



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina**

**Profesor Patrocinante
Dr. Iván Gómez Ocampo
Instituto de Biología Marina
Facultad de Ciencias**

**“Influencia de la radiación UV sobre el rendimiento fotoquímico y
asimilación de carbono en *Lessonia nigrescens* de la costa de
Valdivia”**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Biólogo Marino.

PAULA JULIA SOLEDAD VEGAS RIVEROS

VALDIVIA – CHILE

2005

Dedicado a mis padres
Gustavo y Carmen Gloria

Agradecimientos

Al Dr. Iván Gómez que a pesar de las dificultades a lo largo del camino continuo brindándome su apoyo y conocimientos, le agradezco en forma especial las largas conversaciones realizadas en torno a la fotobiología. Al Dr. Daniel Várela y la Dra. Miren Alberdi por su colaboración en la realización de esta tesis.

A mis padres Gustavo y Carmen Gloria por hacer de mí la persona que soy, por apoyarme en todos los caminos que he tomado en mi vida. A ti papá por mostrarme desde que era muy niña, la inmensidad del mar en las playas de Quintero, creo firmemente que tu eres el mayor culpable de haber elegido en mi vida ser Bióloga Marina. A ti mamá por ser mi amiga y compañera por ayudarme a levantar en momentos difíciles y por inculcarme el sentido de la responsabilidad en cada uno de tus actos. Gracias papis sin su apoyo ninguno de mis sueños se hubiesen realizado. A mis hermanitos Tito y Cotila los quiero mucho y le agradezco el nunca haberse alejado de mi a pesar de estar a 800 kilómetros de distancia, espero que siempre estén orgullosos de mi como yo lo estoy de ustedes.

A mis amigos de toda la vida Hernán, Leticia y María José ustedes han sido testigos que mi mayor sueño siempre fue, pertenecer al mar. Desde la distancia siempre estuvieron conmigo cuando los necesite el teléfono sonó inmediatamente y sus voces estaban al otro lado para apoyarme.

A mis compañeros y amigos de mi querida ciudad de Valdivia han sido largos años lejos de casa, en los cuales ustedes se convirtieron poco a poco en mi familia, les agradezco la amistad que me han entregado en especial a mis compañeros de Generación y a mis amigos Bunkerianos.

Te agradezco a ti amor mío, Elias. Eres mi fiel compañero el que me ayuda en mis días de más tormentas, te agradezco por entregarme tu amor, conocimientos y tener siempre una palabra de apoyo. Gracias simplemente por amarme así. Te amo.

Índice.

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Resumen..... | 1 |
| 2 | Abstract..... | 3 |
| 3 | Introducción..... | 5 |
| 3.1 | Hipótesis..... | 17 |
| 3.2 | Objetivo general..... | 18 |
| 3.3 | Objetivos específicos..... | 18 |
| 4 | Material y método..... | 19 |
| 4.1 | Material..... | 19 |
| 4.2 | Métodos..... | 19 |
| 5 | Resultados..... | 26 |
| 5.1 | Variación morfo-funcional de la asimilación de carbono..... | 26 |
| 5.2 | Efecto de la exposición a radiación UV sobre la fotosíntesis..... | 29 |
| 5.3 | Variación estacional en la asimilación de ^{14}C | 37 |
| 6 | Discusión..... | 41 |
| 6.1 | Caracterización de los patrones morfo-funcionales..... | 41 |
| 6.2 | Efectos de la radiación UV..... | 42 |
| 6.3 | Variación estacional..... | 46 |
| 7 | Conclusión..... | 49 |
| 8 | Bibliografía..... | 50 |

Índice de figuras.

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figura 1 | Amortiguamiento fotoquímico, disipación de calor y fluorescencia..... | 7 |
| Figura 2 | Ciclo “Calvin-Benson”..... | 8 |
| Figura 3 | Carboxilación no-fotosintética o “ β -carboxilación”..... | 9 |
| Figura 4 | Partes estructurales de <i>Lessonia nigrescens</i> | 14 |
| Figura 5 | Fraccionamiento dicotómico de la fronda con formación de frondas y estipes secundarios. | 14 |
| Figura 6 | Aspecto de la comunidad y ejemplar de <i>Lessonia nigrescens</i> del intermareal expuesto de Valdivia..... | 19 |
| Figura 7 | Obtención de muestras para los diferentes experimentos. | 20 |
| Figura 8 | Toma de muestra para el perfil longitudinal en la asimilación de ^{14}C en frondas..... | 21 |
| Figura 9 | Esquema del sistema de incubación termorregulado, indicando la disposición de los tratamientos (lámparas y filtros) utilizados para exposición de los discos de algas..... | 22 |
| Figura 10 | Contador de centelleo Packard TRI-CARB 2100TR..... | 23 |
| Figura 11 | Fluorómetro portátil PAM 2000 usado para la determinación de rendimiento cuántico máximo..... | 24 |
| Figura 12 | Cinética de emisión de fluorescencia..... | 24 |
| Figura 13 | Espectroradiómetro SUV-100 y radiómetro de bandas GUV-511..... | 25 |
| Figura 14 | Asimilación ^{14}C en rizoide, estipes y frondas. Las barras grises corresponden a la asimilación ^{14}C fotosintética y las barras negras la no-fotosintética. Los datos son medias \pm error estándar..... | 26 |

| | | |
|------------------|--|-----------|
| Figura 15 | Asimilación de ^{14}C en frondas de algas chicas, medianas y grandes. Las barras grises corresponden a la asimilación fotosintética y las barras negras la asimilación no-fotosintética. Los datos son medias \pm error estándar..... | 27 |
| Figura 16 | Perfil longitudinal de asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética en 3 frondas individuales..... | 28 |
| Figura 17 | Porcentaje de Fotoinhibición de Fv/Fm en <i>L. nigrescens</i> versus la Dosis Biológicamente Efectiva (Jones & kok, 1966) de radiación UV durante 24 hrs de exposición. Los datos son medias \pm error estándar (n=10)..... | 30 |
| Figura 18 | Fotoinhibición y recuperación medida como rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm) en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. Los datos son medias \pm error estándar (n=10)..... | 31 |
| Figura 19 | Porcentaje de Fotoinhibición de asimilación de ^{14}C fotosintética <i>L. nigrescens</i> versus la Dosis Biológicamente Efectiva (Jones & kok, 1966) de radiación UV durante 24 hrs de exposición. Los datos son medias \pm error estándar (n=3)..... | 33 |
| Figura 20 | Fotoinhibición y recuperación medida como asimilación de ^{14}C fotosintética en los diferentes tratamientos para cada tiempo de exposición. Los datos corresponden a la media y error estándar (n=3)..... | 34 |
| Figura 21 | Porcentaje de inhibición de asimilación de ^{14}C no-fotosintética en <i>L. nigrescens</i> versus la Dosis Biológicamente Efectiva (Jones & Kok, 1966) de radiación UV durante 24 hrs de exposición. Los datos muestran la media y el error estándar (n=3)..... | 36 |
| Figura 22 | Fotoinhibición y recuperación medida como asimilación de ^{14}C no-fotosintética en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. Los datos corresponden a la media y error estándar (n=10)..... | 36 |
| Figura 23 | Correlación entre la asimilación de ^{14}C fotosintética y las dosis de radiación UV-B, UV-A y PAR encontradas entre Abril de 2004 y Enero de 2005..... | 39 |

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 24 | Correlación entre la asimilación de ^{14}C fotosintética y la razón UV-B/UV-A..... | 39 |
| Figura 25 | Correlación entre la asimilación de ^{14}C no-fotosintética y las dosis de radiación UV-B, UV-A y PAR encontradas entre Abril de 2004 y Enero de 2005..... | 40 |
| Figura 26 | Correlación entre la asimilación de ^{14}C no-fotosintética y la razón UV-B/UV-A..... | 40 |

Índice de tablas.

| | | |
|----------------|--|-----------|
| Tabla 1 | Irradiancia experimental para los diferentes tratamientos y irradiancia ponderada de acuerdo al espectro de acción para fotoinhibición de fotosíntesis en cloroplastos aislados descritos por Jones & Kok 1966. ^a PAR medido en $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ | 21 |
| Tabla 2 | Porcentaje de fotoinhibición y recuperación de fotosíntesis en relación al rendimiento cuántico máximo en <i>L. nigrensens</i> . Los datos son medias \pm error estándar (n=10). Son indicados los resultados de ANOVA bifactorial, grupos homogéneos de las medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA bifactorial. *** $P < 0.001$; ns= no significativo..... | 29 |
| Tabla 3 | Porcentaje de fotoinhibición y recuperación de fotosíntesis en relación a la asimilación de ^{14}C fotosintética en <i>L. nigrensens</i> . Los datos son medias \pm error estándar (n=3). Son indicados los resultados de ANOVA bifactorial, grupos homogéneos de las medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA bifactorial. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns= no significativo..... | 32 |
| Tabla 4 | Porcentaje de fotoinhibición y recuperación de fotosíntesis en relación a la asimilación de ^{14}C no-fotosintética en <i>L. nigrensens</i> . Los datos son medias \pm error estándar (n=3). Son indicados los resultados de ANOVA bifactorial, grupos homogéneos de las medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA bifactorial. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns= no significativo..... | 35 |
| Tabla 5 | Asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética entre los meses de Abril de 2004 a Enero de 2005. Los datos son medias \pm error estándar (n=3). Son indicados los resultados de ANOVA una-vía, grupos homogéneos para la medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA una vía. *** $P < 0.0001$ | 37 |
| Tabla 6 | Dosis de radiación UV-B, UV-A y PAR entre Abril de 2004 a Enero de 2005. Los datos son medias \pm error estándar de dosis diarias para cada mes. | 38 |

1. Resumen.

Uno de los factores determinantes en la variabilidad de las repuestas fotosintéticas es la variación de la radiación solar. Las disminuciones de ozono globales mostradas a través de imagen satelital entre los años 1979 a 1993 han implicado un aumento significativo de radiación UV en latitudes altas y medias. *Lessonia nigrescens* pertenece al orden Laminariales, se encuentra a lo largo de todo Chile continental y es la especie más abundante en la franja intermareal, por lo tanto representa un importante organismo para evaluar el efecto de la radiación UV sobre algunos aspectos de fotosíntesis, en particular la asimilación de carbono y fluorescencia de clorofila, y como ellos están integrados en los patrones morfo-funcionales del alga. Los experimentos se basaron en la determinación de la asimilación de ^{14}C fotosintética y no fotosintética, esta última fue medida en oscuridad. Paralelamente se llevaron a cabo medidas de fluorescencia de clorofilas del fotosistema II, medida como el rendimiento cuántico máximo (Fv/Fm), la cual indica la capacidad de conversión de energía fotónica. Ambos tipos de determinaciones fisiológicas fueron llevadas a cabo en algas previamente expuestas, a partir de lámparas a distintas combinaciones de radiación UVB, UVA y visible (PAR). Los resultados muestran una diferenciación a lo largo del talo de la asimilación de ^{14}C donde las mayores tasas se encuentran en las frondas, en particular, la zona meristemática muestra mayor asimilación de ^{14}C no-fotosintética lo cual podría indicar una relación entre ésta y la actividad de crecimiento. La exposición a altas dosis de UV-B activaron los mecanismos de fotoprotección del alga produciendo fotoinhibición primeramente en Fv/Fm seguida de la asimilación de ^{14}C la recuperación de dichos parámetros fue alta para Fv/Fm y muy baja para la asimilación de ^{14}C reflejando una fotoinhibición crónica producida probablemente por la disminución de las tasas de transporte de electrones. Una variación

estacional de la asimilación de carbono solo fue observada en el caso de la asimilación de carbono no-fotosintética, la cual podría estar asociada a las fases de crecimiento del alga. No se observó correlación entre la asimilación de ^{14}C y las dosis de radiación solar medidas en Valdivia. Se concluye que la exposición a dosis de radiación UV, equivalente a la dosis de verano en el hábitat natural, a) afecta la asimilación de ^{14}C y Fv/Fm, b) dosis de UV-B entre 100 a 400 kJ m^{-2} causaron un 50 % de fotoinhibición de Fv/Fm, y aproximadamente un 100 % de la asimilación ^{14}C . Existen altas tasas de asimilación de ^{14}C en oscuridad y éstas no muestra variación relacionadas a dosis de UV.

2. Abstract

Solar radiation is a major factor determining the variability in the photosynthetic responses. The global decreases of ozone as shown through image satellite among the years 1979 at 1993 have implied a significant increase of radiation UV over high and midlatitudes. *Lessonia nigrescens* Bory, 1826 belonging to the order Laminariales, occurs along the Chilean coast and is the most abundant species at the intertidal fringe. Thus, the species represents a key organism which is suitable to evaluate the effect of the radiation UV on two major physiological parameters related to photosynthesis: carbon assimilation and chlorophyll fluorescence. The study was focused on the comparative effect of exposure to a combination of UV and PAR irradiances and dosage on light ^{14}C assimilation and light-independent ^{14}C assimilation (measured in the dark) as well as the quantum efficiency measured as chlorophyll fluorescence of photosystem II (PSII). The results show a differentiation along the thallus in the ^{14}C assimilation with the highest rates being found in the leaves. The highest rates of light-independent ^{14}C assimilation were measured in the meristematic region of the frond which may be related to enhanced growth activity at this frond part. The exposure to high doses of UV-B activated the mechanisms of photoprotection of the alga expressed as photoinhibition of photosynthesis firstly in the photochemical processes (chlorophyll fluorescence) followed by the assimilation of carbon. In general, the recovery following a shaded phase of algae was high for the chlorophyll fluorescence and slow for the assimilation of carbon reflecting a chronic photoinhibition probably as a consequence the decrease in the electron transport rates. The non photosynthetic ^{14}C assimilation of carbon showed a seasonal variation, which could be associated to the growth phases of the alga. No correlation among the ^{14}C assimilation and doses of solar radiation at Valdivia was detected. It is concluded

that the exposure to doses of radiation UV, equivalent to summer dose in the natural habitat, a) affect both ^{14}C assimilation and quantum yield of fluorescence, b) weighted UV-B doses between 100 and 400 kJ m^{-2} were required to cause 50 % photoinhibition of chlorophyll fluorescence, whereas at similar doses decreases in ^{14}C assimilation were close to 100 %, c) high rates of assimilation of ^{14}C exist in darkness and these don't show variation related to dose of UV.

3. Introducción.

La radiación solar biológicamente relevante comprende tres fracciones: la radiación ultravioleta o UV (en la banda de 280-400 nm) correspondiente al 10 % de la radiación incidente, la radiación fotosintéticamente activa o PAR (entre 400-700 nm) equivalente al 40% y la radiación infrarroja (entre 700-3000 nm) equivalente al 50%. Dentro de la radiación UV se encuentra la UV-C (>280 nm); la radiación UV-B que comprende entre 280-315 nm y la UV-A entre 315-400 nm (Holm-Hansen *et al.* 1993).

En las plantas la luz desarrolla diversas funciones entre ellas: ser la fuente de energía necesaria para la asimilación de carbono, participar en la disrupción de las moléculas de agua, activar las clorofilas y ser una señal ambiental reguladora y moduladora de diversos procesos metabólicos y de desarrollo (Strasburger, 1994). Las plantas en forma esencial pueden percibir la banda fotosintética, además de detectar radiación UV y roja lejana con fotorreceptores específicos (Häder & Figueroa, 1997).

Fotosíntesis se denomina a una serie de complejos procesos por medio de los cuales los organismos vegetales (entre ellos las algas) y cianobacterias pueden convertir la energía radiante del sol, en energía química. El proceso se divide en dos fases: fotoquímica, utilización de la energía lumínica para formar ATP y NADPH (energía y poder reductor) y fase de reducción del CO₂ en que el ATP y NADPH formados, a partir de los procesos fotoquímicos iniciales, son utilizados como fuente de energía y poder reductor respectivamente.

Procesos fotoquímicos y fluorescencia de clorofilas: La luz solar (fotones) es absorbida por los pigmentos fotosintéticos que se encuentran en los cloroplastos. En las algas existen tres pigmentos principales que están directamente involucrados en la fotosíntesis: Clorofilas,

Ficobiliproteínas y Carotenoides. En el caso de la clorofila existen varios tipos, entre ellos *a*, *b*, *c₁* y *c₂*. La clorofila *a* es esencial en los centros de reacción y se encuentra en todas las algas, la clorofila *b* se encuentra en el grupo de las Chlorophytas y las clorofilas *c₁* y *c₂* en el grupo de las Phaeophytas. Las Ficobiliproteínas son comunes en Rhodophyta y Cianobacterias. El que la clorofila sea el pigmento central de la fotosíntesis se debe al gran número de dobles enlaces conjugados en la molécula, lo cual permite la existencia de numerosos electrones móviles (electrones π), y por lo tanto se requiere muy poca energía para elevar un electrón π a un nivel superior. Los pigmentos fotosintéticos se organizan en estructuras denominadas antenas, las cuales están rodeando a los centros de reacción (chl *a*), cuya función es transformar la energía fotónica en electroquímica. En general, los fotones absorbidos (denominados excitones) son canalizados a través de resonancia entre moléculas vecinas al centro de reacción. Por esta razón la energía de excitación puede alcanzar finalmente la molécula de clorofila *a*, del centro de reacción, con el fin de ser incluida en el proceso redox de la fotosíntesis. Otra propiedad de la clorofila es actuar como protector del sistema fotosintético, al disipar el exceso de energía a través de fluorescencia que consiste en la emisión de un fotón de baja energía entre 660-760 nm. El conjunto de moléculas de los complejos antena y centro de reacción se denomina Fotosistema (PS) y básicamente se distinguen dos, PSI y PSII (Strasburger, 1994).

La energía absorbida en los centros de reacción puede ser usada en tres vías diferentes: a) conversión de energía fotoquímica del PSII, b) disipación no fotoquímica de energía de excitación desde el complejo antena y los centros de reacción, ejemplo, como calor y c) disipación como fluorescencia (complementaria al resto de vías). Cuando se utiliza la fluorescencia de clorofilas para medir fotosíntesis, los aumentos de la disipación no-fotoquímica y fotoquímica se conocen como “amortiguamiento”, en inglés “quenching” (Schreiber *et al.*

1994; Fig. 1). Por este motivo la fluorescencia de clorofila es considerada una indicadora de la actividad fotosintética, ya que los cambios en la eficiencia de emisión de fluorescencia reflejan cambios en la eficiencia fotoquímica y en los mecanismos de disipación de calor. La eficiencia de emisión es mayor cuanto menor es el amortiguamiento no fotoquímico.

La fluorescencia de la clorofila se origina principalmente en el PSII mientras que la transferencia de la energía de excitación al PSI debe ser considerada como una vía adicional y competitiva de de-excitación (Fig. 1) ya que a temperatura ambiente más del 90 % de la emisión de fluorescencia se origina en la clorofila presente en el PSII (Briantais *et al.* 1986).

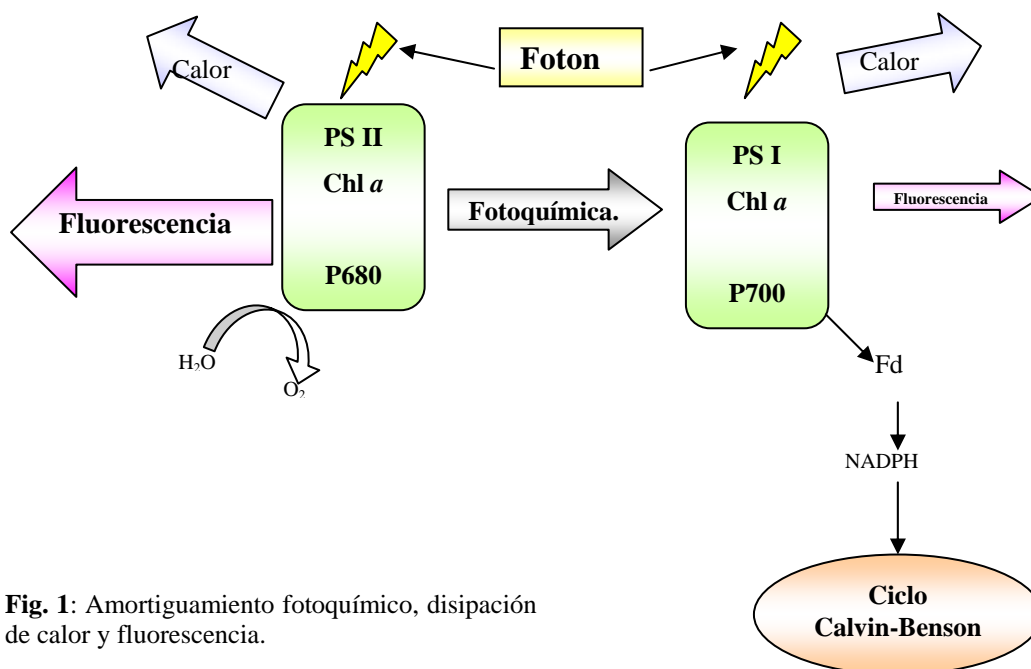


Fig. 1: Amortiguamiento fotoquímico, disipación de calor y fluorescencia.

Asimilación de carbono: La asimilación de carbono consiste básicamente en un proceso llamado ciclo de “Calvin-Benson” (Fig. 2). En la fotosíntesis, la luz tiene la misión de preparar equivalentes reductores y ATP (poder asimilador), sin embargo, para la fijación y reducción del CO_2 la luz no es directamente necesaria. Por ello las reacciones enzimáticas que se dan en el estroma del cloroplasto reciben el nombre de “reacciones oscuras”, aunque normalmente se den

junto con el transporte de electrones y al llegar la oscuridad cesen a consecuencia del agotamiento de poder asimilador y del sustrato adecuado para la reacción de carboxilación. La enzima que cataliza la reacción de asimilación es la Ribulosa 1,5, bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco). La transformación del CO₂ con ayuda del poder de asimilación se formula de la siguiente manera:



La vía del carbono se estableció gracias al uso de ¹⁴CO₂ radiactivo. Este método se basa en la incorporación de ¹⁴C en forma de carbono inorgánico dentro de un ácido-estable de carbono orgánico para formar por ejemplo, el ácido fosfoglicérico, (una triosa o C-3) (Falkowski & Raven, 1997). Para ello se utilizaron primeramente las algas como organismos de estudio. Estas algas fueron colocadas en un medio que contenía ¹⁴C y se iluminaron por periodos cortos; se mataron rápidamente, se extrajeron los productos que contenían ¹⁴C, se separaron por cromatografía y se identificaron por comparación con sustancias conocidas.

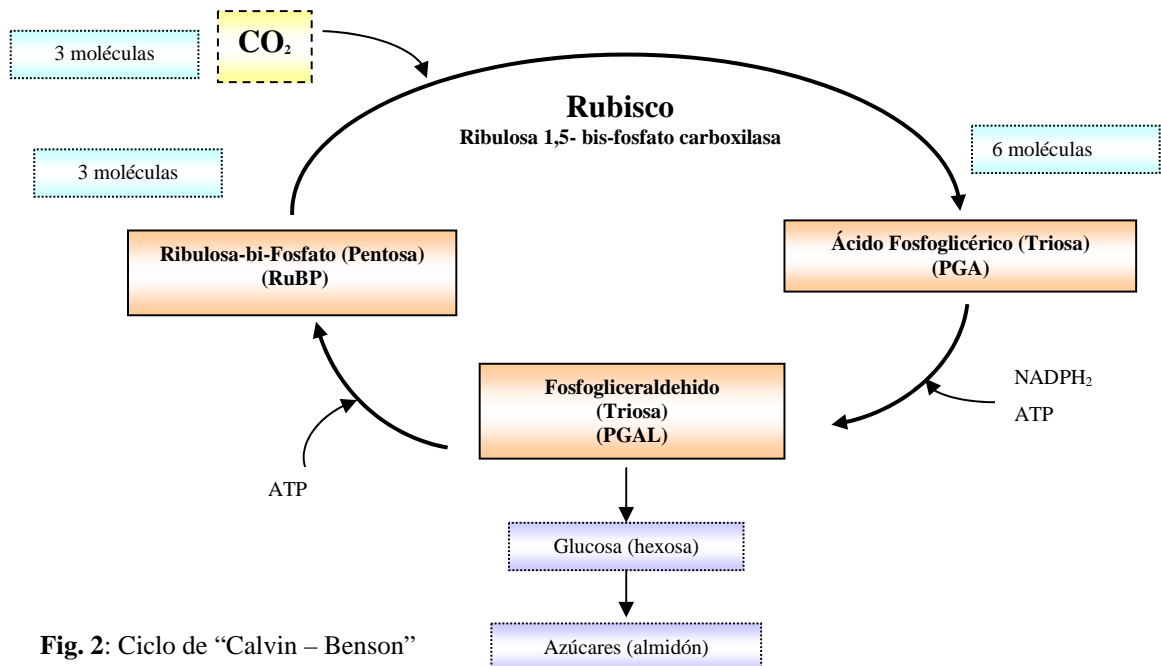


Fig. 2: Ciclo de “Calvin – Benson”

Las plantas terrestres solo pueden conseguir el carbono inorgánico como CO_2 . En el caso de las algas también pueden utilizar HCO_3^- , ya que mucho del carbono inorgánico en el océano puede estar disponible como bicarbonato. La enzima anhidraza carbónica estaría realizando el equilibrio entre la utilización de CO_2 y HCO_3^- .

Las algas contienen enzimas que pueden convertir compuestos C-3 y C-4 por carboxilación y decarboxilación. Varios ácidos oxalacéticos (OAA) intermediarios del ciclo de Krebs actúan como aceptores de carbono desde la glicólisis. Estos son usados en biosíntesis a través de reacciones anapleuróticas (Lobban & Harrison, 1996). Varias enzimas carboxilasas tienen la capacidad de fijar carbono inorgánico para formar moléculas C-4, lo que se conoce como fijación de carbono en la oscuridad, carboxilación no-fotosintética o “ β -carboxilación” (Fig. 3). Existen dos enzimas particularmente importantes, la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC).

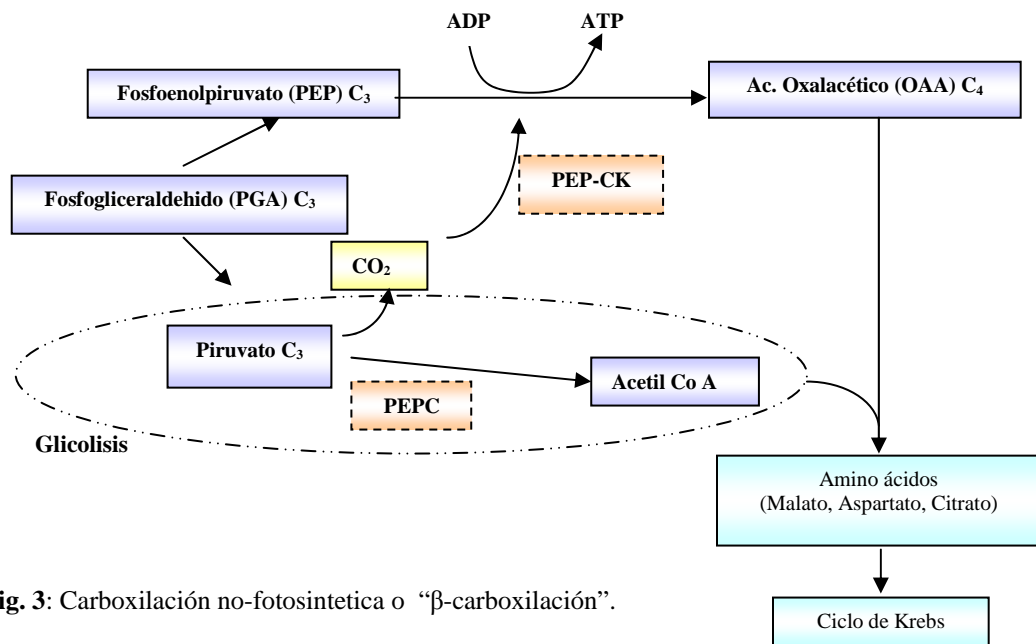


Fig. 3: Carboxilación no-fotosintética o “ β -carboxilación”.

Las algas pardas (Phaeophytas) poseen altas tasas de fijación de carbono independientes de la luz, formándose malato, aspartato, citrato y alanina vía PEPCK. En algas denominadas “kelps” (orden Laminariales), la β - carboxilación puede llegar a constituir más del 20% del total del carbono fijado en el alga. La PEPCK permite recuperar parte del CO_2 perdido cuando el piruvato es convertido en acetil co-enzima A en la glicólisis. No hay diferencia en el rendimiento de energía porque el ATP se genera del PEP, sí el PEP se usa en la fijación del CO_2 o se convierte en piruvato en la glicólisis. Diversos azúcares de bajo peso molecular (ejemplo, manitol) pueden ser usados como sustrato en la glicólisis: en teoría un mol de manitol rinde dos moles de PEP y puede refijar 2 moles de CO_2 (Kremer, 1981). El CO_2 fijado en los compuestos C-4 no tiene que ser liberado de nuevo para regenerar el sustrato de los compuestos C-3, sino que ahí mismo puede haber fijación de carbono neta (Lobban & Harrison, 1996).

Contexto ambiental y radiación solar: Las reducciones en el ozono estratosférico (O_3) permiten que más radiación solar UV-B alcance la superficie de la tierra y por ende muchos procesos químicos y biológicos que ocurren en la biosfera y la troposfera podrían verse afectados (Madronich *et al.* 1994). En la zona polar del Hemisferio Sur, el nivel superficial de ozono muestra una disminución del 7% por década (Madronich *et al.* 1994). Una disminución del 1% del ozono estratosférico total puede causar un incremento del 2% de UV-B que llega a la superficie de la Tierra, dependiendo de la estación y el ángulo cenital del sol. Si bien la UV-B es menor al 1% del flujo total de radiación solar que llega a la superficie de la Tierra ésta es altamente energética y el impacto en los organismos puede ir desde daño en las estructuras celulares, alteración en los procesos de productividad primaria hasta efectos a nivel del ecosistema (Cockell & Blaustein, 2001).

La degradación del ozono es causada principalmente por una perturbación antropogénica, debido a la emisión de compuestos cloro-fluoro-carbonados (CFCs) a partir de procesos industriales, incluida la polución del vértice estratosférico que ha sido una característica dominante durante un largo tiempo. El ozono y los CFCs son transportados desde latitudes bajas a las regiones polares, lo cual depende fuertemente de los procesos atmosféricos globales (Gernandt *et al.* 1998).

Los reportes sugieren que la extensión del área que corresponde a la disminución de la capa ozono esta influenciando más allá del continente Antártico y alcanza áreas pobladas del Hemisferio Sur. Estos reportes han causado mucha preocupación, particularmente, en Tierra del Fuego, la cual es una región ubicada a 1000 km al norte del continente Antártico (Orce & Helbling, 1997) y vecina a la región más austral de nuestro país. En Valdivia (40° S), la cual se encuentra al margen del vértice Antártico, la incidencia de masas de aire pobres en ozono son más bien esporádicas, sin embargo episodios de alta radiación de 305 nm han sido observados: por ejemplo el día 9 de Diciembre de 1998, que coincidió con cantidades baja de ozono en el norte de esta ciudad. Durante 2 horas las tasas de dosis (irradiancia) excedieron los $30 \mu\text{W cm}^{-2}$ y durante pocos minutos las irradiancias de UV-B fueron cercanas a $35 \mu\text{W cm}^{-2}$, muy por sobre el nivel normal que alcanza un promedio de $9 \mu\text{W cm}^{-2}$ (Lovengreen *et al.* 2000).

Macroalgas y radiación: Uno de los factores determinantes en la variabilidad en las repuestas fotosintéticas es la variación diaria de la radiación solar (Falkowski & Raven, 1997). Es usual que el exceso de luz repercuta en el aparato fotosintético y en diferentes procesos que involucran los mecanismos de defensa a los excesos de energía lumínica. La formación y activación de estos mecanismos resultan en la fotoinhibición.

La fotoinhibición probablemente es el resultado de dos procesos: primero la activación de la fotoprotección cuando las plantas poseen mecanismos que se ocupan del exceso de energía. En segundo lugar procesos de transformación del ciclo de los pigmentos xantófilos, lo cual resulta en el incremento de la disipación de la energía termal. La fotoinhibición es una función del PSII y está relacionado con los cambios estructurales de la proteína tilacoidal D1 (Hanelt *et al.* 1994, 1997; Anderson *et al.* 1997; Magnusson, 1997; Hanelt, 1998). La limitación de nutrientes como carbono y nitrógeno también pueden causar fotoinhibición (Magnusson, 1997). La fotoinhibición del PSII no es necesariamente un proceso perjudicial, sino más bien una estrategia de aclimatación de plantas al estrés lumínico, que permite la protección molecular. El retorno a condiciones normales permite que se restauren los centros del PSII que todavía acumulan proteína D1 junto con la nueva síntesis de ésta (Anderson *et al.* 1997).

Las macroalgas por ser organismos sésiles no poseen las mismas características del fitoplancton para adaptarse a los cambios de luz. Las macroalgas tienen que optimizar el uso de la luz perfeccionando la absorción de fotones PAR requeridos en su fotoquímica y evitando principalmente los efectos perjudiciales de la radiación UV (Figueroa *et al.* 2003).

Para el caso de algas del sur de Chile, en un estudio realizado en varias especies de macroalgas, *Macrocystis pyrifera*, la cual coexiste en el infra-mareal con *Lessonia nigrescens* y *Durvillaea antarctica*, presentó una variación estacional de la fotosíntesis y del contenido de pigmentos fotosintéticos lo cual podría indicar fenómenos de foto-aclimatación. De hecho esta especie muestra una disminución del 25% de la fluorescencia luego de 2,5 horas de tratamiento con radiación PAR+ UV-A+ UV-B. Esta reducción fue mayor a la encontrada en algas del intermareal medio tales como *Ulva* o *Chaetomorpha* (Gómez *et al.* 2004), las cuales tampoco presentan una marcada variación estacional en sensibilidad a la radiación solar (Vegas *et al.*

2004). En el caso del alga estuarina *Gracilaria chilensis*, común en ambientes muy turbios, la fotosíntesis decreció entre 12-15% en ejemplares expuestos a 3 horas con radiación PAR, UV-A y UV-B; luego de 3 horas en recuperación a condiciones de bajo PAR los ejemplares expuestos a radiación UV-B presentaron una menor recuperación en las tasas fotosintéticas (88%) que los tratados con PAR y UV-A (94-100%) (Gomez *et al.* 2005).

El factor morfo-funcional en algas del orden Laminariales: En términos generales las algas de este orden se dividen en tres partes estructurales: rizoide (parte adherida al sustrato), estipe y fronda (Fig. 4). En particular la Familia *Lessoniaceae* se caracteriza por un crecimiento a través de un meristema intercalar entre estipe y fronda que va agregando tejido a ambas estructuras. La fronda permanece con la misma longitud ya que el aumento de ésta, en la base de la fronda, a menudo compensa la pérdida por abrasión del ápice. Las algas sufren un fraccionamiento de la fronda dividiéndose varias veces de forma dicotómica. Este fraccionamiento se extiende bajo la base del meristema, esto significa que la producción de frondas secundarias lleva implícita la formación de estipes secundarios (Fig. 5). Las frondas de la mayoría de las Laminariales tienen una vida de un año, pero en muchos casos la base de la fronda y el estipe son perennes. La causa más frecuente de mortalidad de las frondas parece ser el desprendimiento del alga en las rocas, producido por fuertes tormentas (Lee, 1989).

En las laminariales del hemisferio norte la tasa de crecimiento es alta a fines de invierno y primavera, basado en la utilización de carbohidratos de reserva obtenidos en los meses de verano (Johnston & Raven, 1986), una estrategia que va unida a la diferenciación a lo largo del talo de la asimilación de carbono vía Rubisco y PEPC. Küpper & Kremer (1978) encontraron que la mayor actividad de Rubisco se encuentra en la zonas apicales de la fronda las cuales estas

diseñadas para realizar la fotosíntesis y el almacenamiento de sustancias orgánicas de reserva, en contraste, con la mayor actividad de PEPCK en el meristema o zona de crecimiento. En este sentido, ^aCabello-Pasini & Alberte (2001) estimaron que los niveles de pigmentos varían a lo largo del talo en Laminariales encontrándose en mayor cantidad en zonas apicales por lo tanto sugieren que fluctuaciones en los niveles de pigmentos regulan la incorporación de carbono fotosintético. En contraste con la asimilación no-fotosintética que no es dependiente de los niveles de pigmentos.



Fig. 4: Partes estructurales de *Lessonia nigrescens*.



Fig. 5: Fraccionamiento dicotómico de la fronda con formación de frondas y estipes secundarios.

En general, el efecto de la radiación UV sobre los patrones morfo-funcionales en algas pardas no ha sido evaluado en detalle. ^bGómez *et al.* (2005) determinaron un decrecimiento del 45% en el rendimiento cuántico máximo (F_v / F_m) en ejemplares de *Lessonia nigrescens* expuestas a 12 horas a radiación PAR + UV-A + UV-B, los cuales no mostraron recuperación luego de 12 horas a condiciones de bajo PAR.

Un caso de estudio: *Lessonia nigrescens* Bory, 1826 pertenece al orden Laminariales y se caracteriza por ser la especie más abundante, dominante en biomasa y cobertura en la franja intermareal-submareal de roqueríos expuestos y semi-expuestos a lo largo de Chile continental.

Pueden medir hasta 4 m de largo, de color verde-pardo posee un rizoide macizo el cual origina estipe cilíndricos que se comprimen en sentido apical, las frondas llegan a medir 20 cm de largo y son de forma linear o linear-lanceolada. En Chile se extiende de Arica a Tierra del Fuego (Santelices, 1989). Aparte de un estudio reciente (^bGómez *et al.* 2005), no existe información acerca de procesos ecofisiológicos relacionados con la luz en esta especie.

Problemática: El efecto de la radiación UV sobre los procesos fotoquímicos en varias algas intermareales incluida *Lessonia nigrescens* está establecido (Gómez *et al.* 2004, ^b2005; Vegas *et al.* 2004). Sin embargo, el efecto sobre otros procesos, que son posteriores y que involucran procesos enzimáticos, no ha sido evaluado en estas especies. En el presente estudio, se establece que los efectos de radiación UV sobre la asimilación de carbono, tiene comparativamente consecuencias diferentes para el alga que aquellos que se observan al evaluar efectos sobre el rendimiento cuántico de fluorescencia. La fluorescencia es un indicador de la actividad fotosintética y ésta junto con la concentración de pigmentos, decrece a altos niveles de radiación UV llegando a producir fotoinhibición. Por otra parte se puede asumir que en *Lessonia nigrescens* la asimilación de carbono fotosintética también es afectada por niveles altos de radiación UV; esto por una disminución en la tasa de transporte de electrones y por otro lado de un efecto directo de la radiación sobre Rubisco u otras moléculas claves del ciclo de Calvin-Benson. Por contraste, la asimilación de carbono no-fotosintético, en una primera instancia no se vería afectada ya que es dependiente de los compuestos de reserva, sin embargo, se presume que pasado un tiempo, debido al agotamiento de los precursores generados por la vía Rubisco, también exhibiría una disminución en sus tasas.

Los efectos en la asimilación de carbono a altos niveles de radiación UV variarían en distintas partes del alga ya que los procesos fotoquímicos se realizan en mayor magnitud en las frondas, por lo tanto se puede inferir que es en ésta donde la asimilación carbono fotosintética sería más afectada. Dentro de la misma fronda también existiría una variación en los efectos de la UV ya que si consideramos que la fronda puede ser dividida longitudinalmente en tres zonas; basal (meristemática), intermedia (madura) y apical, estas dos últimas serían más vulnerables ya que es ahí donde se realizan mayoritariamente los procesos fotoquímicos.

Por otro lado, es interesante evaluar el efecto de la radiación UV sobre frondas provenientes de algas de distinto tamaño (o edad). En general, la literatura (Dring *et al.* 1996; Hanelt *et al.* 1997, etc.) indica que algas de mayor tamaño son más tolerantes al exceso de radiación que ejemplares juveniles, por lo tanto se podría pensar que algas jóvenes en pleno crecimiento serían mayormente afectadas por la radiación UV que algas adultas, las cuales ya tienen una historia de exposición a la radiación, son mucho más masivas y han podido probar diferentes estrategias de fotoprotección a lo largo de su vida.

Una sincronización estacional entre la fotosíntesis y el crecimiento del alga está integrado dentro de los patrones morfo-funcionales de las algas pardas. En general, las Laminariales presentan mayor crecimiento en los meses invernales y sabemos por estudios realizados por Küpper & Kremer (1978) que la tasa de asimilación de carbono no-fotosintético aumenta en épocas de crecimiento (como consecuencia de la re-mobilización de compuesto de reserva sintetizados en verano), sin embargo, se desconoce la variación efectiva que sufren ambos tipos de asimilación (fotosintética y no-fotosintética) en Laminariales de la costas sur de Chile.

Por lo anteriormente expuesto, es relevante evaluar el efecto de la radiación UV sobre parámetros morfo-funcionales de *L. nigrescens*. Las respuestas de este organismo a las distintas

condiciones ambientales y experimentales permitirán extrapolar posibles escenarios ecofisiológicos que pueden tener consecuencias para toda la comunidad. Básicamente, el presente estudio resume diversos experimentos en los cuales se contrastaran los parámetros fotosintéticos fluorescencia de clorofila y asimilación de ^{14}C , como indicadores del efecto de diferentes condiciones de radiación UV en el laboratorio. Los resultados entregarán importante información acerca de la ecofisiología básica de la especie y su respuesta ante la radiación UV.

3.1 Hipótesis.

- a) La exposición a dosis artificiales de radiación UV equivalentes a dosis de verano en el ambiente natural resultará en una disminución de las tasas de fluorescencia de clorofila y asimilación de ^{14}C en *Lessonia nigrescens*. La disminución de la asimilación de ^{14}C ocurrirá a dosis más altas de radiación UV.
- b) Ante similares dosis de radiación UV, la asimilación de ^{14}C fotosintética se verá más afectada que la asimilación no-fotosintética.
- c) Las tasas de la asimilación de ^{14}C fotosintética (vía Rubisco) y no-fotosintética (vía PEPCK) varían a lo largo del talo de *Lessonia nigrescens*. Las frondas serían las estructuras con mayores tasas de asimilación de ^{14}C .
- d) Las tasas de la asimilación de ^{14}C fotosintética (vía Rubisco) y no-fotosintética (vía PEPCK) varían a lo largo del perfil longitudinal de frondas de *Lessonia nigrescens*. La zona de crecimiento mostraría altas tasas de asimilación de ^{14}C no-fotosintética (vía PEPCK).
- e) Debido a diferentes grados de desarrollo ontogénico frondas de algas juveniles mostrarán mayores tasas de asimilación de ^{14}C que frondas de algas adultas.

f) Existe variabilidad estacional en la asimilación de carbono fotosintética (vía Rubisco) y no-fotosintética (vía PEPCK) de *Lessonia nigrescens*. Una mayor tasa de asimilación de ^{14}C no-fotosintética será mayor a fines de invierno y primavera mientras que las mayores tasas de asimilación de ^{14}C fotosintética ocurrirán en los meses de mayor radiación solar (verano).

3.2 Objetivo general.

Determinar el efecto de la radiación UV sobre los patrones morfo-funcionales de fotosíntesis determinada como fluorescencia de clorofila (que refleja procesos fotoquímicos) y asimilación de carbono (que indica procesos bioquímicos) de *L. nigrescens* del intermareal expuesto de Valdivia, Chile. Se propone contrastar la susceptibilidad de ambos tipos de procesos bajo condiciones de laboratorio.

3.3 Objetivos específicos

1. Determinar la fluorescencia de clorofila en ejemplares de *L. nigrescens* y como ella varía en relación a diferentes condiciones experimentales de radiación UV.
2. Determinar las tasas de asimilación de ^{14}C fotosintético (vía Rubisco) y no-fotosintético (vía PEP-CK) en *Lessonia nigrescens*, como ellas varían en relación a diferentes condiciones de radiación UV y cual de ellas es más afectada.
3. Determinar los patrones de variación longitudinal en las actividades de fotosíntesis en *Lessonia nigrescens*.
4. Determinar el efecto del tamaño del alga sobre las tasas de asimilación de ^{14}C en *Lessonia nigrescens*.

4. Material y Métodos

4.1 Material

Algas: Los ejemplares de *Lessonia nigrescens* se colectaron al azar, desde el intermareal de Valdivia ($39^{\circ} 48' S/73^{\circ} 14' W$; Fig. 6) y fueron divididos en tres categorías en base al diámetro de su rizoide. Se definieron como algas “pequeñas” las que poseían un diámetro de rizoide entre 0 y 10 cm, algas “medianas” un diámetro entre 11 y 20 cm y algas “grandes” un diámetro superior a 20 cm.

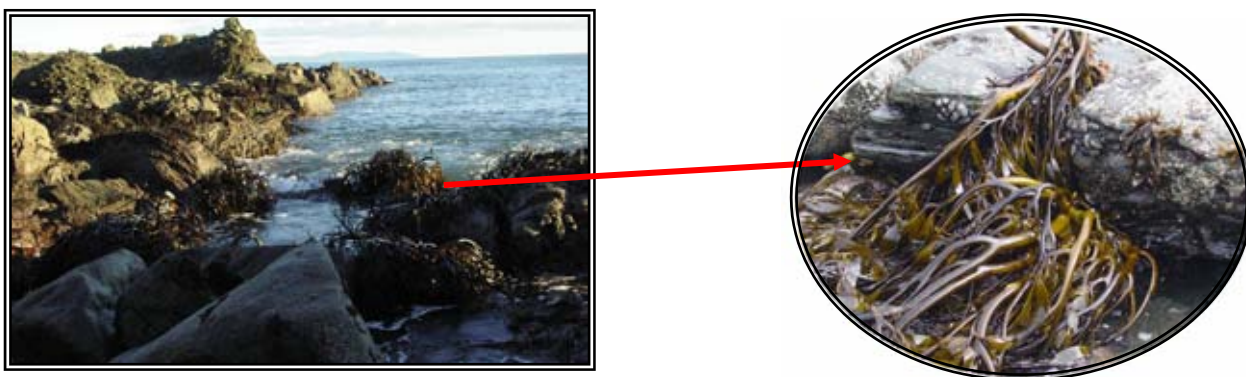


Fig. 6: Aspecto de la comunidad y ejemplar de *Lessonia nigrescens* del intermareal expuesto de Valdivia.

4.2 Métodos

4.2.1 Muestreos y preparación del material: Se realizaron muestreos entre los meses de Abril de 2004 a Enero de 2005 y en el mes de Junio de 2005. En terreno se procedió a medir la longitud de las frondas, número y longitud de estipes y diámetro del rizoide. Posteriormente los ejemplares de *L. nigrescens* fueron trasladados al Laboratorio de Fotobiología de la Universidad Austral de Chile donde permanecieron por 24 horas en recipientes de 20 L de agua de mar a 30 PSU y $13^{\circ} C$ con aireación constante, para aclimatación. Posterior a este periodo se tomaron

muestras para utilizar en los diferentes experimentos. Estas muestras consistieron en pequeños trozos de talo de 8 mm de diámetro tomados con un sacabocado a partir de las frondas, estipes y rizoides de algas “pequeñas”, “medianas” y “grandes” (Fig. 7).



Fig. 7: Obtención de muestras para los diferentes experimentos.

4.2.2 Diseño experimental:

4.2.2.1 Caracterización de la asimilación de ^{14}C a lo largo del talo:

- a) En Febrero de 2004 se determinó la asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética en Frondas, estipes y rizoide de algas medianas.
- b) En Abril de 2004 se determinó la asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética en frondas de algas pequeñas, medianas y grandes. Además se realizó un perfil longitudinal de asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética en 3 frondas de algas medianas, Para las determinaciones se realizaron cortes de 8mm de diámetro a lo largo de toda la fronda con una separación de 1 cm una de la otra para la fronda 1 y 2 y de 4 cm para la fronda 3, abarcando tres zonas distintas dentro de las frondas, a saber, zona basal (meristema), intermedia y apical (Fig. 8)

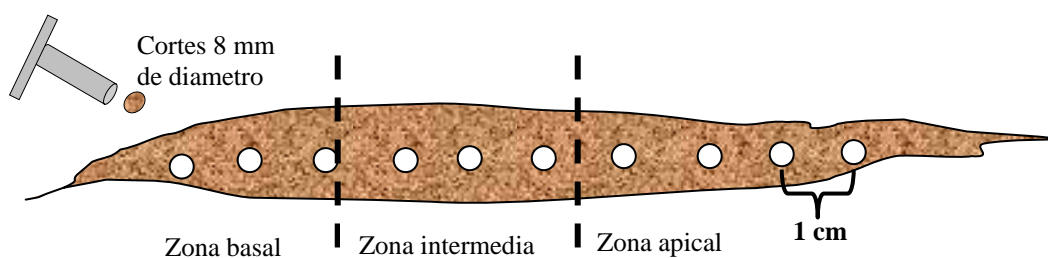


Fig 8: Toma de muestra para el perfil longitudinal en la asimilación de ^{14}C en frondas.

4.2.2.2 Tratamientos con fuentes de radiación artificial: Muestras de frondas de algas medianas fueron expuestas a tres diferentes tratamientos de radiación, utilizando lámparas de UV-B (Q-Panel 313, USA), UV-A (Q-Panel 340, USA) y PAR (Osram L36w/640) y filtros descritos a continuación:

- a) PAR+ UV-B+ UV-A = Ultrajan 295, que deja pasar todo el espectro de radiación.
- b) PAR +UV-A = Folex 320 que corta la radiación UV-B
- c) PAR = Ultrajan 395 que excluye la radiación UV-B y UV-A.

La irradiancia incidente bajo las diferentes combinaciones de lámparas y filtros es indicada en la Tabla 1. El espectro de acción de las irradiancias experimentales utilizadas para la fotoinhibición de fotosíntesis se ponderó utilizando espectros de acción para disminución de fotosíntesis determinados por Jones & Kok, (1966) en cloroplastos aislados y la dosis de UV fueron presentadas como Dosis Biológicamente Efectiva (DBE).

Tabla 1: Irradiancia experimental para los diferentes tratamientos y irradiancia ponderada de acuerdo al espectro de acción para fotoinhibición de fotosíntesis en cloroplastos aislados descritos por Jones & Kok 1966. ^a PAR medido en $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

| Tratamientos | Irradiancia experimental (Wm^{-2}) | | | Irradiancia estandarizada ($\text{Wm}^{-2}\text{s}^{-1}$) Inhibición de fotosíntesis |
|-------------------|---|------|------------------|---|
| | UV-A | UV-B | PAR ^a | |
| PAR + UV-A + UV-B | 8.57 | 2.35 | 84.2 | 4.53 |
| PAR + UVA | 5.17 | 0.16 | 84.2 | 1.34 |
| PAR | 0.78 | 0.03 | 84.2 | 0.17 |

El sistema de lámparas artificiales se dispuso a una altura de 15 cm de las muestras, las cuales fueron depositadas en recipientes de plástico transparente con 2 L de agua de mar filtrada y cada uno de ellos fue cubierto con los diferentes tipos de filtros, descritos anteriormente (Fig. 9). Las muestras fueron incubadas bajo el sistema de lámparas a tiempos de 2, 6 y 24h de exposición. Cada tiempo de exposición, fue seguido por un periodo de recuperación de 6 horas en condiciones de bajo PAR ($84.2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Al final de cada tiempo de exposición y periodo de recuperación se determinó la fluorescencia de clorofila y asimilación de ^{14}C .

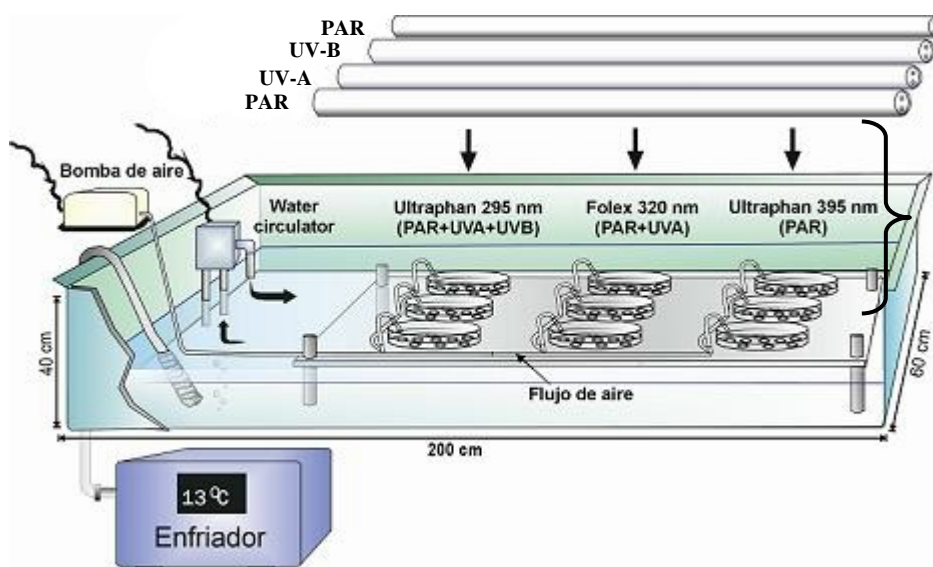


Fig. 9: Esquema del sistema de incubación termorregulado, indicando la disposición de los tratamientos (lámparas y filtros) utilizados para exposición de los discos de algas.

4.2.2.3 Variación estacional: Desde Abril de 2004 a Enero de 2005 se determinó la asimilación de ^{14}C fotosintético y no-fotosintético en muestras de frondas de algas medianas y se realizó un monitoreo constante de la radiación solar presente en Valdivia (ver sección 4.2.5).

4.2.3 Asimilación de ^{14}C : Para la determinación de la asimilación de ^{14}C en los diferentes experimentos, se utilizó el método descrito por Cabello-Pasini & Randall (1997). Discos de 8 mm

de diámetro fueron pre-incubados por 6 horas en agua de mar filtrada para la eliminación de exudados. Las muestras se incorporaron en viales de vidrio para la asimilación en luz y de plástico no-transparente para la asimilación en oscuridad y fueron incubadas por 30 minutos en 15 mL de agua de mar filtrada y esterilizada (autoclave; lámparas de UV-C), a 15 °C de temperatura con 0.67 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^{14}C para la asimilación a lo largo del talo y la variación estacional y 0.33 $\mu\text{Ci/mL}$ de ^{14}C para la asimilación en los diferentes tratamientos de radiación. En el caso de la asimilación en luz la iluminación fue provista por una lámpara PAR halógena a niveles de saturación de $250 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. El agua de incubación fue eliminada y los discos fueron lavados repetidamente con agua de mar filtrada y esterilizada. Se le agregaron 0.5 mL de NaOH al 0.5 M y 0.5 mL de Triton X-100 5% v/v, se taparon y se dejaron en oscuridad por 24 horas. Luego de este periodo se le agregaron 0.5 mL de H_2O_2 (30% v/v) para la oxidación de los pigmentos y se dejó en incubación por 24 horas más. El ^{14}C no asimilado fue volatilizado por 12 horas con 0.5 mL de HCl al 1 N, bajo campana de extracción. Finalmente se le agregaron 8 mL de líquido de centelleo (Ecoscint) para posteriormente medir la radioactividad en un contador de centelleo Packard TRI-CARB 2100TR (Fig. 10) utilizando un estándar externo.

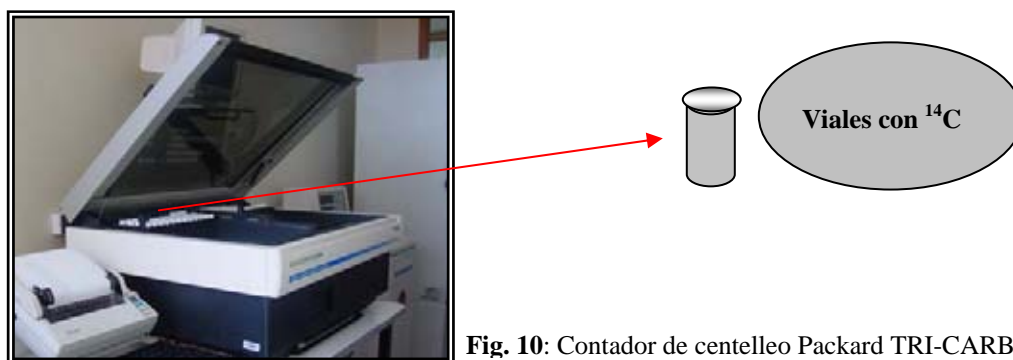


Fig. 10: Contador de centelleo Packard TRI-CARB 2100TR.

4.2.4 Determinación de fluorescencia de Clorofila: El indicador de fotosíntesis utilizado es el rendimiento cuántico máximo F_v / F_m y se define como la eficiencia máxima en los procesos de

conversión de energía fotoquímica de una planta adaptada a oscuridad. El cociente está definido por F_m que corresponde a la fluorescencia máxima y F_v corresponde a la fluorescencia variable o la diferencia entre la fluorescencia máxima (F_m) y la fluorescencia basal (F_0). Estos parámetros fueron medidos con un fluorímetro portátil de amplitud modulada PAM 2000 (Walz, Alemania; Fig. 11). Con este instrumento fue posible medir instantáneamente las cinéticas de conversión de energía y parámetros fotoquímicos en el aparato fotosintético de algas vivas. La medida inicial se realizó tras un período de incubación de las muestras de 20 minutos en oscuridad, tiempo en el cual se asume que todos los centros de reacción están oxidados o “abiertos”, el “pool” de plastoquinonas está asimismo oxidado y las ATPasas y las enzimas del ciclo de Calvin - Benson inactivas. El fluorímetro PAM-2000 emite una luz de medida de baja intensidad con un máximo de emisión a 650 nm con la que se determina el nivel basal de fluorescencia de una planta adaptada a oscuridad (F_0). Cuando se aplica el pulso de saturación se reduce por completo la quinona A (Q_A) y se alcanza el nivel máximo de fluorescencia (F_m). Es en este punto cuando están todos los centros de reacción reducidos o “cerrados” (Fig. 12). Debido a que el amortiguamiento no fotoquímico (calor) se manifiesta algunos milisegundos posterior a F_m , es posible decir que es en ese momento cuando toda la energía es disipada en forma de fluorescencia.



Fig. 11: Fluorómetro portátil PAM 2000 usado para las determinación de rendimiento cuántico máximo

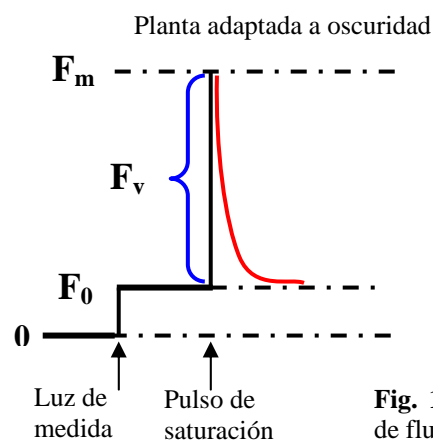


Fig. 12: Cinética de emisión de fluorescencia.

4.2.5 Monitoreo de Radiación Solar: La radiación solar en la zona de Valdivia fue monitoreada continuamente utilizando un espectroradiómetro SUV-100 y un radiómetro de bandas GUV-511 (Biospherical Instruments, USA). El primero realiza un barrido completo cada 15 minutos que permite cuantificar la radiación solar entre 280 y 605 nm. El segundo registra la radiación incidente en bandas de 10 nm centradas en 305, 320, 340 y 380 además de poseer un filtro que registra la banda ancha de PAR (400-700 nm). Estos instrumentos se encuentran en la azotea de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile (Fig.13).

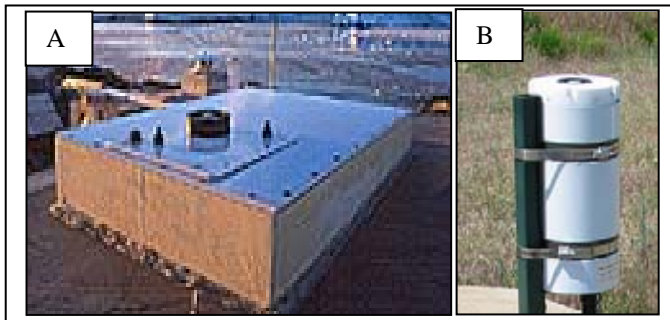


Fig. 13: A, Espectroradiómetro SUV-100; B, radiómetro de bandas GUV-511.

4.2.6 Análisis estadísticos:

-Tratamientos con lámparas artificiales: Los datos de las distintas horas de exposición/recuperación fueron comparados con ANOVA bifactorial seguido de un análisis post hoc (Tukey HSD) en el caso de existir diferencias significativas ($p < 0.05$). Para la comparación entre los tiempos de exposición y recuperación, entre los cuales se asumió covariación se utilizó MANOVA bifactorial. Los factores correspondieron a tratamientos, horas de exposición/recuperación tanto para la fluorescencia de clorofila como para la asimilación de ^{14}C . El valor de F mancomunado fue Rao's R, una transformación del estadígrafo Lambda Wilks.

-Variación estacional: Los datos fueron comparados utilizando ANOVA una-vía seguido de un análisis post hoc (Tukey HSD) cuando se presentaron diferencias ($p < 0.05$) tanto para la asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética.

Para todos los casos se utilizó el Software Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., USA).

5. Resultados.

5.1 Variación morfo-funcional de la asimilación de carbono.

5.1.1 Asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética en rizoide, estipe y frondas: La asimilación de ^{14}C fotosintético presenta un aumento desde el rizoide hacia las frondas, al contrario de la asimilación ^{14}C no-fotosintético que decrece desde el rizoide hacia las frondas (Fig. 14). Las frondas con una tasa promedio en la asimilación ^{14}C fotosintética de $43.8 \mu\text{g}^{14}\text{Ch}^{-1}\text{cm}^{-2}$ muestran ser las principales encargadas de los procesos bioquímicos del alga.

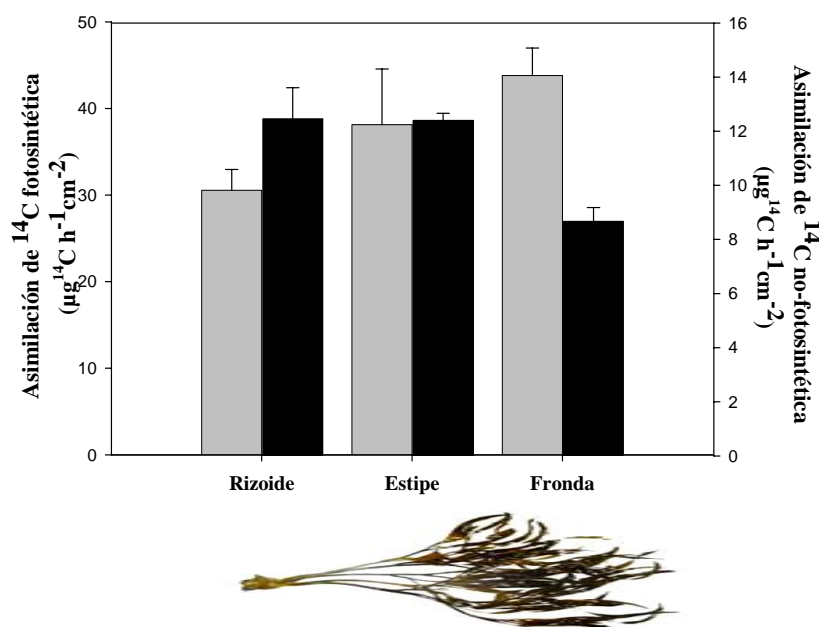


Fig. 14: Asimilación ^{14}C en rizoide, estipes y frondas. Donde las barras grises corresponden a la asimilación ^{14}C fotosintética y las barras negras la no-fotosintética. Los datos son medias \pm error estándar.

5.1.2 Efecto del tamaño del alga en la asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética de

las frondas: Las frondas de algas pequeñas y medianas presentan tasas similares de asimilación ^{14}C fotosintética y no-fotosintética con un promedio de 6 y $0.03 \mu\text{g}^{14}\text{Ch}^{-1}\text{cm}^{-2}$ respectivamente. Sin embargo, existe una clara diferencia con respecto a frondas de algas grandes ($> 20\text{cm}$ de

diámetro de rizoide) las cuales presentan un aumento de las tasas de asimilación de ^{14}C no-fotosintética con un promedio de $0.12 \mu\text{g}^{14}\text{C h}^{-1}\text{cm}^{-2}$ y una disminución de la asimilación fotosintética con una tasa promedio de $4.8 \mu\text{g}^{14}\text{C h}^{-1}\text{cm}^{-2}$ (Fig. 15).

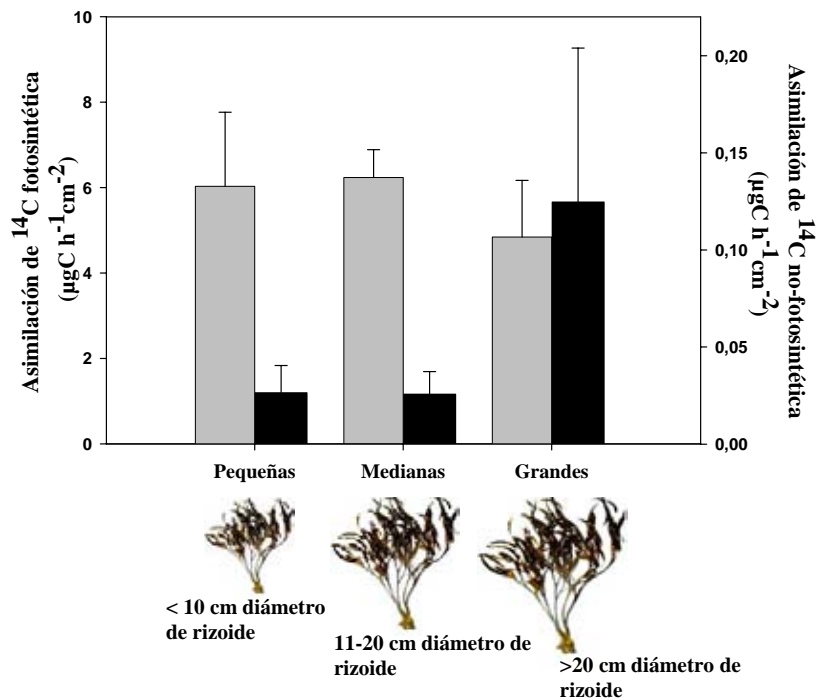


Fig. 15: Asimilación de ^{14}C en frondas de algas chicas, medianas y grandes. Las barras grises corresponden a la asimilación fotosintética y las barras negras la asimilación no-fotosintética. Los datos son medias \pm error estándar.

5.1.2 Perfil longitudinal de asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética en frondas: La zona meristemática presenta las mayores tasas de asimilación de ^{14}C no-fotosintética en la fronda 1 y 3, en la fronda 2 las tasas son bajas, sin embargo, se observa un aumento hacia la zona apical concordante con la baja en la asimilación fotosintética. La asimilación fotosintética, a pesar de la disminución mostrada en el punto n°4 de la fronda 2, en general presenta altas tasas en las zonas intermedias de las frondas. Al observar en detalle, como ejemplo en el punto n°6 de la fronda 1, notamos que existe un aumento de la asimilación de ^{14}C no-fotosintética cada vez que la asimilación de ^{14}C fotosintética disminuye (Fig.16).

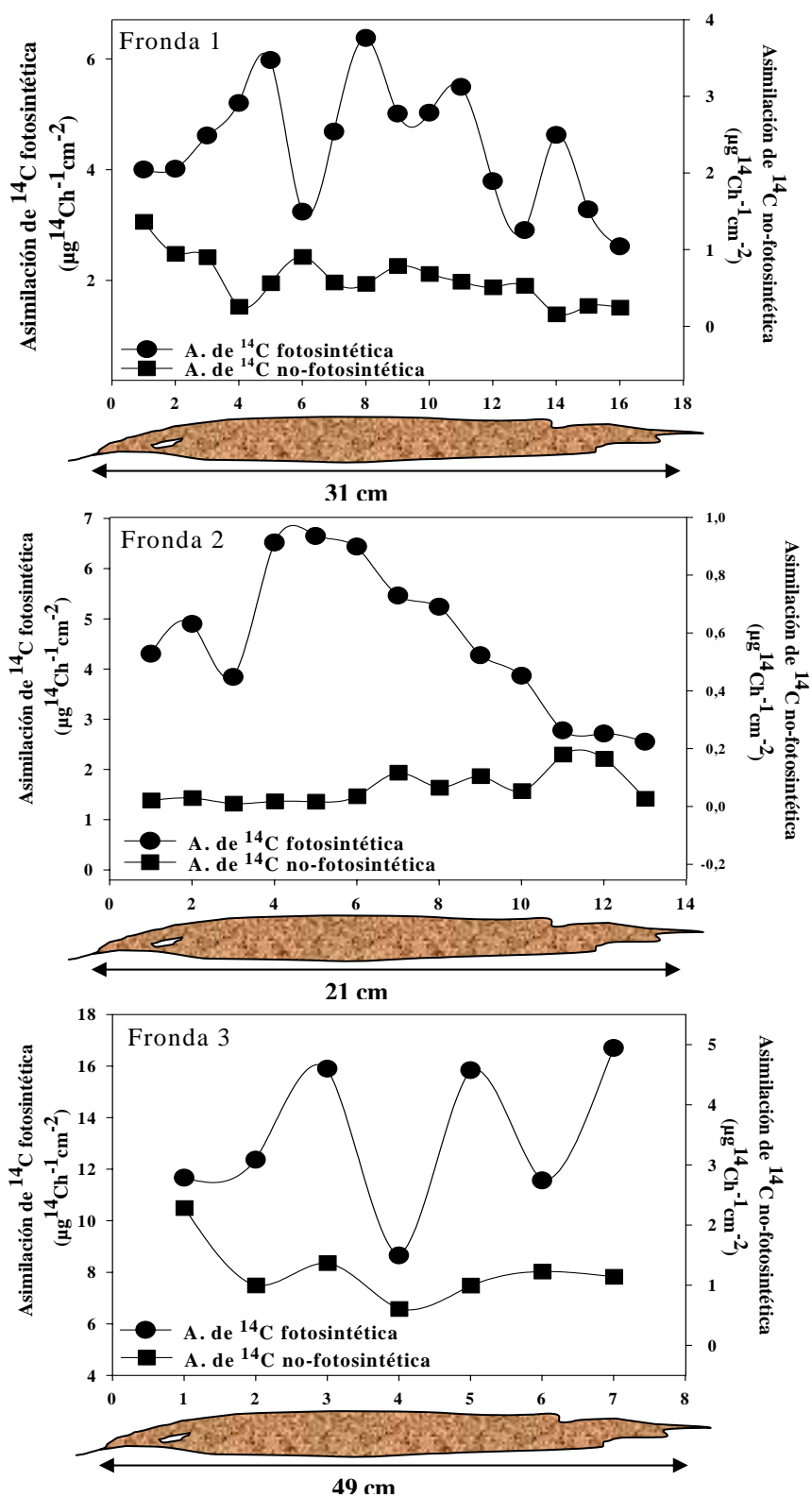


Fig.16: Perfil longitudinal de asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética en 3 frondas individuales.

5.2 Efecto de la exposición a radiación UV sobre la fotosíntesis.

5.2.1 Fluorescencia de clorofila: La media de los valores iniciales del rendimiento cuántico máximo (F_v / F_m) correspondió a 0.670 ± 0.013 , a partir de este valor se calculo el porcentaje de fotoinhibición y recuperación de discos de frondas de algas medianas expuestos a diferentes tratamientos de radiación. Los porcentajes de fotoinhibición y recuperación presentaron diferencias estadísticamente significativas para los tiempos de exposición y los tratamientos de radiación (ANOVA bifactorial; Tukey HSD; Tabla 2). Los parámetros de fotoinhibición y recuperación covariación para los tiempos de exposición y los tratamientos de radiación lo cual fue confirmado por los resultados del MANOVA bifactorial (Rao's R; $p < 0.001$; Tabla 2).

Tabla 2: Porcentaje de fotoinhibición y recuperación de fotosíntesis en relación al rendimiento cuántico máximo en *L. nigrescens*. Los datos son medias \pm error estándar ($n=10$). Son indicados los resultados de ANOVA bifactorial, grupos homogéneos de las medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA bifactorial. *** $P < 0.001$; ns= no significativo.

| Tiempo exp. / Tratamientos | Rendimiento cuántico máximo (F_v / F_m) | | | |
|----------------------------|---|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | % Fotoinhibición | | % Recuperación | |
| 2 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 30.31 \pm 1.99 d | | 95.10 \pm 2.54 d | |
| PAR + UV-A | 7.90 \pm 3.40 a | | 108.13 \pm 1.88 e | |
| PAR | 7.65 \pm 1.26 a | | 100.06 \pm 3.41 e | |
| 6 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 45.21 \pm 4.96 e | | 77.19 \pm 4.27 b | |
| PAR + UV-A | 31.62 \pm 5.75 d | | 94.89 \pm 2.60 d | |
| PAR | 17.34 \pm 2.20 b | | 94.88 \pm 3.88 d | |
| 24 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 48.35 \pm 4.20 e | | 67.30 \pm 5.77 a | |
| PAR + UV-A | 25.93 \pm 3.10 c | | 81.58 \pm 3.23 c | |
| PAR | 33.49 \pm 4.57 d | | 76.43 \pm 3.73 b | |
| ANOVA bifactorial | | | | |
| Factor | MS | F - valor | MS | F - valor |
| Tiempo (A) | 3529.23 | $F_{(2;81)} = 25.08^{***}$ | 5073.80 | $F_{(2;81)} = 38.29^{***}$ |
| Tratamiento (B) | 4298.5 | $F_{(2;81)} = 30.55^{***}$ | 1783.20 | $F_{(2;81)} = 13.46^{***}$ |
| Interacción | | | | |
| (A X B) | 318.72 | $F_{(4;81)} = 2.27^{ns}$ | 107.60 | $F_{(4;81)} = 0.81^{ns}$ |
| MANOVA bifactorial | | | | |
| Factor | Wilks' λ | | Raos' R | |
| Tiempo (A) | 0.387 | | $R_{(4;160)} = 24.28^{***}$ | |
| Tratamiento (B) | 0.479 | | $R_{(4;160)} = 17.81^{***}$ | |
| Interacción | | | | |
| (A X B) | 0.867 | | $R_{(8;160)} = 1.48^{ns}$ | |

Los resultados muestran que a dosis de 32 kJm^{-2} de UV-B la tasa de fotoinhibición medida como F_v/F_m alcanza el 30%, cuando la dosis aumenta a 97 kJm^{-2} la tasa aumenta a 45%, sin embargo, este porcentaje de fotoinhibición permanece constante hasta dosis de 391 kJm^{-2} . Para el caso de UV-A la fotoinhibición a dosis de 9 kJm^{-2} presenta una tasa muy baja solo del 7%, cuando las dosis aumentan a 28 kJm^{-2} la tasa de fotoinhibición aumenta a 31%, al igual que para el caso de la UV-B el porcentaje de fotoinhibición permanece constante al aumentar la dosis en este caso a 115 kJm^{-2} (Fig.17).

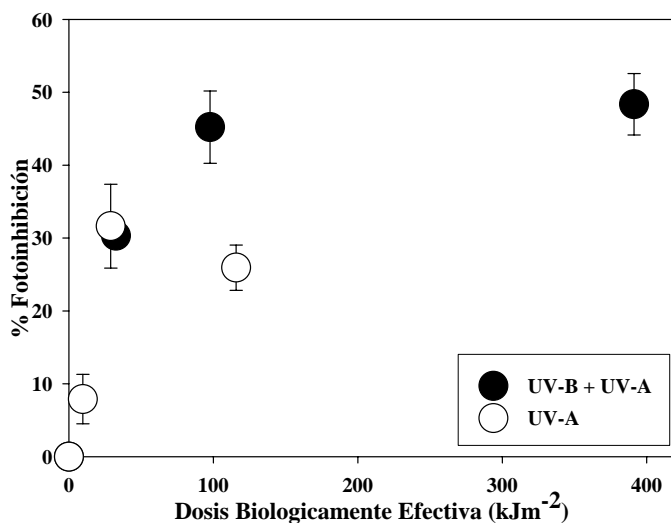


Fig. 17: Porcentaje de Fotoinhibición de F_v/F_m en *L. nigrescens* versus la Dosis Biológicamente Efectiva (Jones & Kok, 1966) de radiación UV durante 24 hrs de exposición. Los datos son medias \pm error estándar ($n=10$).

El rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) fue más afectado por el tratamiento con UV-B exhibiendo las menores tasas de recuperación. A las 24h de exposición el valor de F_v/F_m correspondió a 0.35 y su recuperación no superó el valor de 0.45. El tratamiento PAR +UV-A y PAR presentaron altas tasas de recuperación a las 2 y 6h de exposición con valores cercanos a los encontrados de forma inicial, se destaca la recuperación mostrada en el tratamiento PAR +UV-A para las 2h de exposición, la cual superó el valor inicial, si bien la recuperación disminuye a las 24h sus valores no están por debajo de 0.5 (Fig. 18).

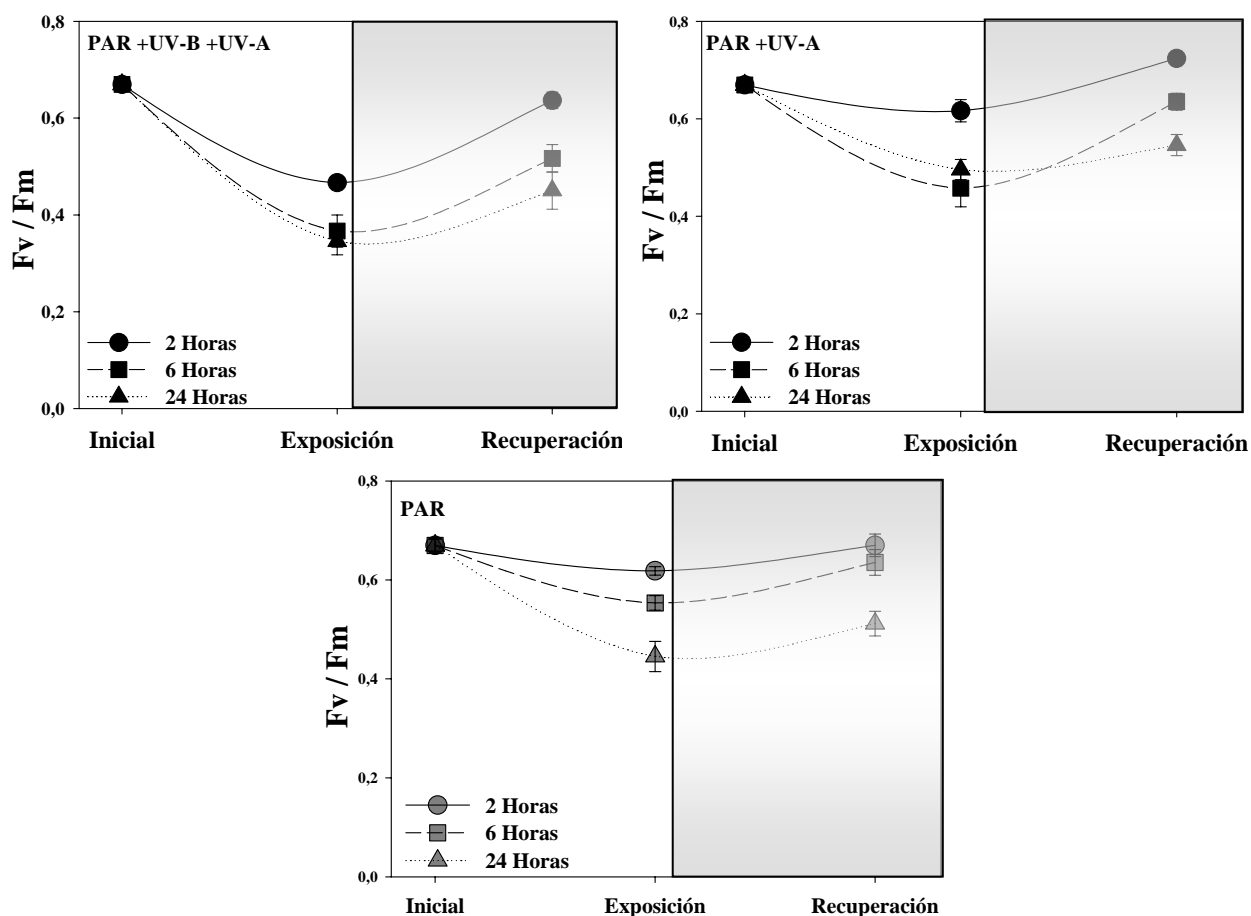


Fig. 18: Fotoinhibición y recuperación medida como rendimiento cuántico máximo (F_v/F_m) en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. Los datos son medias \pm error estándar ($n=10$).

5.2.2 Asimilación de ^{14}C :

a) **Asimilación de ^{14}C fotosintética:** La media de los valores iniciales de la asimilación de ^{14}C fotosintética correspondió $30.46 \pm 1.51 \mu\text{g}^{14}\text{C h}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Se observa que la asimilación de ^{14}C fue altamente sensible a todos los tratamientos: para el caso de los tratamientos con UV luego de 24 horas de exposición, la inhibición alcanzó valores cercanos al 91% para PAR +UV-A y 98% para PAR +UVA +UV-B. Se destaca la alta reducción en la asimilación de ^{14}C en el tratamiento PAR (ausencia de UV) cercana al 60% del valor control.

La fotoinhibición presento diferencias estadísticas para los tiempos de exposición y la interacción entre los factores tratamientos y tiempos de exposición, mientras que para la recuperación las diferencias se presentaron en los tiempos y los tratamientos por si solos (ANOVA bifactorial; Tukey HSD; Tabla 3). Los resultados de MANOVA bifactorial confirmaron que existe una covariación entre los parámetros fotoinhibición y recuperación para los tiempos de exposición (Rao's R; $p < 0.001$), los tratamientos (Rao's R; $p < 0.01$) y la interacción de ambos factores (Rao's R; $p < 0.05$; Tabla 3).

Tabla 3: Porcentaje de fotoinhibición y recuperación de fotosíntesis en relación a la asimilación de ^{14}C fotosintética en *L. nigrescens*. Los datos son medias \pm error estándar ($n=3$). Son indicados los resultados de ANOVA bifactorial, grupos homogéneos de las medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA bifactorial. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns= no significativo.

| Tiempo exp. / Tratamientos | Asimilación de ^{14}C fotosintética ($\mu\text{g}^{14}\text{C h}^{-1} \text{cm}^{-2}$) | | | |
|----------------------------|---|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| | % Fotoinhibición | | % Recuperación | |
| 2 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 28.86 \pm 14.58 b | | 6.60 \pm 1.40 a | |
| PAR + UV-A | 15.36 \pm 7.94 a | | 48.07 \pm 14.09 e | |
| PAR | 22.28 \pm 6.51 b | | 40.38 \pm 10.11 e | |
| 6 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 28.61 \pm 2.79 b | | 32.09 \pm 4.56 c | |
| PAR + UV-A | 30.99 \pm 8.91 b | | 37.84 \pm 3.36 d | |
| PAR | 44.25 \pm 5.72 c | | 33.13 \pm 4.37 d | |
| 24 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 91.32 \pm 2.30 e | | 2.69 \pm 0.42 a | |
| PAR + UV-A | 98.22 \pm 0.84 e | | 15.56 \pm 2.19 b | |
| PAR | 60.46 \pm 0.64 d | | 21.23 \pm 1.06 c | |
| ANOVA factorial | | | | |
| Factor | MS | <i>F</i> - valor | MS | <i>F</i> - valor |
| Tiempo (A) | 7121.59 | $F_{(2;13)} = 60.58^{***}$ | 670.94 | $F_{(2;12)} = 7.82^{**}$ |
| Tratamiento (B) | 108.91 | $F_{(2;13)} = 0.93^{\text{ns}}$ | 759.54 | $F_{(2;12)} = 8.85^{**}$ |
| Interacción | | | | |
| (A X B) | 530.53 | $F_{(4;13)} = 4.51^*$ | 202.28 | $F_{(4;12)} = 2.36^{\text{ns}}$ |
| MANOVA | | | | |
| Factor | | Wilks' λ | | Raos' <i>R</i> |
| Tiempo (A) | | 0.059 | | $R_{(4;22)} = 17.18^{***}$ |
| Tratamiento (B) | | 0.303 | | $R_{(4;22)} = 4.50^{**}$ |
| Interacción | | | | |
| (A X B) | | 0.208 | | $R_{(8;22)} = 3.29^*$ |

Los resultados muestran que la tasa de fotoinhibición se mantiene constante con un valor de 28% a dosis de UV-B biológicamente efectiva entre 32 y 97 kJm^{-2} , sin embargo, a dosis de 391 kJm^{-2} el porcentaje de fotoinhibición aumenta considerablemente al 91%. Para las dosis de UV-A biológicamente efectiva los porcentajes de fotoinhibición aumentan progresivamente desde 18 a 98% al aumentar las dosis desde 9 a 115 kJm^{-2} (Fig.19).

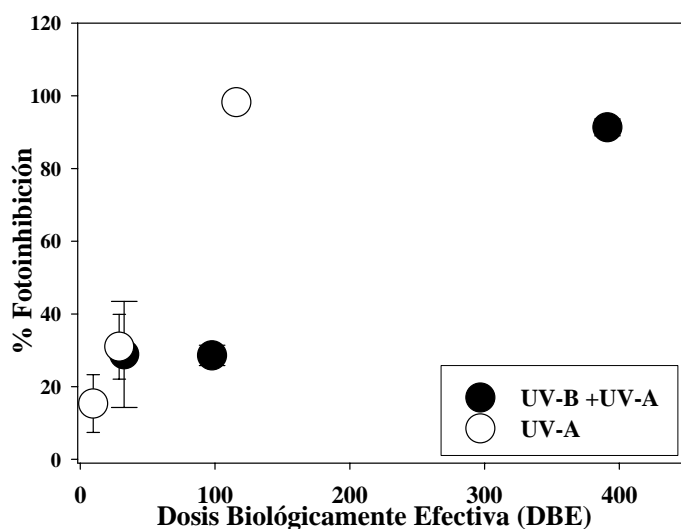


Fig. 19: Porcentaje de Fotoinhibición de asimilación de ^{14}C fotosintética *L. nigrescens* versus la Dosis Biológicamente Efectiva (Jones & Kok, 1966) de radiación UV durante 24 hrs de exposición. Los datos son medias \pm error estándar (n=3).

Los resultados muestran que luego de 24h de exposición a los diferentes tratamientos no se observa recuperación en la asimilación de ^{14}C fotosintética, en particular, el tratamiento PAR +UV-A +UV-B muestra valores mínimos de $0.82 \mu\text{g}^{14}\text{C h}^{-1} \text{cm}^{-2}$, en comparación al valor inicial. Los tratamientos PAR + UV-A y PAR presentan tendencias similares, en las cuales la recuperación decrece a medida que aumentan las horas de exposición, alcanzando valores de 4.74 y $6.47 \mu\text{g}^{14}\text{C h}^{-1} \text{cm}^{-2}$ a las 24h, respectivamente (Fig.20).

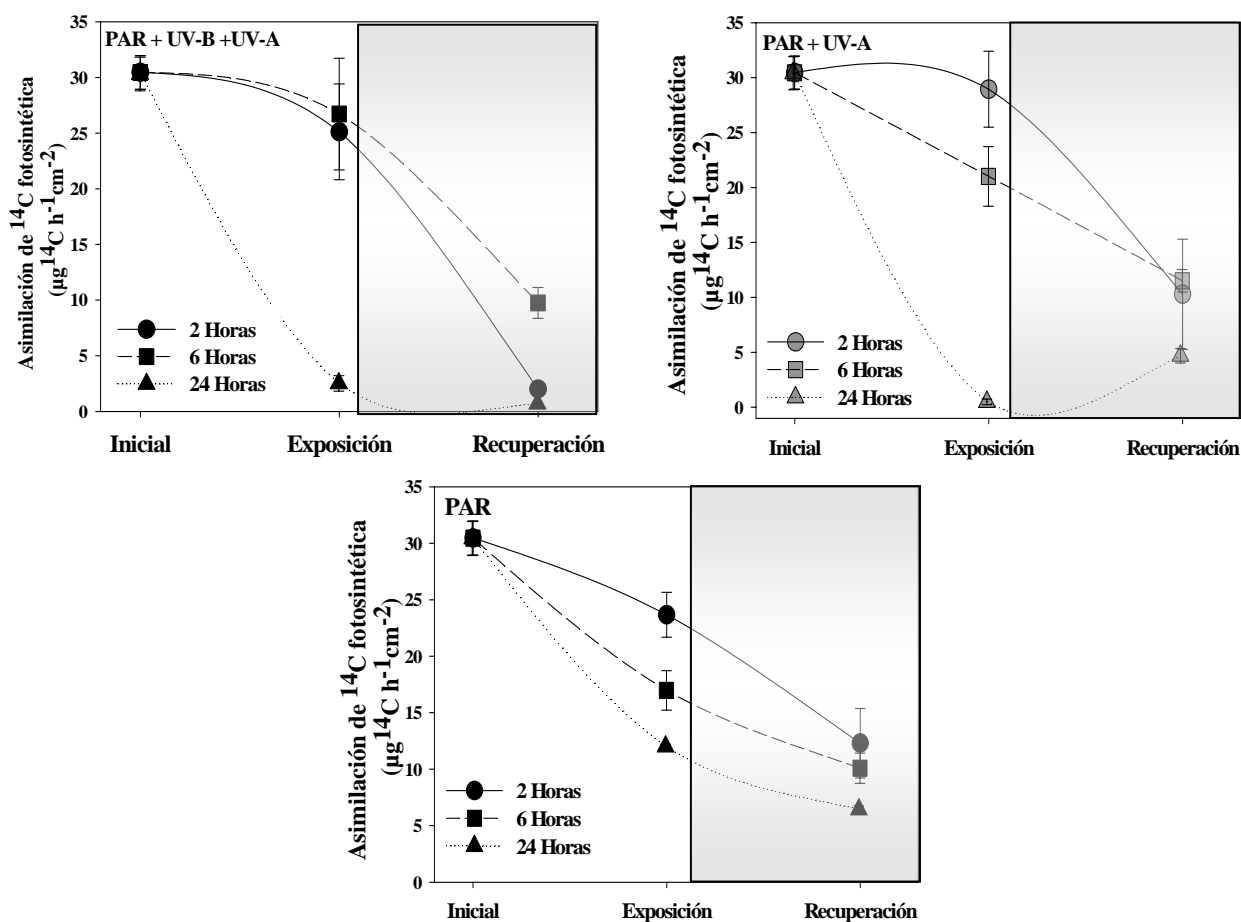


Fig. 20: Fotoinhibición y recuperación medida como asimilación de ^{14}C fotosintética en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. Los datos son medias \pm error estándar ($n=3$).

b) Asimilación de ^{14}C no-fotosintética: La media de los valores iniciales de la asimilación de ^{14}C no-fotosintética correspondió $2.7 \pm 0.82 \mu\text{g } ^{14}\text{C h}^{-1} \text{cm}^{-2}$. Los resultados muestran que los tratamientos con UV presentan porcentajes de inhibición extremadamente elevados (96%) a las 2h de exposición permaneciendo constante hasta las 24 horas de exposición. El tratamiento PAR alcanza valores de 96% de inhibición solo a las 24h de exposición., sin embargo, las estadísticas concluyen que existen diferencias para el factor tiempo de exposición no así para el factor tratamiento (ANOVA bifactorial; Tukey HSD; Tabla 4). A las 2 y 6h de exposición la recuperación es notablemente mayor en el tratamiento PAR ($\approx 60\%$), a las 24h todos los

tratamientos no superan el 5% de recuperación, en este caso existen diferencias estadísticas para el factor tiempo de exposición, tratamientos y la interacción de ambos factores (ANOVA bifactorial; Tukey HSD; Tabla 4). Los tiempos de exposición, tratamientos y la interacción de ambos factores covariaron para los parámetros de inhibición y recuperación (MANOVA bifactorial; Tabla 4).

Tabla 4: Porcentaje de inhibición y recuperación de fotosíntesis en relación a la asimilación de ^{14}C no-fotosintética en *L. nigrensens*. Los datos son medias \pm error estándar (n=3). Son indicados los resultados de ANOVA bifactorial, grupos homogéneos de las medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA bifactorial. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns= no significativo.

| Tiempo exp. / Tratamientos | Asimilación de ^{14}C no-fotosintética ($\mu\text{g } ^{14}\text{C h}^{-1} \text{cm}^{-2}$) | | | |
|----------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | % Fotoinhibición | | % Recuperación | |
| 2 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 96.45 \pm 0.85 c | | 3.55 \pm 0.85 a | |
| PAR + UV-A | 96.00 \pm 0.23 c | | 4.00 \pm 0.23 a | |
| PAR | 84.33 \pm 13.16 b | | 60.88 \pm 32.06 d | |
| 6 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 84.24 \pm 8.57 b | | 15.76 \pm 8.57 c | |
| PAR + UV-A | 81.55 \pm 22.51 b | | 18.45 \pm 11.22 c | |
| PAR | 73.42 \pm 19.15 a | | 63.20 \pm 17.48 d | |
| 24 horas | | | | |
| PAR + UV-A + UV-B | 94.68 \pm 1.81 c | | 5.32 \pm 1.81 b | |
| PAR + UV-A | 95.32 \pm 2.41 c | | 4.68 \pm 2.41 b | |
| PAR | 96.83 \pm 0.92 c | | 3.17 \pm 0.92 a | |
| ANOVA factorial | | | | |
| Factor | MS | <i>F</i> - valor | MS | <i>F</i> - valor |
| Tiempo (A) | 476.50 | $F_{(2;14)} = 4.33^*$ | 1551.20 | $F_{(2;14)} = 6.94^{**}$ |
| Tratamiento (B) | 101.00 | $F_{(2;14)} = 0.92^{\text{ns}}$ | 2682.75 | $F_{(2;14)} = 12.00^{***}$ |
| Interacción | | | | |
| (A X B) | 49.10 | $F_{(4;14)} = 0.45^{\text{ns}}$ | 869.87 | $F_{(4;14)} = 3.89^*$ |
| MANOVA | | | | |
| Factor | Wilks' λ | | Raos' <i>R</i> | |
| Tiempo (A) | 0.383 | | $R_{(4;26)} = 4.00^*$ | |
| Tratamiento (B) | 0.363 | | $R_{(4;26)} = 4.29^{**}$ | |
| Interacción | | | | |
| (A X B) | 0.462 | | $R_{(8;26)} = 1.53^{\text{ns}}$ | |

A diferencia de lo mostrado en la Fig. 17 para la asimilación de ^{14}C fotosintética, los porcentajes de inhibición para la asimilación de ^{14}C no-fotosintética se elevan aproximadamente al 95% a dosis bajas de UV biológicamente efectiva (UV-B 32 kJm^{-2} ; UV-A 9 kJm^{-2}), permaneciendo constante a medida que las dosis aumentan (Fig. 21).

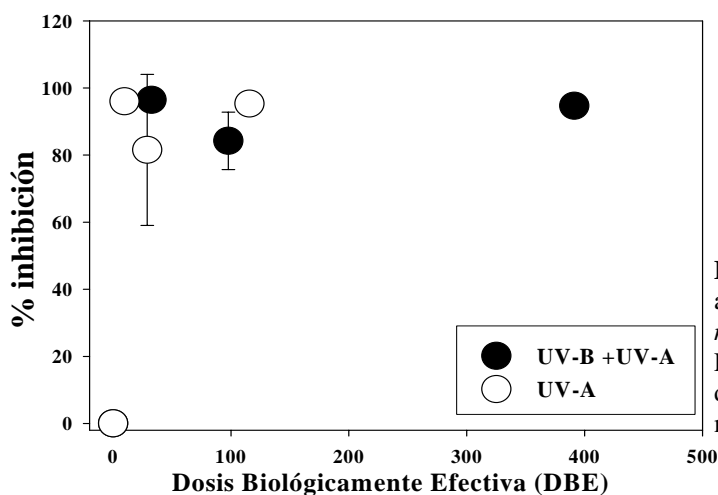


Fig. 21: Porcentaje de inhibición de la asimilación de ^{14}C no-fotosintética en *L. nigrescens* versus la Dosis Biológicamente Efectiva (Jones & Kok, 1966) de radiación UV durante 24 hrs de exposición. Los datos son media \pm error estándar (n=3).

Los resultados muestran que la asimilación de ^{14}C no-fotosintética solo muestra recuperación en el tratamiento PAR a las 2 y 6h de exposición, en el resto de los casos no se observó recuperación (Fig. 22).

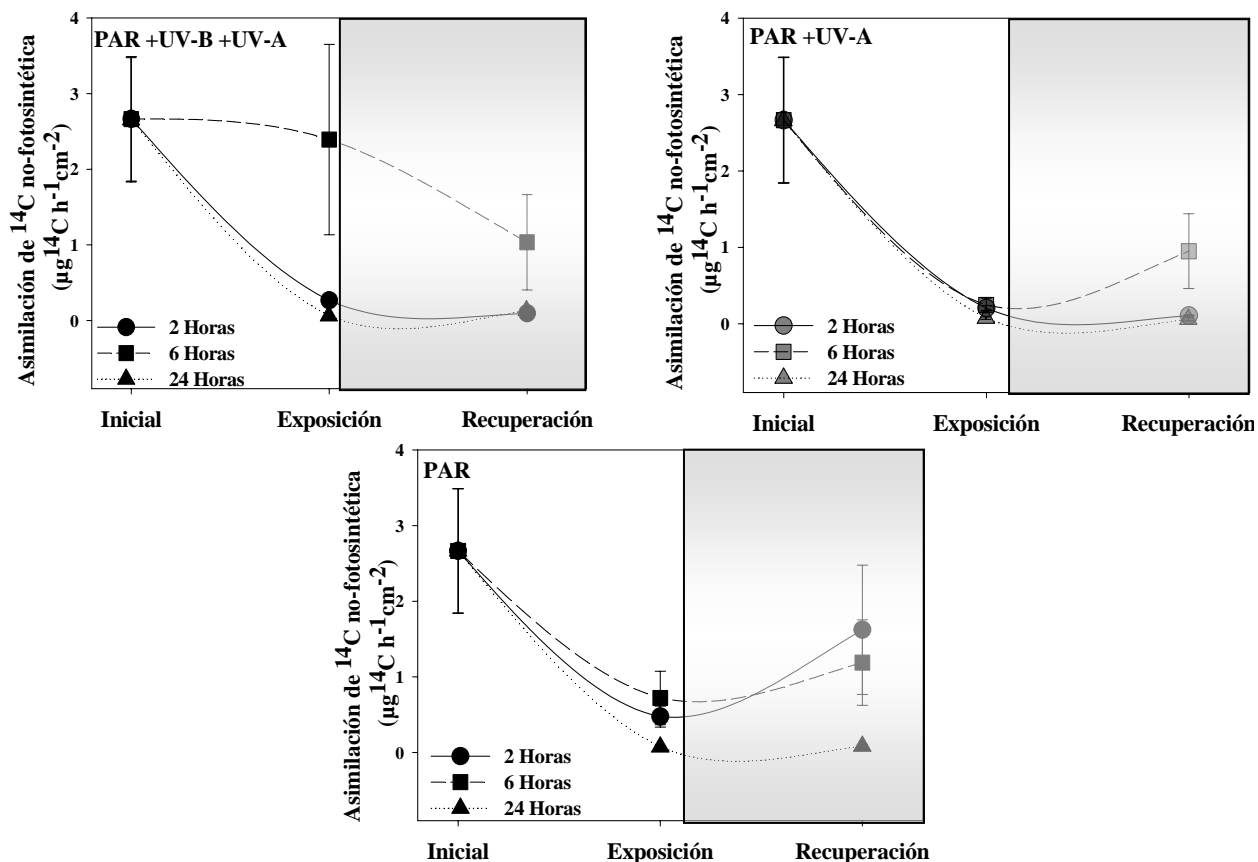


Fig. 22: Fotoinhibición y recuperación medida como asimilación de ^{14}C no-fotosintética en los diferentes tratamientos y tiempos de exposición. Los datos son medias \pm error estándar (n=3).

5.3 Variación estacional en la asimilación de ^{14}C .

Los resultados de de la variación mensual de la asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética indican diferencias estadísticas entre los meses muestreados (ANOVA una-vía, Tukey HSD, Tabla 5). Las tasas de asimilación de ^{14}C más altas se registraron en el mes de Enero de 2005 y las más bajas correspondieron al mes de Abril de 2004. A pesar de existir diferencias entre meses no se observa estacionalidad clara a lo largo de todo el año. En contraste, las tasas de asimilación de ^{14}C no-fotosintética se mantienen constantes desde otoño a primavera aumentando sustancialmente en los meses de verano. Se confirmó a través de MANOVA una vía (Tabla 5) algún grado de covariación de la asimilación de ^{14}C fotosintética y la no-fotosintética para los diferentes meses muestreados.

Tabla 5: Asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética entre los meses de Abril de 2004 a Enero de 2005. Los datos son medias \pm error estándar (n=3). Son indicados los resultados de ANOVA una-vía, grupos homogéneos para la medias por letras similares (Tukey HSD) y MANOVA una vía. *** $P < 0.0001$.

| Meses | Asimilación de ^{14}C ($\mu\text{g}^{14}\text{C h}^{-1} \text{cm}^{-2}$) | | | |
|-------------------------|---|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | A. fotosintética | | A. no-fotosintética | |
| Abril | 6.24 \pm 0.65 a | | 0.03 \pm 0.01 a | |
| Junio | 27.63 \pm 1.13 c | | 1.22 \pm 0.10 b | |
| Julio | 7.98 \pm 1.65 a | | 2.07 \pm 0.25 c | |
| Agosto | 26.61 \pm 1.76 c | | 1.71 \pm 0.41 b | |
| Septiembre | 25.07 \pm 0.07 c | | 1.79 \pm 0.02 b | |
| Octubre | 31.76 \pm 0.089 d | | 1.99 \pm 0.28 b | |
| Noviembre | 17.45 \pm 0.74 b | | 1.93 \pm 0.06 b | |
| Diciembre | 16.97 \pm 5.27 b | | 0.56 \pm 0.17 a | |
| Enero | 41.8 \pm 1.97 e | | 9.25 \pm 1.38 d | |
| ANOVA (una-vía) | | | | |
| Factor | MS | F valor= | MS | F valor= |
| Meses | 259.86 | $F_{(8;9)} = 28.88^{***}$ | 14.65 | $F_{(8;9)} = 29.23^{***}$ |
| MANOVA (una vía) | | | | |
| Factor | Wilks' λ | | Raos' R | |
| Meses | 0.002463 | | $R_{(8;16)} = 19.15^{***}$ | |

El promedio de las dosis máximas de radiación UV-B, UV-A y PAR encontradas en los meses de Abril de 2004 a Enero de 2005 muestran una gran estacionalidad, con tasas muy bajas en los meses invernales y altas en los meses de verano (Tabla 6). A pesar de que las tasas más altas de asimilación de ^{14}C coinciden con las mayores dosis de radiación encontradas, en general los resultados muestran que no existe correlación entre la asimilación de ^{14}C y las dosis de radiación solar medidas. El valor de R^2 para la correlación entre la asimilación de ^{14}C fotosintética y las dosis de radiación no supera a 0.14 (Fig. 23 y 24). Para el caso de la asimilación de ^{14}C no-fotosintética, la correlación de ésta con las dosis de radiación presentan un R^2 no superior a 0.2 (Fig. 25 y 26).

Tabla 6: Dosis de radiación UV-B, UV-A y PAR entre Abril de 2004 a Enero de 2005. Los datos son medias \pm error estándar de dosis diarias para cada mes.

| Meses | UV-B ($\text{kJm}^{-2}\text{d}^{-1}$) | UV-A ($\text{kJm}^{-2}\text{d}^{-1}$) | Dosis diaria PAR (mol/m^{-2}) |
|------------|--|--|---|
| Abril | 8.60 ± 0.59 | 447.21 ± 31.00 | 18.87 ± 1.43 |
| Junio | 2.06 ± 1.33 | 180.27 ± 19.12 | 7.74 ± 1.33 |
| Julio | 3.04 ± 0.97 | 243.37 ± 20.19 | 10.59 ± 0.99 |
| Agosto | 5.94 ± 1.43 | 411.74 ± 31.33 | 18.52 ± 1.59 |
| Septiembre | 12.81 ± 1.33 | 680.97 ± 31.20 | 29.89 ± 1.61 |
| Octubre | 17.56 ± 1.19 | 785.22 ± 55.28 | 33.23 ± 2.51 |
| Noviembre | 30.08 ± 1.67 | 1169.29 ± 71.54 | 51.75 ± 3.40 |
| Diciembre | 35.84 ± 1.05 | 1318.53 ± 56.20 | 59.84 ± 3.43 |
| Enero | 39.89 ± 1.00 | 1453.83 ± 42.18 | 65.09 ± 2.04 |

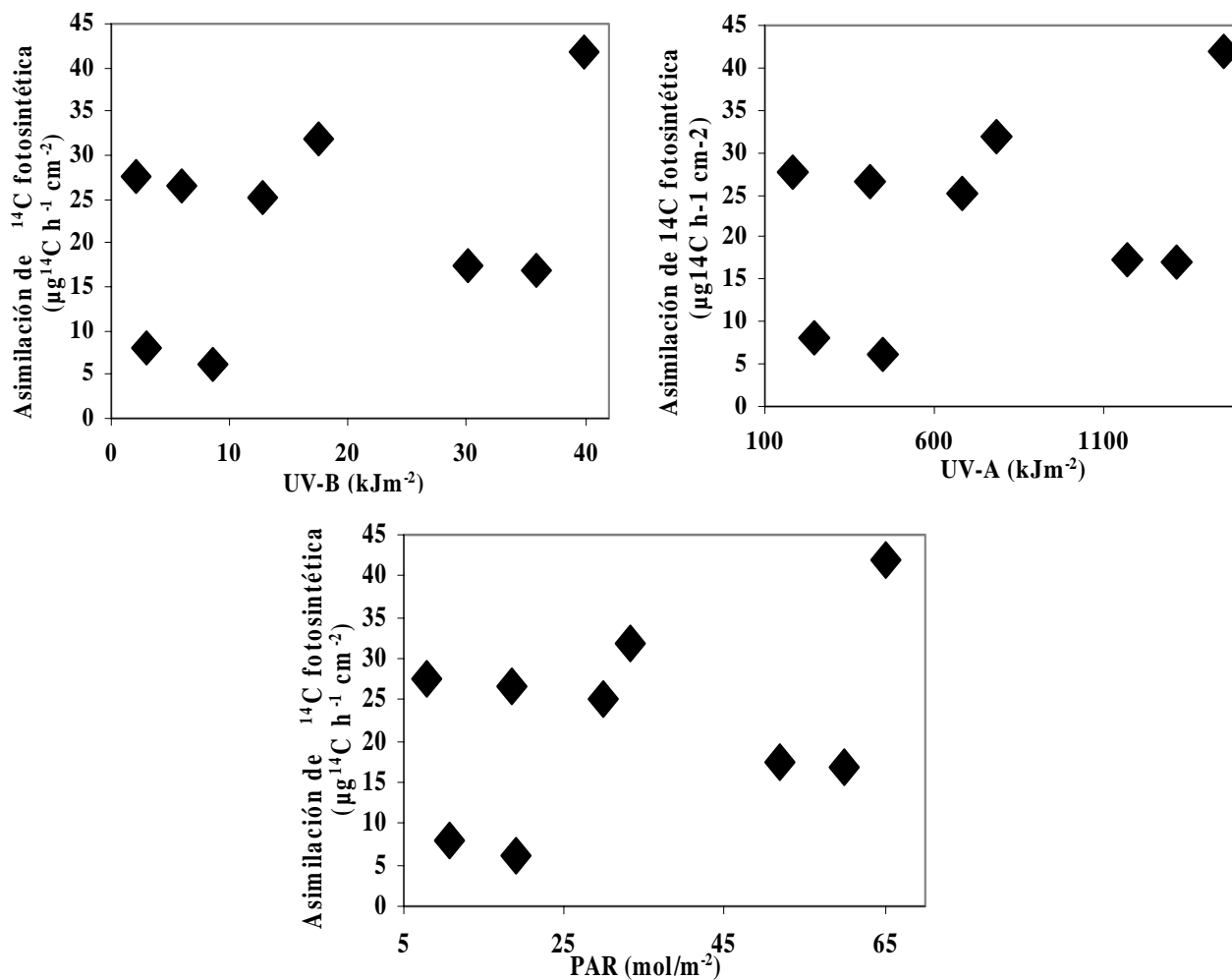


Fig. 23: Correlación entre la asimilación de ^{14}C fotosintética y las dosis de radiación UV-B, UV-A y PAR encontradas entre Abril de 2004 y Enero de 2005.

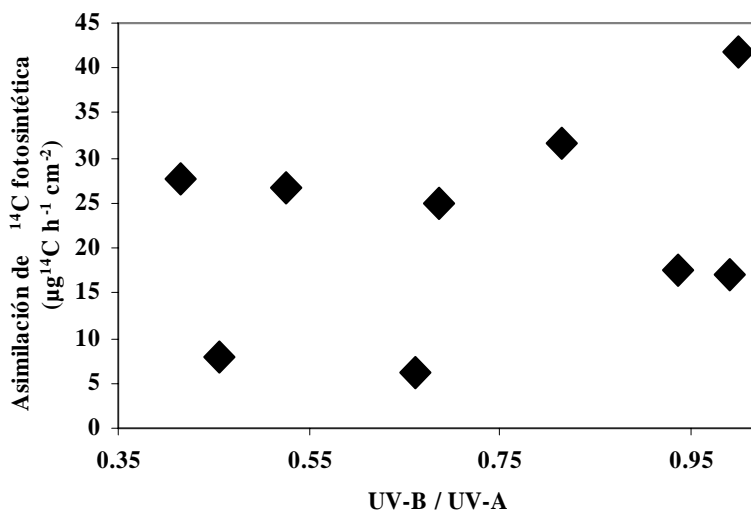


Fig. 24: Correlación entre la asimilación de ^{14}C fotosintética y la razón UV-B/UV-A.

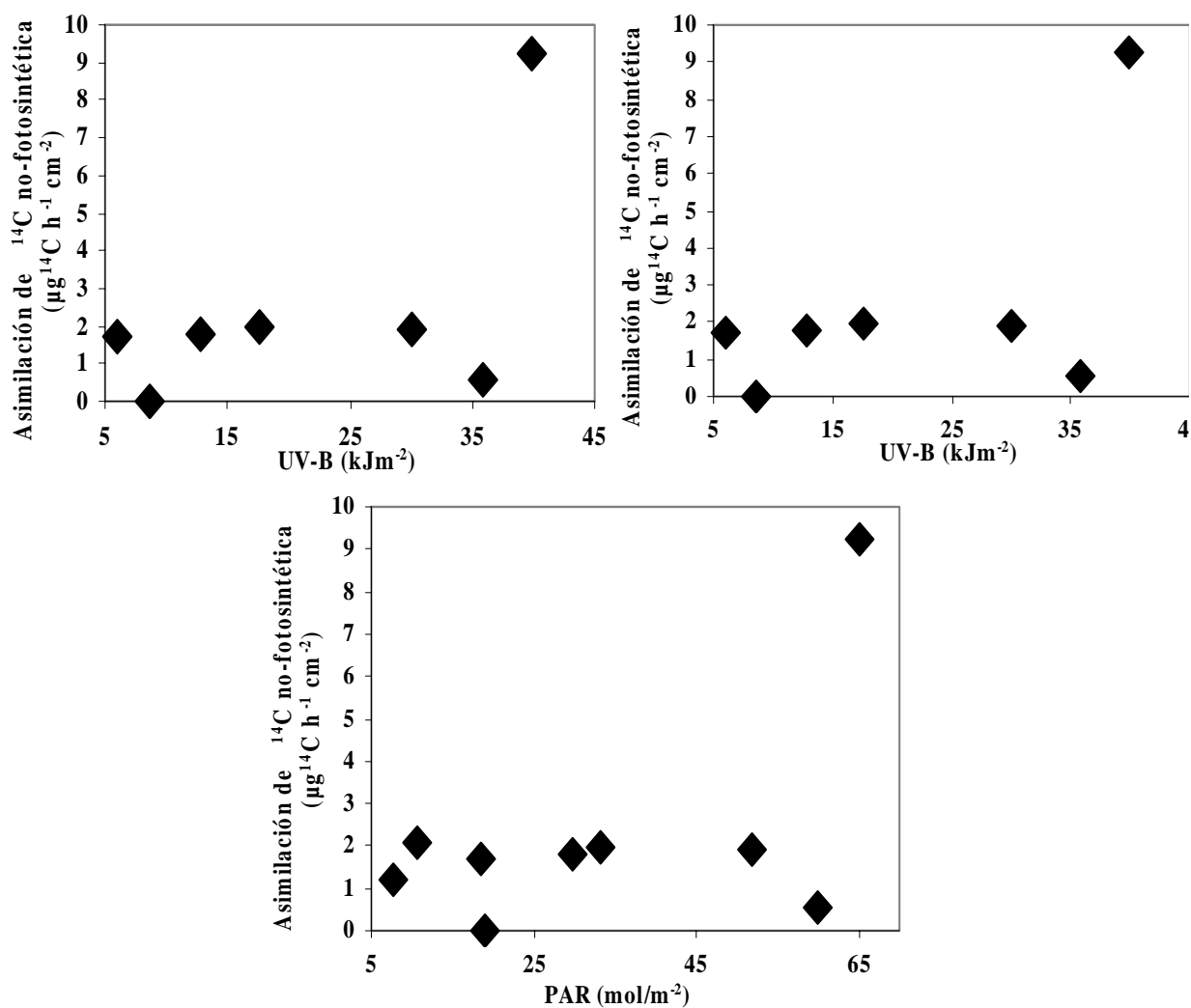


Fig. 25: Correlación entre la asimilación de ^{14}C no-fotosintética y las dosis de radiación UV-B, UV-A y PAR encontradas entre Abril de 2004 y Enero de 2005.

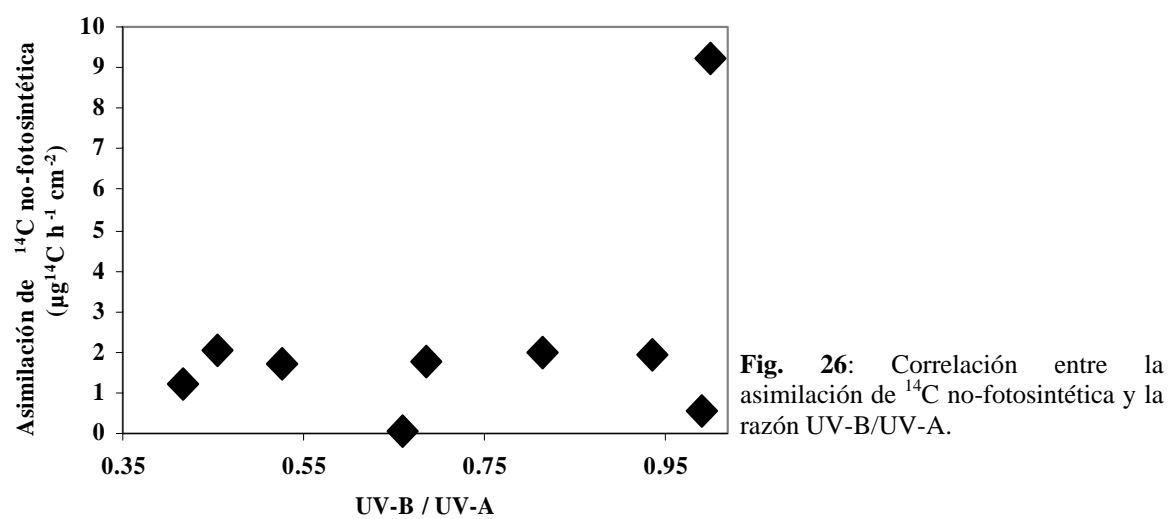


Fig. 26: Correlación entre la asimilación de ^{14}C no-fotosintética y la razón UV-B/UV-A.

6. Discusión.

6.1 Caracterización de los patrones morfo-funcionales.

A pesar que los datos no fueron tratados estadísticamente debido al número de replicas (n=2), la asimilación de ^{14}C a lo largo del talo muestra claras diferencias. En la figura 14 se aprecia la diferencia existente entre rizoide, estipes y frondas: las frondas presentan altas tasas de asimilación de ^{14}C fotosintética confirmando que son las principales encargadas de los procesos fotosintéticos del talo y que los estipes y el rizoide cumplen una función de mecánica de fijación y sostén (Westermeyer & Gómez, 1996, Gómez *et al.* 2005). Cabe señalar que estas tasas de asimilación fueron calculadas en términos del área de los discos y no en términos del peso. Cuando los valores son calculados en relación al peso (datos no mostrados), las diferencias son aun mayores. Esto tiene que ver con la estructura de estas secciones: las frondas son estructuras mucho más pequeñas y aplanadas, donde la proporción de células fotosintéticas es mayor. En el caso de estipes y rizoides, la zona fotosintética esta restringida al cortex, mientras gran parte de la biomasa en estas estructuras corresponde a medula sin actividad fotosintética (^bGómez *et al.* 2005). En relación a las frondas provenientes de algas de diferentes tamaños las tasas de asimilación de ^{14}C fotosintético fueron similares en todos los tipos de alga. En el caso de la asimilación de ^{14}C no fotosintético, las frondas de algas grandes mostraron tasas mayores (Fig. 15). Aparentemente esta situación podría estar relacionada a dos factores principales: a) las frondas son estructuras transitorias y que están en un constante equilibrio entre mortalidad y regeneración. Aquí tiene gran importancia la actividad del meristema, es decir, aunque las algas sean de muy distinto tamaño y edad sus frondas son relativamente homogéneas; b) la estación del año en la cual las algas fueron medidas (Abril); en general, *L. nigrescens* muestra mayor

crecimiento a fines de invierno-primavera, lo cual podría explicar porque frondas de algas más pequeñas tuvieron bajo desempeño comparado a las de algas grandes.

En el perfil longitudinal de asimilación de ^{14}C en frondas de algas medianas existieron diferencias, donde la asimilación de ^{14}C fotosintética presento sus mayores tasas en las zonas intermedia y apical y la asimilación de ^{14}C no-fotosintético en la zona basal o meristema (Fig.16). Esto concuerda con lo encontrado por Küpper & Kremer (1978) en *Laminaria digitata* la cual presento un 20% de asimilación de ^{14}C no-fotosintética en el meristema, en relación a la asimilación total de ^{14}C para esa parte del talo y por Cabello-Pasini & Alberte (2001) en *Laminaria setchellii* que encontraron un 30%. El crecimiento en *Lessonia nigrescens* ocurre a través de este meristema intercalar que agrega tejido a estipe y fronda (Lee, 1989), por lo tanto, la función principal de la asimilación de ^{14}C no-fotosintética sería probablemente potenciar un aumento de la biomasa algal, en tanto que la asimilación fotosintética, que ocurre principalmente en las zonas apicales, esta relacionada a la biosíntesis de productos de almacenamientos.

6.2 Efectos de la radiación UV.

La fotoinhibición del rendimiento cuántico máximo (F_v / F_m) en *Lessonia nigrescens* aumenta en todos los tratamientos a medida que aumenta las dosis de radiación. Los resultados muestran que F_v / F_m es más sensible al tratamiento con UV-B, a dosis de 391 kJm^{-2} equivalentes a 24 horas exposición, con un 48% de fotoinhibición y solo 67% de recuperación, en comparación, a los tratamientos con UV-A y PAR los cuales nunca superaron los 33% de fotoinhibición y sus porcentajes de recuperación más bajos fueron de 76%. Dring *et al.* (1996) en un estudio sobre exposición a radiación UV en tres especies de Laminariales (*Laminaria saccharina*, *L. digitata* y *L. hyperborea*) observaron una recuperación total de F_v / F_m al cabo de

un día después de terminada la exposición. Por lo tanto se podría argumentar que al aumentar el tiempo de recuperación en *Lessonia nigrescens* existiría una recuperación total de F_v / F_m para todos los tratamientos.

En el caso de la asimilación de ^{14}C fotosintética en los tratamientos PAR + UV-A y PAR los porcentajes de fotoinhibición aumentaron a medida que aumentaba la dosis, en el tratamiento con UV-B la fotoinhibición permanece constante en 28% a dosis entre 32 y 97 kJm^{-2} aumentando a 91% cuando la dosis es aumentada a 391 kJm^{-2} . A las 2 horas de exposición las frondas son sensibles al tratamiento con UV-B, lo cual tiende a atenuarse a las 6 y 24 horas en la cuales el tratamiento con UV-A presenta una fotoinhibición levemente mayor al tratamiento con UV-B. Esto estaría confirmando los resultados de Dring *et al.* (1996) quienes argumentaron que la UV-A es probablemente un componente más efectivo en producir efectos negativos en la fotosíntesis de algas. De hecho, la radiación UV-A incide en mayor cantidad sobre las algas en la naturaleza (Madronich *et al.* 1995). Aunque la fotoinhibición fue mayor en el tratamiento con UV-A, en todos los caso los porcentajes de recuperación son menores para el tratamiento con UV-B. Por ejemplo, a dosis de 391 kJm^{-2} en el tratamiento con UV-B, las algas se recuperan solo a tasas cercanas a 2.69% mientras que bajo lámparas UV-A (dosis de 115 kJm^{-2}) , las algas logran una recuperación cercana al un 14%.

Según los resultados de la Tabla 4 se puede inferir que la asimilación de ^{14}C no-fotosintética no dependería directamente de la radiación sino que posiblemente de la biosíntesis de productos de almacenamiento. Si existe una disminución de la asimilación vía Rubisco esto lleva implícito la disminución del almacenamiento de hidratos de carbono de reserva y de compuestos que podrían ser usados como sustrato para la glicólisis (por ejemplo, manitol). Por

ejemplo, si efectivamente disminuyera la concentración de manitol, la síntesis de PEP también disminuiría con la concomitante disminución en la asimilación de ^{14}C vía PEPCK.

En general, especies que habitan el submareal y/o especies de tipo sombra son más sensibles a dosis altas de radiación UV que especies que habitan sectores más altos en el intermareal (tipo sol) (Han & Kain, 1993; Jiménez *et al.* 1998; Gómez *et al.* 2004). Los resultados de este estudio confirman este patrón, ya que *Lessonia nigrescens* es una especie que habita el infralitoral y la mayor parte del tiempo permanece cubierta de agua. Por lo tanto no es extraño encontrar que a altas dosis de UV exista un alto porcentaje de fotoinhibición y su posterior recuperación sea baja comparado a algas de la zona intermareal media o supra litoral. Esto ha sido previamente encontrado en *Macrocystis pyrifera*, la cual cohabita con *Lessonia* en el intermareal bajo (Gómez *et al.* 2004). En términos generales *L. nigrescens* fue más sensible a altas dosis de radiación UV-B, sin embargo, es importante precisar que la intensidad de las lámparas PAR en este estudio es baja y lejana a lo encontrado en los ambientes naturales en verano. Esto se hizo para poder evaluar el efecto neto de la radiación UV y así evitar el enmascaramiento de la luz visible sobre los efectos de fotosíntesis. Bischof *et al.* (1999), en un estudio realizado en el alga parda Ártica *Alaria esculenta* encontraron que las tasas de recuperación son más pronunciadas después de tratamientos con UV y bajo PAR que después de tratamientos con alto PAR y sugiere que el efecto del incremento de la UV no es similar a los efectos fotoinhibitorios de PAR. En este sentido se ha propuesto que la radiación UV induciría mecanismos de fotoprotección adicionales los cuales son efectivos durante la fase inhibitoria y que tales mecanismos no estarían presentes a alta dosis de PAR.

Comparando los efectos en ambos procesos (fotoquímicos y de asimilación de carbono) se puede inferir que efectivamente la radiación UV produce fotoinhibición en ambos procesos, sin

embargo, los resultados muestran claramente que los porcentajes de recuperación de los procesos fotoquímicos (medidos como F_v / F_m) son mayores que los procesos de asimilación de carbono, luego de 6 horas a condiciones de bajo PAR. A dosis de 391 kJm^{-2} de UV-B y 115 kJm^{-2} de UV-A no se observó recuperación de la asimilación carbono reflejando una fotoinhibición crónica. Los resultados descritos en las Tablas 2 y 3 muestran que el efecto fotoinhibitorio de la radiación UV-B ocurre en un primer tiempo en los procesos fotoquímicos y posteriormente en el proceso de asimilación de carbono, esto concuerda con lo descrito por Schofield *et al.* (1995) en un estudio realizado en fitoplancton antártico, en el cual la inhibición en los procesos de carboxilación producidos por la radiación UV son posteriores a los procesos de inhibición de las reacciones de luz de la fotosíntesis.

La baja intensidad de las lámparas PAR, lejanas a los valores normales encontrados en verano en la costa de Valdivia, es una variable que puede influir en la diferencias en los porcentajes de recuperación de los procesos fotoquímicos y de asimilación de carbono. Es probable que las bajas dosis de PAR no sean capaces de restaurar eficientemente la cadena transportadora de electrones indispensables para el proceso de asimilación carbono y que al contrario los procesos fotoquímicos necesitarían solamente de la exclusión de la radiación UV-B para desactivar los mecanismos fotoprotectores que producen la inhibición de dichos procesos. Esta argumentación tiene algún sentido si se considera que *Lessonia nigrescens* es una especie intermareal, es decir, esta expuesta constantemente a condiciones de alta luminosidad en su hábitat natural.

La recuperación de la asimilación de carbono no-fotosintética (vía PEPCK) sería secundaria a la recuperación de la asimilación de carbono fotosintética (vía Rubisco), ya que ésta requiere de la biosíntesis de productos de almacenamiento (ejemplo manitol) provenientes de la

asimilación de carbono fotosintética. La restauración del almacenamiento de manitol u otros productos primarios de la fotosíntesis permitiría la síntesis de PEP necesaria para la asimilación de carbono no-fotosintética.

6.3 Variación estacional

Los resultados muestran una variación entre los meses muestreados tanto para la asimilación de ^{14}C fotosintética y no-fotosintética. La tasa de asimilación de ^{14}C fotosintética fluctúa a lo largo del año mientras que la tasa de asimilación de ^{14}C no-fotosintética se mantiene constante desde Abril a Diciembre de 2004, sin embargo, ambos tipos de asimilación presentaron un aumento sustancial en el mes de Enero de 2005, coincidente con las mayores dosis de radiación (Tabla 5). La asimilación de carbono entrega los precursores energéticos necesarios para el crecimiento. Debido a que en *Lessonia nigrescens* el crecimiento es estacional produciéndose a fines de invierno principios de primavera (Westermeyer *et al.* 1994) las tasas de asimilación de carbono fotosintética, encargada principal de la biosíntesis de productos de almacenamiento, son altas en los meses de verano para proveer dichos precursores para el crecimiento producido a fines de invierno.

A pesar de estos resultados, no existe una correlación entre la asimilación de carbono y la dosis de radiación (Fig. 23-26). Esto contrasta con lo encontrado por Cabello-Pasini & Alberte (1997) en *L. setchellii* en el que las tasas de asimilación de ^{14}C no-fotosintética fueron altas cuando los valores de fotosíntesis fueron los más bajos. Sin embargo, estas diferencias pueden ser atribuidas a factores relacionados con la estacionalidad del crecimiento y no con las dosis de radiación solar o niveles de nutrientes como ha sido reportando en otras Laminariales del hemisferio Norte (Chapman & Lindley, 1980). En esas especies, el crecimiento y fotosíntesis

están marcadamente separadas en el tiempo ya que viven a latitudes generalmente más altas que *Lessonia nigrescens* y son sujetas a cambios mas drásticos en la concentración de nutrientes en el agua. En el caso de *Lessonia nigrescens* la energía lumínica presente a lo largo del año parece ser suficiente para la realización de los procesos fotosintéticos, además de argumentar que la concentración de nutrientes en Valdivia podría permanecer constante a lo largo del año debido a la cercanía del Río Valdivia lo cual tampoco sería un factor limitante de los procesos fotosintéticos. En general, la mayoría de los estudios realizados en Laminariales, corresponden a especies submareales (Lüning *et al.* 1973; Dunton, 1985; ^{a,b}Cabello-Pasini & Alberte, 2001; etc.) para las cuales la disponibilidad de energía lumínica difiere drásticamente entre invierno y verano por factores tales como la disminución de las dosis de radiación en invierno sumada a la dispersión de energía lumínica producto de la profundidad, en contraste *Lessonia nigrescens* es una especie intermareal que solo ve marginalmente afectada la disponibilidad de energía lumínica para los procesos fotosintéticos por el aumento o disminución de las dosis de radiación solar incidentes.

En resumen en *Lessonia nigrescens* las frondas son las principales encargadas de los procesos fotosintéticos en el talo, cabe destacar que la zona meristemática o de crecimiento presenta altas tasas de asimilación de carbono no-fotosintético, los estipes y el rizoide cumplen una función de fijación y sostén.

Los procesos fotoquímicos y de asimilación de carbono fotosintético en *Lessonia nigrescens* demostraron ser sensibles a altas dosis de radiación UV con una fotoinhibición primeramente de los procesos fotoquímicos seguida de la fotoinhibición del proceso de asimilación de carbono fotosintético. Dosis de UV-B entre 100 a 400 kJ m⁻² causaron un 50 % de

fotoinhibición de la fluorescencia de clorofila, y aproximadamente un 100 % de la asimilación ^{14}C . Sin embargo, la fotoinhibición crónica de los procesos de asimilación de carbono fotosintético demuestra que éstos son más sensibles a altas dosis de radiación UV que los procesos fotoquímicos. Existen altas tasas de asimilación de carbono en la oscuridad (asimilación no-fotosintética) y ésta no muestra una variación relacionada a las dosis de UV.

Las mayores tasas de asimilación de carbono fotosintético y no-fotosintético ocurren en el mes de Enero de 2005 coincidente con las mayores dosis de radiación encontradas. Sin embargo, no existe una correlación clara entre la asimilación de carbono y las dosis de radiación.

7. Conclusiones.

De acuerdo a lo antes expuesto se concluye:

- a) Las tasas de la asimilación de ^{14}C fotosintética (vía Rubisco) y no-fotosintética (vía PEPCK) varían a lo largo del talo de *Lessonia nigrescens*. Las frondas son las estructuras con mayores tasas de asimilación de ^{14}C fotosintética, mientras la zona de crecimiento (meristema) presenta altas tasas de asimilación de ^{14}C no-fotosintética.
- b) Debido a diferentes grados de desarrollo ontogénico frondas de algas juveniles presentaron mayores tasas de asimilación de ^{14}C fotosintética que frondas de algas adultas.
- c) La exposición a dosis artificiales de radiación UV equivalentes a dosis de verano en el ambiente natural resulta en una disminución de las tasas de fluorescencia de clorofila y asimilación de ^{14}C fotosintética de *Lessonia nigrescens*. Sin embargo, la disminución de la asimilación de ^{14}C fotosintética ocurre a dosis más altas de radiación UV.
- d) A similares dosis de radiación UV, no es posible aseverar que la asimilación de ^{14}C fotosintética sea más afectada que la asimilación no-fotosintética.
- f) Aunque las tasas de asimilación de ^{14}C presentan las mayores tasas en los meses de mayor radiación solar (verano), la variabilidad estacional no fue bien correlacionada a las dosis estacionales de radiación solar. En el caso de la asimilación de ^{14}C no fotosintética, probablemente la estacionalidad esta reflejada en las tasas de crecimiento.

8. Bibliografía.

- Anderson, J., Park, Y. & Chow, W. (1997)** Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in the nature. *Physiologia Plantarum.*, 100: 214-223.
- Bischof, K., Hanel, D. & Wiencke, C. (1999)** Acclimation of maximal quantum yield of photosynthesis in the brown alga *Alaria esculenta* under high light and UV radiation. *Plant biol.* 1: 435-444.
- Briantais, J., Vernotte, C., Krause, G. & Weis, E. (1986)** Chlorophyll *a* fluorescence of higher plants chloroplasts and leaves. En: Light emission by plants and bacteria (eds) Govindjee, J. & Fork, D.: 539-583. Academic Press, New York.
- Cabello-Pasini, A. & Randall, A. (1997)** Seasonal patterns of photosynthesis and light-independent carbon fixation in marine macrophytes. *J. Phycol.*, 33: 321-329.
- ^a**Cabello-Pasini, A. & Alberte, R. (2001)** Expression of carboxylating enzyme in *Laminaria setchellii* (Phaeophyceae). *Phycologia.*, 40(4): 351-358.
- ^b**Cabello-Pasini, A. & Alberte, R. (2001)** Enzymatic regulation of photosynthetic and light-independent carbon fixation in *Laminaria setchellii* (Phaeophyta), *Ulva lactuca* (Chlorophyta) and *Iridea cordata* (Rhodophyta). *Revista Chilena de Historia Natural.*, 74: 415-422.
- Chapman, A. & Lindley, J. (1980)** Seasonal growth of *Laminaria solidungula* in the Canadian high Arctic in relation to irradiance and dissolved nutrient concentrations. *Marine Biology.*, 57: 1-15.
- Cockell, C. & Blaustein, A. (2001)** Ecosystems, evolution and ultraviolet radiation. Ed. Springer-Verlag. New York. 221 pp.

- Dring, M., Makarov, V., Schoschina, E., Lorenz, M. & Lüning, K. (1996)** Influence of ultraviolet-radiation on chlorophyll fluorescence and growth in different life-history stages of three species of *Laminaria* (Phaeophyta). *Marine Biology.*, 126: 183-191.
- Dunton, K. (1985)** Growth of dark-exposed *Laminaria saccharina* and *Laminaria solidungula* (laminariales: phaeophyta) in the Alaskan beaufort sea. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 94: 181-189.
- Falkowski, P. & Raven, J. (1997)** Aquatic Photosynthesis. Ed. Blanckwell Science. Massachusetts. 335 pp.
- Figueroa, F., Nygard, C., Ekelund, N. & Gómez, I. (2003)** Photobiological characteristic and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. *Journal of Photochemistry and Photobiology.*, 72: 35-44.
- Gernandt, H., Herber, A., Von der Gathen, P. & Kaneto, S. (1998)** Ozone variation in the southern polar stratosphere. *Natl. Inst. Polar Res., Spec. Issue.*, 52: 68-88.
- Gómez, I., Figueroa, F., Ulloa, N., Morales, V., Lovengreen, C., Huovinen, P. & Hess, S. (2004)** Patterns of photosynthesis in 18 species of intertidal macroalgae from southern Chile. *Mar Ecol Prog Ser.*, 270: 103-116.
- ^a**Gómez, I., Figueroa, F., Huovinen, P., Ulloa, N. & Morales, V. (2005)** Photosynthesis of the red alga *Gracilaria chilensis* under natural solar radiation in an estuary in southern Chile. *Aquaculture.* 244: 369-382.
- ^b**Gómez, I., Ulloa, N. & Orostegui, M. (2005)** Morpho-funtional patterns of photosynthesis and UV sensitivity in the kelp *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyta). *Marine Biology.*, (en prensa).

- Häder, D. & Figueroa, F. (1997)** Photoecophysiology of marine macroalgae. *Photochemistry and Photobiology.*, 66: 1-14.
- Han, T. & Kain, J. (1993)** Blue light photoreactivation in ultraviolet-irradiated young sporophytes of *Alaria esculenta* and *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J. Phycol.*, 29: 79-81.
- Hanelt, D., Li, J. & Nultsch, W. (1994)** Tidal dependence of photoinhibition of photosynthesis in marine macrophytes of the South China sea. *Bot. Acta.*, 107: 61-110.
- Hanelt, D., Wiencke, C. & Karsten, U. (1997)** Photoinhibition and recovery after high light stress in different developmental and life-history stages of *Laminaria saccharina* (Phaeophyta). *J. Phycol.*, 33: 387-395.
- Hanelt, D. (1998)** Capability of dynamic photoinhibition Arctic macroalgae is related to their depth distribution. *Marine Biology.*, 131: 361-369.
- Holm-Hansen, O., Lubin, D. & Helbling, W. (1993)** Ultraviolet radiation and its effects on organisms in aquatic environments. En: Environmental UV photobiology. (ed) Young, A. *et al*: 379-425. Plenum press, New York.
- Jiménez, C., Figueroa, F., Salles, S., Aguilera, J. Mercado, J., Viñegla, B., Flores-Moya, A., Lebert, M. & Häder, D. (1998)** Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of southern Spain. *Botanica Marina.*, 41: 329-338.
- Johnston, A. & Raven, J. (1986)** Dark carbon fixation studies on the intertidal macroalga *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta). *J. Phycol.*, 22: 78-83.

- Jones, L. & Kok, B. (1966)** Photoinhibition of chloroplast reactions. 1) Kinetics and action spectrum. *Plant Physiol.*, 41: 1037-1043.
- Kremer, B. (1981)** Metabolic implications of non-photosynthetic carbon fixation in brown macroalgae. *Phycología.*, 20(3): 242-250.
- Küppers, U. & Kremer, B. (1978)** Longitudinal Profiles of Carbon Dioxide Fixation capacities in marine macroalgae. *Plant Physiol.*, 62: 49-63.
- Lee, R. (1989)** Phycology. 2^{ed}. Cambridge University Press. New York. 645pp.
- Lobban, C. & Harrison, P. (1996)** Seaweed ecology and physiology. 2^a. Ed. Cambridge University Press. 376 pp.
- Lovengreen, C., Fuenzalida, H & Villanueva, L. (2000)** Ultraviolet solar radiation at Valdivia, Chile. *Atmospheric Environment.*, 34: 4051-4061.
- Lüning, K., Schmitz, K. & Willenbrink, J. (1973)** CO₂ fixation and translocation in benthic marine algae. III. Rates and ecological significance of translocation in *Laminaria hyperborea* and *L. saccharina*. *Marine Biology.*, 23: 275-281.
- Madronich, S. McKenzie, R., Caldwell, M. & Björn, L. (1995)** Changes in Ultraviolet Radiation reaching the earth's Surface. Royal Swedish Academy of Sciences. *Ambio.*, Vol. 4 n°3.
- Magnusson, G. (1997)** Diurnal measurements of F_v / F_m used to improve productivity estimates in macroalgae. *Marine Biology.*, 130: 203-208.
- Orce, L. & Helbling, W. (1997)** Latitudinal UVR-PAR measurements in Argentina: extent of the 'ozone hole'. *Global and Planetary Change.*, 15: 113-121.

- Santelices, B. (1989)** Algas Marinas de Chile. Facultad de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 382 pp.
- Schofield, O., Kroon, B. & Prézelin, B. (1995)** Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for antarctic ice algae communities. *J. Phycol.*, 31: 703-715.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C. (1994)** Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *Ecol. Studies.*, 100: 49-70.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H. & Schimper, A. (1994)** Fisiología del metabolismo material y energético. 8^o ed. En: Tratado de Botánica. (ed) Omega 252:320.
- Vegas, P., Gómez, I., Orostegui, M. & Ulloa, N. (2004)** Patrones fotosintéticos en 4 especies de macroalgas de la costa Valdiviana. *Libro Resumen XXIV Congreso de Ciencias del Mar*. Página, 253.
- Westermeier, R., Müller, D., Gómez, I., Rivera, P. & Wensel, H. (1994)** Population biology of *Durvillaea antarctica* and *Lessonia nigrescens* (phaeophyta) on the rocky shores of southern Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 110: 187-194.
- Westermeier, R. & Gómez, I. (1996)** Biomass energy contents and major organic compounds in the brown alga *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyceae) from Mehuín, south Chile. *Botanica Marina.*, 39: 553-559.