladistic analysis. *BioSystems* 18:335-46.
- Garbary, D. J. y Gabrielson, P. W. 1990. Taxonomy and evolution. *En: Cole K. M. y Sheath, R. G. (Eds.) Biology of the red algae*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 477-98.
- García-Pichel, F. y Castenholz, R. W. 1993. Occurrence of UV-absorbing mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:163-9.
- García-Pichel, F., Wingard, C. E. y Castenholz, R. W. 1993. Evidence regarding the UV sunscreen role of a mycosporine-like compound in the Cyanobacterium *Gloeocapsa* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:170-6.
- García-Pichel, F. 1994. A model for internal self-shading in planktonic organism and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.* 39:1704-17.

- García-Pichel, F. 1996. The absorption of ultraviolet radiation by microalgae: simple optics and photobiological implications. *Sci. Mar.* 60 (1):73-9.
- Geider, R. J., Greene, R. M., Kolber, Z., MacIntyre, H. L. y Falkowski, P. G. 1993. Fluorescence assessment of the maximum quantum efficiency of photosynthesis in the western North Atlantic. *Deep Sea Res.* 40:1205-24.
- Genty, B., Briantais, J. y Baker, N. R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochem. Biophys. Acta* 990:87-92.
- Gleason, D. F. 1993. Differential effects of ultraviolet radiation on green and brown morphs of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *Limnol. Oceanog.* 38:1452-63.
- Gleason, D. F. y Wellington, G. M. 1993. Ultraviolet radiation and coral bleaching. *Nature* 365:836-8.
- Goerick, R. y Montoya, J. P. 1998. Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll *a* in the field-variations of pigment ratios under nutrient- and light-limited growths. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 169:97-112.
- Gómez, I. y Figueroa, F. L. 1998. Effects of solar UV stress on chlorophyll fluorescent kinetics of intertidal macroalgae from southern Spain: a case study in *Gelidium* species. *J. Appl. Phyc.* 10:285-94.
- Grant, P. T., Middleton, C., Planck, P. A. y Thomson, R. H. 1985. The isolation of four aminocyclohexenimines (mycosporines) and a structurally related derivative of cyclohexane-1,3-dione (gadusol) from the brine shrimp *Artemia*. *Comp. Biochem. Physiol.* B 80:755-9.
- Greer, D. H., Berry, J. A. y Björkman, O. 1986. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light and temperature, and requirement for chloroplast-protein synthesis during recovery. *Planta.* 168:253-60.
- Grobe, C. W. y Murphy, T. M. 1994. Inhibition of growth of *Ulva expansa* (Chlorophyta) by ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 30:783-90.
- Gröniger, A., Hallier, C. y Häder, D. -P. 1999. Influence of UV radiation and visible light on *Porphyra umbilicalis*: Photoinhibition and MAA concentration. *J. Appl. Phycol.* 11:437-45.
- Glynn, P. W., Imai, R., Sakai, K., Nakano Y. y Yamazato, K. 1993. Experimental responses of Okinawan (Ryukyu Islands, Japan) reef corals to high sea temperature and UV radiation. En *Proc. 7th Int. Coral Reef Symp.* V.1. pp. 27-37.
- Häder, D. -P., Gröniger, A., Hallier, C., Lebert, M., Figueroa, F. L. y Jiménez, C. 1999. Photoinhibition by visible and ultraviolet radiation in the red macroalga *Porphyra umbilicalis* grown in the laboratory. *Plant. Ecol.* 145:351-8.
- Häder, D. -P., Lebert, M., Colombetti, G. y Figueroa, F. L. 2001. European light dosimeter network (ELDONET): 1998 data. *Helgol. Mar. Res.* 55:35-44.

- Hanelt, D. y Nultsch, W. 1991. The role of chromatophore arrangement in protecting the chromatophores of the brown alga *Dictyota dichotoma* against photodamage. *J. Plant Physiol.* 138:470-5.
- Hanelt, D., Melchersmann, B., Wiencke, C. y Nultsch, W. 1997a. Effects of high light stress on photosynthesis of polar macroalgae in relation to depth distribution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 149:255-66.
- Hanelt, D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Mar. Biol.* 131:361-9.
- Hannach, G. y Sigleo, A. C. 1998. Photoinduction of UV- absorbing compounds in six species of marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 174:207-22.
- Haslam, E. 1993. *Shikimic acid: metabolism and metabolites*. New York: Wiley & Sons. 387 pp.
- Helbling, E. W. 1989. Estuarine circulation and nutrient variability in the Chubut River Estuary (Argentina) during 1986-1987. Tesis para optar por el título de Master en Ciencias (M. Sc.) en Oceanography. *Scripps Institution of Oceanography*, University of California San Diego, 138 pp.
- Helbling, E. W., B. E. Chalker, W. C. Dunlap, O. Holm-Hansen y V. E. Villafañe. 1996. Photoacclimation of Antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 204(1-2):85-101.
- Helbling, E. W., Villafañe, V. E., Buma, A. G. J., Andade, M. y Zaratti, F. 2001. DNA damage and photosynthetic inhibition induced by solar ultraviolet radiation in tropical phytoplankton (Lake Titicaca, Bolivia). *Eur. J. Phycol.* 36:157-66.
- Henley W. J., Levvasseur G., Franklin L. A., Lindley S. T., Ramus J. y Osmond C. B. 1991a. Diurnal responses of photosynthesis and fluorescence in *Ulva rotundata* acclimated to sun and shade in outdoor culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 75:19-28.
- Henley, W. J., Levvasseur, G., Franklin, L. A., Osmond, C. B. y Ramus, J. 1991b. Photoacclimation and photoinhibition in *Ulva rotundata* as influenced by nitrogen availability. *Planta* 184:235-43.
- Henley, W. J., Lindley, S. T., Levvasseur, G., Osmond, C. B. y Ramus, J. 1992. Photosynthetic response of *Ulva rotundata* to light and temperatura during emersion on an intertidal sand flat. *Oecologia* 89:516-23.
- Herbert, S. K. y Waaland, J. R. 1988. Photoinhibition of photosynthesis in a sun and a shade species of the red algal genus *Porphyra*. *Mar. Biol.* 97:1-7.
- Hernández, I., Fernández, J. A. y Niell, F. X. 1993a. Influence of phosphorus status on the seasonal variation of alkaline phosphatase activity in *Porphyra umbilicalis* (L.) Kützinger. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173:181-96.

- Hernández, I., Corzo, A., Gordillo, F. J., Robles, M. D., Saez, E., Fernández, J. A. y Niell, F. X. 1993b. Seasonal cycle of the gametophytic form of *Porphyra umbilicalis*: nitrogen and carbon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 99:301-11.
- Herrmann, K. M. y Weaver, L. M. 1999. The shikimate pathway. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:473-503.
- Hill, D. R., Hladun, S. L., Scherer, S. y Potts, M. 1994. Water stress proteins of *Nostoc commune* (cyanobacteria) are secreted with UV-A/B-absorbing pigments and associate with 1,4- β -D-xylanxylanohydrolase activity. *J. Biol. Chem.* 269:7726-734.
- Holmes, J. J., Weger, H. G. y Turpin, D. H. 1989. Chlorophyll *a* fluorescence predicts total photosynthetic electron flow to CO₂ or NO₃⁻/NO₂⁻ under transient conditions. *Plant Physiol.* 91:331-7.
- Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T. y Wiencke, C. 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211:117-29.
- Hoyer, K., Karsten, U. y Wiencke, C. 2002. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. *Mar. Biol.* 141:619-27.
- Huovinen, P., Gómez, I., Figueroa, F. L., Ulloa, N., Morales, V. y Lovengreen C. En revisión. UV-Absorbing mycosporine-like amino acids in red macroalgae from Chile. *Bot. Mar.*
- Inskip, W. y Bloom, P. R. 1985. Extinction coefficients of chlorophyll *a* and *b* in N,N-dimethylformamide and 80% acetone. *Plant Physiol.* 77:483-5.
- Ishikura, M., Kato, C. y Maruyama, T. 1997. UV-absorbing substances in zooxanthellate and azooxanthellate clams. *Mar. Biol.* 128:649.
- Janke, K. 1986. Die makrofauna und ihre verteilung im Nordost-Felswatt von Helgoland. *Helgoländer Meeresunters* 40:1-55.
- Jassby, A. D. y Platt, T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.* 21:540-7.
- Jiménez, C., Figueroa, F. L., Salles, S., Aguilera, J., Mercado, J., Viñepla, B., Flores-Moya, A., Lebert, M., y Häder, D. -P. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of southern Spain. *Bot. Mar.* 41:329-38.
- Jokiel, P. L. y York, R. H., Jr. 1982. Solar ultraviolet photobiology of the reef coral *Pocillopora damicornis* and symbiotic zooxanthellae. *Bull. Mar. Sci.* 32:301-15.
- Jokiel, P. L., Lesser, M. P. y Ondrusek, M. E. 1997. UV-absorbing compounds in the coral *Pocillopora damicornis*: interactive effects of UV radiation, photosynthetically active radiation and water flow. *Limnol. Oceanogr.* 42:1468-73.
- Jones, L. W. y Kok, B. 1966. Photoinhibition of chloroplast reaction. I. Kinetics and action spectrum. *Plant Physiol.* 41:1034-7.

- Kamiya, A. 1997. Blue light-induced acidification of the medium and the uptake of nitrate in a nitrate-starved *Chlorella*. *Photochem. Photobiol.* 66:288-93.
- Karentz, D., Cleaver, J. y Mitchell, D. L. 1991a. Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 27:326-41.
- Karentz, D., McEuen, F. S., Land, M. C. y Dunlap, W. C. 1991b. Survey of mycosporine-like aminoacids in Antarctic marine organisms: potential protection from ultraviolet exposure. *Mar. Biol.* 108:157-66.
- Karentz, D. 1994. Ultraviolet tolerance mechanisms in Antarctic marine organisms. In: Ultraviolet radiation in Antarctica: measurements and biological effects. *Antarctic Research Series* 62:93-110.
- Karentz, D. y Spero, H. J. 1995. Response of natural *Phaeocystis* population to ambient fluctuations of UVB radiation caused by Antarctic ozone depletion. *J. Plankton Res.* 17:1771-89.
- Karsten, U., Barrow, K. D. y King, R. J. 1993. Floridoside, L-isofloridoside, and D-isofloridoside in the red alga *Porphyra columbina*. *Plant Physiol.* 103:485-91.
- Karsten, U. y García-Pichel, F. 1996. Carotenoids and mycosporine-like amino acid compounds in members of the genus *Microcoleus* (Cyanobacteria): a chemosystematic study. *Syst. Appl. Microbiol.* 19:285-94.
- Karsten, U., Franklin, L. A., Lüning, K. y Wiencke, C. 1998a. Natural ultraviolet and photosynthetic active radiation induce formation of mycosporine-like amino acids in the marine macroalga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *Planta* 205:257-62.
- Karsten, U., Sawall, T., Hanelt, D., Bischof, K., Figueroa, F. L. Flores-Moya, A. y Wiencke, C. 1998b. An inventory of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in macroalgae from polar to warm-temperate regions. *Bot. Mar.* 41:443-53.
- Karsten, U., Sawall, T. y Wiencke, C. 1998c. A survey of the distribution of UV-absorbing substances in tropical macroalgae. *Phycol. Res.* 46:271-9.
- Karsten, U. 1999. Seasonal variation in heteroside concentrations of field-collected *Porphyra* species (Rhodophyta) from different biogeographic regions. *New Phytol.* 143:561-71.
- Karsten, U., Bischof, K., Hanelt, D., Tüg, H. y Wiencke, C. 1999. The effect of ultraviolet radiation on photosynthesis and ultraviolet-absorbing substances in the endemic Arctic macroalga *Devaleraea ramentacea* (Rhodophyta). *Physiol. Plant.* 105:58-66.
- Karsten, U. y Wiencke, C. 1999. Factors controlling the formation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Palmaria palmata* from Spitsbergen (Norway). *J. Plant. Physiol.* 155:407-15.
- Karsten, U., Sawall, T., West, J. y Wiencke, C. 2000. Ultraviolet sunscreen compounds in epiphytic red algae from mangroves. *Hydrobiologia* 432:159-71.

- Karsten, U. y West, J. A. 2000. Living in the intertidal zone-seasonal effects on heterosides and sun-screen compounds in the red alga *Bangia atropurpurea* (Bangiales). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254:221-34.
- Karsten, U., Dummermuth, A., Hoyer, K. y Wiencke, C. 2003. Interactive effects of ultraviolet radiation and salinity on the ecophysiology of two Arctic red algae from shallow waters. *Polar Biol.* 26:249-58.
- Kerr, J. B. y McElroy, C. T. 1993. Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* 262:1032-4.
- Kinzie R. A. III. 1993. Effects of ambient levels of solar ultraviolet radiation on zooxanthellae and photosynthesis of the reef coral *Montipora verrucosa*. *Mar. Biol.* 116:319-27.
- Klisch, M. y Häder, D. -P. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine dinoflagellate *Gyrodinium dorsum*: induction by ultraviolet irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* 55:178-82.
- Kobayashi, J., Nakamura, H. y Hirata, Y. 1981. Isolation and structure of a UV-absorbing substance 337 from the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Tetrahedron Lett.* 22:3001-2.
- Kootstra, S. 1994. Protection from UV-B induced DNA damage by flavonoids. *Plant Mol. Biol.* 26:771-4.
- Kormann, P. 1994. Life histories of monostromatic *Porphyra* species as a basis for taxonomy and classification. *Eur. J. Phycol.* 29:69-71.
- Kowallik, W. 1987. Blue light effect on carbohydrate and protein metabolism. *En: Senger, H. (Ed.) Blue light responses: phenomena and occurrence in plants and microorganisms.* Vol II. CRC Press. Boca Raton. Florida. pp. 7-16.
- Kräbs, G., Bischof, K., Hanelt, D., Karsten, U. y Wiencke, C. 2002. Wavelength-dependent induction of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the red alga *Chondrus crispus* under natural solar radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268:69-82.
- Kräbs, G. 2003. Wavelength-dependent induction of UV-absorbing mycosporine-like amino acids in the red alga *Chondrus crispus* Stackh. Mini-symposia. The Third European Phycological Congress. Belfast, Irland.
- Kräbs, G., Watanabe, M. y Wiencke, C. En preparación. A monochromatic action spectrum for the photoinduction of the UV-absorbing mycosporine-like amino acid shinorine in the red alga *Chondrus crispus* Stackh.
- Kraft, G. T. y Woelkerling, W. J. 1990. Rhodophyta. *En: Clayton M. N. y King R. J. (Eds.). Biology of marine plants.* Longman Melbourne. pp. 41-85.
- Kumar, H. D., Jha, M. y Kumar, A. 1986. Stimulation of nitrate reductase activity by blue light in a thermophilic cyanobacterium *Oscillatoria princeps*. *Br. Phycol. J.* 21:165-8.
- Leach, C. M. 1965. Ultraviolet-absorbing substances associated with light-induced sporulation in fungi. *Can. J. Bot.* 43:185-200.

- Lebert, M., Schuster, M. y Häder, D.-P. 2002. The European Light Dosimeter Network: four years of measurements. *J. Photochem. Photobiol. B.* 66:81-7.
- Lesser, M. P. y Shick, J. M. 1989. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Mar. Biol.* 102:243-55.
- Lesser, M. P., Weis, V. M., Patterson, M. R. y Jokiel, P. L. 1994. Effects of water motion on carbon delivery and productivity in the reef coral, *Pocillopora damicornis* (Linnaeus): Diffusion barriers, inorganic carbon limitation, and biochemical plasticity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 178:153-79.
- Lesser, M. P. 1996. Elevated temperature and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 41:271-83.
- Lesser, M. P. 2000. Depth-dependent photoacclimatization to solar ultraviolet radiation in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 192:137-51.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. y Rahmsdork, U. 1980. The importance of blue light for the development of sun-type chloroplasts. *See Ref.* 210:485-94.
- Lindstron, S. C. y Cole, K. M. 1992a. Relationships between some North Atlantic and North Pacific species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta): evidence from isozymes, morphology and chromosomes. *Can. J. Bot.* 70:1355-63.
- Lindstron, S. C. y Cole, K. M. 1992b. The *Porphyra lanceolata*-*P. pseudolanceolata* (Bangiales, Rhodophyta) complex unmasked: recognition of new species based on isozymes, morphology, chromosomes and distributions. *Phycologia* 31:431-48.
- Lindstron, S. C. y Cole, K. M. 1993. The systematic of *Porphyra*: character evolution in closely related species. *Hydrobiol.* 260:151-7.
- Litchman, E., Neale, P. J. y Banaszak, A. T. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnol. Oceanogr.* 47:86-94.
- Logan, A. Halcrow, K. y Tomascik, T. 1990. UV excitation-fluorescence in polyp tissue of certain scleractinian corals from Barbados and Bermuda. *Bull. Mar. Sci.* 46:807-13.
- Logemann, E., Tavernaro, A., Schulz, W., Somssich, I. E. y Hahlbrock, K. 2000. UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *PNAS* 97 (4):1903-7.
- Longstaff B. J., Kildea T., Runcie J. W., Cheshire A., Dennison W. C., Hurd C., Kana T., Raven J. A. y Larkum W. D. 2002. An in situ study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynth. Res.* 74:281-93.
- López-Figueroa, F. 1987. Fotorregulación de la síntesis pigmentaria en algas. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Málaga.

- López-Figueroa, F. y Niell, F. X. 1989. Red light and blue light photoreceptors controlling chlorophyll a síntesis in the red alga *Porphyra umbilicalis* and in the green alga *Ulva rigida*. *Physiol. Plant.* 76:391-7.
- López-Figueroa, F. y Niell, F. X. 1990. Effect of light quality on chlorophyll and biliprotein accumulation in seaweeds. *Mar. Biol.* 104:321-7.
- López-Figueroa, F. y Niell, F. X. 1991. Photocontrol of chlorophyll and biliprotein synthesis in seaweeds: possible photoreceptors and ecological considerations. *Sci. Mar.* 55(3):519-27.
- López-Figueroa, F. 1992. Diurnal variation in pigment content in *Porphyra laciniata* and *Chondrus crispus* and its relation to the diurnal changes of underwater light quality and quantity. *Mar. Ecol.* 13:285-305.
- López-Figueroa, F. 1993. Photoregulation of nitrogen metabolism and protein accumulation in the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. *Z. Naturforsch.* 48c:788-94.
- Lüning, K y Dring, M. J. 1985. Action spectra and spectral quantum yield of photosynthesis in marine macroalgae with thin and thick thalli. *Mar. Biol.* 87:119-29.
- Lüning, K. 1990. *Seaweeds: their environment, biogeography and ecophysiology*. Yarisich, C. y Kirkman, H. (Eds.). John Wiley & Sons, Inc. EE.UU. 527 pp.
- Lüning, K. 1992. Day- and night-kinetics of growth rate in green, brown and red seaweeds. *J. Phycol.* 28:794-803.
- Ma, J. H. y Miura, A. 1984. Observations of the nuclear division in the conchospores and their germling in *Porphyra yezoensis* Ueda. *Jpn. J. Phycol.* 32:373-8.
- Magne, F. 1991. Classification and phylogeny in the lower Rodophyta: a new propose. *J. Phycol.* 27:46.
- Maragos, J.E. 1972. A study of the ecology of Hawaiian reef corals. Tesis Doctoral. Universidad de Hawaii. Honolulu.
- Mason, D. S., Schafer, F., Shick, J. M. y Dunlap, W. C. 1998. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH-1 hairless mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 120:587-98.
- Marchant, H. J., Davidson, A. T. y Kelly, G. J. 1991. UV-protecting compounds in the marine alga *Phaeocystis pouchetti* from Antarctica. *Mar. Biol.*, 109:391-5.
- Mercado, J. M., Jiménez, C., Niell, F. X. y Figueroa, F. L. 1996. Comparison of methods for measuring light absorption by algae and their application to the estimation of the package effect. *Sci. Mar.* 60(1):39-45.
- Mercado, J. M., Niell, F. X. y Figueroa, F. L. 1997. Regulation of the mechanism for HCO₃⁻ use by the inorganic carbon concentration in *Porphyra leucosticta* Thur. in Le Jolis (Rhodophyta). *Planta* 201:319-25.

- Mercado, J. M., Gordillo, F. J. L., Niell, F. X. y Figueroa, F. L. 1999. Effects of different levels of CO₂ on photosynthesis and cell components of the red alga *Porphyra leucosticta*. *J. Appl. Phycol.* 11:455-61.
- Mitchell, D. L. y Karentz, D. 1993. The induction and repair of DNA photodamage in the environment. *En: Young, A. R., Björn, L. O., Moan, J. y Nultsch, W. (Eds.) Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York. pp. 345-77.
- Mizuta, H., Maita, Y. y Kuwada, K. 1994. Nitrogen recycling mechanism within the Thallus of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae) under the nitrogen limitation. *Fish. Sci.* 60(6):763-7.
- Moisan, T. A. y Mitchell, B. G. 2001. UV absorption by mycosporine-like amino acids in *Phaeocystis Antarctica* Karsten induced by photosynthetically available radiation. *Mar. Biol.* 138:217-27.
- Molina, X. y Montecino, V. 1996. Acclimation to UV irradiance in *Gracilaria Chilensis* Bird, McLachlan & Oliveira (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 326/327:415-20.
- Munda, I. M. y Markham, J. W. 1982. Seasonal variations of vegetation patterns and biomass constituents in the rocky eulittoral of Helgoland. *Helgoländer Meeresunters* 35:131-51.
- Muszynski, F.Z., Bruckner, A., Armstrong, R.A., Morell, J.M. y Corredor, J.E. 1998. Within-colony variations of UV absorption in a reef building coral. *Bull. Mar. Sci.* 63:589-94.
- Neale, P. J., Banaszak, A. T. y Jarriel, C. R. 1998. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J. Phycol.* 34:928-38.
- Newman, S. T., Dunlap, W. C., Nicol, S. y Ritz, D. 2000. Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 255:93-110.
- Oishi, J. y Kunisaki, N. 1970. Free amino acid composition of acceleratedly cultured Makombu, *Laminaria japonica*, at different growing stages. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 36:1181-5.
- Oohusa T. 1993. Recent trends in Nori products and markets in Asia. *J. Appl. Phycol.* 5:155-9.
- Öquist, G., Anderson, J. M., McCaffery, S. y Chow, W. S. 1992a. Mechanistic differences in photoinhibition of sun and shade plants. *Planta* 184:538-44.
- Orce, V. L. y Helbling, E. W. 1997. Latitudinal UVR-measurement in Argentina: extent of the ozone hole. *Global and Planetary Change* 15:113-21.
- Oren, A. 1997. Mycosporine-like amino acids as osmotic solutes in a community of halophilic cyanobacteria. *Geomicrobiol. J.* 14:231-40.
- Osmond, C. B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. *En: Baker, N. R. y Bowyer, J. R. (Eds.) Photoinhibition of photosynthesis, from the molecular mechanisms to the field*. BIOS Scientific Publ. Oxford. pp. 1-24.
- Parkhill, J. -P., Maillet, G. y Cullen, J. J. 2001. fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *J. Phycol.* 37:517-29.

- Pavia, H., Cevin, G., Lindgren, A. y Aberg, P. 1997. Effects of UV-B radiation and stimulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157:139-46.
- Pérez-Lloréns J. L., Vergara J. J., Pino R. R., Hernández I., Peralta G. y Niell F. X. 1996. The effect of photoacclimation on the photosynthetic physiology of *Ulva curvata* and *Ulva rotundata* (Ulvales, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 331:349-59.
- Pérez-Rodríguez, E. D. 2000. Caracterización bio-óptica de aguas oceánicas y costeras. Fotosíntesis, fotoinhibición y fotoprotección bajo radiación ultravioleta de macrófitos marinos. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Málaga.
- Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J., Gómez, I. y Figueroa, F. L. 2001. Excretion of coumarins by the Mediterranean green alga *Dasycladus vermicularis* in response to environmental stress. *Mar. Biol.* 139:633-9.
- Pérez-Rodríguez, E., Aguilera, J. y Figueroa, F. L. 2003. Tissue localization of coumarins in the green alga *Dasycladus vermicularis* (Scopoli) Krasser: a photoprotective role? *J. Exp. Bot.* 54:1093-100.
- Portwich, A. y García-Pichel, F. 1999. Ultraviolet and osmotic stresses induce and regulate the synthesis of mycosporines in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Arch. Microbiol.* 172:187-92.
- Portwich, A. 2000. Die biosynthese wasserlöslicher UV-schutzsubstanzen (MAAs) und ihre regulation in cyanobakterien. Tesis Doctoral. Universidad de Bremen. Alemania.
- Portwich, A. y García-Pichel, F. 2000. A novel prokaryotic UVB photoreceptor in the cyanobacterium *Chlorogloeopsis* PCC 6912. *Photochem. Photobiol.* 71: 493-9.
- Post, A. y Larkum, A. W. D. 1993. UV-absorbing pigments, photosynthesis and UV-exposure in Antarctica: comparison of terrestrial and marine algae. *Aquat. Bot.* 45:231-43.
- Price, J. H. y Forrest, H. S. 1969. 310 m μ Absorbance in *Physalia physalis*. Distribution of the absorbance and isolation of a 310 m μ absorbing compound. *Comp. Biochem. Physiol.* 30:879-88.
- Provasoli, L. 1963. Growing marine seaweeds. *Proc. Int'l. Seaweed Symp.* 4:9-17.
- Qafaiti, M. y Stephens, G. C. 1989. Effect of nitrogen deprivation on amino acid uptake by the chlorophyte *Platymonas subcordiformis*. *Mar. Biol.* 100:515-23.
- Quesada, A., Goff, L. y Karentz, D. 1998. Effects of natural UV radiation on antarctic cyanobacterial mats. *Proc. NIPR Symp. Polar Biol.* 11:98-111.
- Quesada, A., Vincent, W. F. y Lean, D. R. S. 1999. Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28:315-23.
- Quesada, A., Gómez-García, I. y Fernández, E. 2000. Involvement of chloroplast and mitochondria redox values in nitrate assimilation. *Trends Plant Sci.* 5:463-4.

- Raven, J. A. 1984. A cost-benefit analysis of photon absorption by photosynthetic unicells. *New Phytol.* 98:593-625.
- Raven, J. A. 1991. Responses of aquatic photosynthetic organisms to increased solar UVB. *J. Photochem. Photobiol. B* 9:239-44.
- Riegger, L. y Robinson, D. 1997. Photoinduction of UV-absorbing compounds in Antarctic diatoms and *Phaeocystis antarctica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 160:13-25.
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimisation of UV-induced damage. En de Mora, S. J., Demers, S. y Vernet, M. (Eds.) *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge Univ. Press. pp. 177-205.
- Rüdiger, W. y López-Figueroa, F. 1992. Photoreceptors in algae. *Photochem. Photobiol.* 55(6):949-54.
- Rundel, R. D. 1983. Action spectra and estimation of biologically effective UV radiation. *Physiol. Plant.* 58:360-3.
- Schenk, H. E. A., Hanf, J. y Neu-Müller, M. 1983. The phycobiliproteins in *Cyanophora paradoxa* as accessory pigments and nitrogen storage proteins. *Z. Naturforsch* 38:972-7.
- Schreiber, U., Schliwa, U. y Bilger, W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10:51-62.
- Setlow, R. B. 1974. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer. a theoretical analysis. *PNAS* 71:3363-6.
- Shibata, K. 1969. Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. *Plant & Cell Physiol.* 10:325-35.
- Shick, J. M., Lesser, M. P. y Stochaj, W. R. 1991. Ultraviolet radiation and photooxidative stress in zooxanthellate Anthozoa: the sea anemone *Phyllodiscus semoni* and the octocoral *Clavularia* sp. *Symbiosis* 10:145-73.
- Shick, J. M., Dunlap, W. C., Chalker, B. E., Banaszak, A. T. Y Rosenzweig, T. K. 1992. Survey of the ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 90:139-48.
- Shick, J. M., Buettner, G. y Dunlap, W. C. 1994. Preliminary study using electron paramagnetic resonance to assess protection from UV-induced oxidative stress by mycosporine-like amino acids in the ovaries of sea urchins (abstract). *Therapeutic potential of biological antioxidants*, Linus Pauling Institute of Science and Medicine. 29 Sept-1 Oct.
- Shick, J. M., Romaine-Lioud, S. D., Ferrier-Pages, C. y Gattuso, J. -P. 1999. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 44:1667-82.

- Shick, J. M., Dunlap, W. C. y Buettner, G. R. 2000. Ultraviolet (UV) protection in marine organisms II. Biosynthesis, accumulation, and suncreening function of mycosporine-like amino acids. *En: Yoshikawa, S., Toyokuni, S., Yamamoto, Y. y Naito, Y. (Eds.) Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine*. London: OICA Int. pp. 215-28.
- Shick, J. M. y Dunlap, W. C. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu. Rev. Physiol.* 64:223-62.
- Sinha, R. P., Lebert, M., Kumar, D. y Häder, D. -P. 1995. Spectroscopic and biochemical analysis of UV effects on phycobiliprotein of *Anabaena* sp. and *Nostoc carmium*. *Bot. Acta* 108:87-92.
- Sinha, R. P. y Häder, D.-P. 1998. Phycobilisomes and environmental stress. *En: Verma, B.N., Kargupta, A. N. y Goyal S. K.(Eds.) Advances in Phycology*. APC Publications. Nueva Delhi. pp. 71-80.
- Sinha, R. P., Klisch, M., Gröniger, A. y Häder, D.-P. 1998. Ultraviolet-absorbing/screening substances in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae. *J. Photochem. Photobiol.* 47:83-94.
- Sinha, R. P., Klisch, M. y Häder, D. P. 1999. Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. by UV irradiation. *J. Photochem. Photobiol.* 52:59-64.
- Sinha, R. P., Klisch, M., Gröniger, A. y Häder, D.-P. 2000. Mycosporine-like amino acids in the marine red alga *Gracilaria cornea*-effects of UV and heat. *Environ. Exp. Bot.* 43:33-43.
- Sinha, R. P., Klisch, M., Helbling, E. W. y Häder, D.-P. 2001. Induction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in cyanobacteria by solar ultraviolet-B radiation. *J. Photochem. Photobiol. B* 60:129-35.
- Sinha, R. P., Ambasht, N. K., Sinha, J. P. y Häder, D. -P. 2003. Wavelength-dependent induction of a mycosporine-like amino acid in a rice-field cyanobacterium, *Nostoc commune*: role of inhibitors and salt stress. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2:171-6.
- Sivalingam, P. M., Ikawa, T., Yokohama, Y. y Nisizawa, K. 1974. Distribution of a 334 UV-absorbing-Substance in Algae, with special regard of its possible physiological roles. *Bot. Mar.* 17:23-9.
- Sivalingam, P. M., Ikawa, T. y Nisizawa, K. 1976a. Isolation and physico-chemical properties of a substance 334 from the red alga, *Porphyra yezoensis* Ueda. *Bot. Mar.* 19:1-7.
- Sivalingam, P. M., Ikawa, T. y Nisizawa, K. 1976b. Physiological roles of a substance 334 in algae. *Bot. Mar.* 19:9-21.
- Sivalingam, P. M. y Nisizawa, K. 1990. Ozone hole and its correlation with the characteristic UV-absorbing substance in marine algae. *Jpn. J. Phycol.* 38:365-70.

- Smith, R. C., Prézelin, B. B., Baker, K. S., Bidigare, R. R., Boucher, N. P., Coley, T., Karentz, D., Macintyre, S., Maltick, H. A., Menzeis, D., Ondrusek, M., Wan, Z. y Waters K. J. 1992. Ozone Depletion: Ultraviolet Radiation and Phytoplankton Biology in Antarctic Waters. *Science* 225:952-9.
- Sokal, R. R. y Rohlf, F. J. 1995. *Biometry* (3ª edición). W. H. Freeman and Company. New York. 850 pp.
- Steinrücken, H. C. y Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvulshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94:1207-12.
- Stochaj, W. R., Dunlap, W. C. y Shick, J. M. 1994. Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of spectral irradiance on chemical composition and content. *Mar. Biol.* 118:149-56.
- Takano, S., Uemura, D., y Hirata, Y. 1978a. Isolation and structure of a new amino acid, palythine, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* 26:2299-300.
- Takano, S., Uemura, D., y Hirata, Y. 1978b. Isolation and structure of two new amino acids, palythanol and palythene, from the zoanthid *Palythoa tuberculosa*. *Tetrahedron Lett.* 26:4909-12.
- Talarico, L. y Maranzana, G. 2000. Light and adaptative responses in red macroalgae; an overview. *J. Photochem. Photobiol.* 56:1-11.
- Tandeau de Marsac N. y Houmardd, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews* 104:119-90.
- Tartarotti, B. y Sommaruga, R. 2002. The effect of different methanol concentrations and temperatures on the extraction of mycosporine-like amino acids (MAAs) in algae and zooplankton. *Arch. Hydrobiol.* 154(4):691-703.
- Teai, T., Drollet, J. H., Bianchini, J. P., Cambon, A. y Martin, P. M. V. 1997. Widespread occurrence of mycosporine-like amino acid compounds in scleractinians from French Polynesia. *Coral Reefs.* 16:169-76.
- Tevini, M., Braun, J. y Fieser, G. 1991. The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem. Photobiol.* 53:329-33.
- Tsekos, I., Niell, F. X., Aguilera, J., Figueroa, F. L. y Delivopoulos, S. G. 2002. Ultrastructure of the vegetative gametophytic cells of *Porphyra leucosticta* (Rhodophyta) grown in red, blue and green light. *Phycol. Res.* 50:251-64.
- Tsujino, I. y Saito, T. 1961. Studies on the compounds specific for each group of marine alga. I. Presence of characteristic ultraviolet absorbing material in Rhodophyceae. *Bull. Faculty of Fish. Hokkaido Univ.* 12:49-58.

- Tsujino, I., Yabe, K. y Sekekawa, I. 1980. Isolation and structure of a new amino acid, shinorine, from the red alga *Chondrus yendoi* Yamada et Mikami. *Bot. Mar.* 23:65-8.
- Turpin D. H. 1991. Effects of inorganic N availability on algal photosynthesis and carbon metabolism. *J. Phycol.* 27: 14-20.
- Ullrich, W. R. 1983. Uptake and reduction of nitrate: algae and fungi. *En: Lätichli, A., Bielecki, R. L. (Eds.) Inorganic plant nutrition.* Encyclopedia of plant physiology, N. S., Vol. 15a. Springer-Verlag. Berlín. pp.307-13.
- Vergara, J. J. 1993. Modelado del metabolismo de carbono y nitrógeno en Rodofíceas. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Málaga.
- Vergara, J. J. y Niell, F. X. 1993. Effects of nitrate availability and irradiance on internal nitrogen constituents in *Corallina elongata* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 29(3):285-93.
- Vergara, J. J., Bird, K. T. y Niell, F. X. 1995. Nitrogen assimilation following NH₄⁺ pulses in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: effect on C metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122:253-63.
- Vernet, M., Neori, A. y Haxo, F. T. 1989. Spectral properties and photosynthetic action in red-tide populations of *Prorocentrum micans* and *Gonyaulax polyhedra*. *Mar. Biol.* 103:365-71.
- Vernet, M. y Whitehead, K. 1996. Release of ultraviolet-absorbing compounds by the red-tide dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Mar. Biol.* 127:35-44.
- Vincent, W. F. y Neale, P. J. 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. *En de Mora, S. J., Demers, S. y Vernet, M. (Eds.) The effects of UV radiation in the marine environment.* Cambridge Univ. Press. pp. 149-76.
- Viñebla, B. 2000. Efecto de la radiación ultravioleta sobre actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del carbono y nitrógeno en macroalgas y fanerógamas marinas. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga. Málaga.
- Wängberg, S. A., Persson, A. y Karlson, B. 1997. Effects of UV-B radiation on synthesis of mycosporine-like amino acid and growth in *Heterocapsa triquetra* (Dinophyceae). *J. Photochem. Photobiol.* 37:141-6.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of Chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144:307-13.
- Whitehead, K. y Vernet, M. 2000. Influence of mycosporine-like amino acids (MAAs) on UV absorption by particulate and dissolved organic matter in La Jolla Bay. *Limnol. Oceanogr.* 45(8):1788-96.
- Wood, W. F. 1989. Photoadaptive responses of the tropical red alga *Eucheuma striatum* Schmitz (Gigartinales) to ultraviolet radiation. *Aqua. Bot.* 33:41-51.

- Wu Won, J. J., Rideout J. A. y Chalker, B. E. 1995. Isolation and structure of a novel mycosporine-like amino acid from the reef-building corals *Pocillopora damicornis* and *Stylophora pistillata*. *Tetrahedron Lett.* 36:5255-6.
- Wu Won, J. J., Chalker, B. E. y Rideout, J. A. 1997. Two new UV-absorbing compounds from *Stylophora pistillata*: sulfate esters of mycosporine-like amino acids. *Tetrahedron Lett.* 38:2525-6.
- Wulff, A., Nilsson, C., Sundbäck, K., Wängberg, S. -A. y Odmark, S. 1999. UV radiation effects on microbenthos-a four months field experiment. *Aquat. Microb. Ecol.* 19:269-78.
- Wulff, A., Wängberg, S. -A., Sundbäck, K., Underwood, G. J. C. y Nilsson, C. 2000. Effects of UVB radiation on a marine microphytobenthic community growing on a sand-substratum under different nutrient conditions. *Limnol. Oceanogr.* 45:1144-52.
- Xiong, F. S., Lederer, F., Lukavsky, J. y Neadbal, L. 1996. Screening of freshwater algae (Chlorophyta, Chromophyta) for ultraviolet-B sensitivity of the photosynthetic apparatus. *J. Plant Physiol.* 148:42-8.
- Xiong, F. S., Komenda, J., Kopecky, J. y Neadbal, L. 1997. Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiol. Plant.* 100:378-88.
- Xiong, F. S., Kopecky, J. y Nedbal, L. 1999. The occurrence of UV-B absorbing mycosporine-like amino acids in freshwater and terrestrial microalgae (Chlorophyta). *Aquat. Bot.* 63:37-49.
- Yakovleva, I. M., Dring, M. y Titlyanov, E. A. 1998. Tolerante of North Sea algae to UV and visible radiation. *Russ. J. Plant Physiol.* 45(1):45-54.
- Yakovleva, I. M. y Titlyanov, E. A. 2001. Effect of high visible and UV irradiance on subtidal *Chondrus crispus*: stress, photoinhibition and protective mechanisms. *Aquat. Bot.* 71:47-61.
- Yoshida T. y Sivalingam, P. M. 1970. Isolation and characterization of the 337 m μ UV-absorbing substance in red alga, *Porphyra yezoensis* UEDA, *Plant Cell Physiol.* 11:427-34.
- Young, H. y Patterson, V. J. 1982. A UV protective compound from *Glomerella cingulata*-a mycosporine. *Phytochem.* 21:1075-7.
- Zudaire, L. y Roy, S. 2001. Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira Weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 62:26-34.

