

00366



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



EFFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV-A Y RUV-B) EN LA EFICIENCIA FOTOQUÍMICA Y LA PRESENCIA DE MICOSPORINAS PARECIDAS A LOS AMINOÁCIDOS (MAAs) EN DOS CORALES CON SIMBIONTES DE FILOTIPO DIFERENTE

T E S I S

que para obtener el grado académico de

Maestra en Ciencias

(Biología Marina)

P r e s e n t a

MARÍA GUADALUPE BARBA SANTOS

Directora de tesis: Dra. Anastazia T. Banaszak

Comité Tutorial: Dr. Roberto Iglesias Prieto

Dra. Patricia Thomé Ortiz

Dr. Juan Pablo Carricart Ganivet

Dr. Helmut Maske

Puerto Morelos, Quintana Roo, Noviembre del 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis padres

Antonio Barba y Eloisa Santos

a mis hermanas

Rosario y Josefina

a mis sobrinas

Karlita, Tanis y "Vale"

porque los amo

Para que tus estudios sean provechosos, necesitas hacerlos con interés y con alegría. El interés ha de creártelo tu necesidad o tu propósito de prepararte bien para una existencia útil. La alegría has de sentirla por el sólo hecho de que puedes dedicarte, sin amarguras y sin preocupaciones, a esa preparación que habrá de transformarte en un ser mejor. Considérate, pues, dichoso, porque tienes aquello de que muchos carecen: una oportunidad de saber, una ocasión de elevarte, un medio de servir y de servirte. Pero has de persistir, porque sin esfuerzo nada llega a su término, nada es fecundo.

Menos mal que la memoria del hombre tiene capacidad para guardar tantas cosas. Sin memoria, si se olvida lo pasado, el hombre no podría vivir ni para lo presente ni para lo futuro.

Agradezco a todas las personas que intervinieron en la realización de esta tesis

A mi directora de tesis Ania Banaszak no solo por la oportunidad sino por su amistad, apoyo y consejos.

Al comité tutorial: Roberto Iglesias, Patricia Thomé, por el uso del equipo de su laboratorio, su asesoramiento y su disposición; Helmut Maske y Juan Pablo Carricart, por las porras.

A la UNAM, al ICMYL y a la UAPM por darme la oportunidad.

El apoyo del M. en C. Francisco Ruiz Rentería y el Servicio de Hidrografía y Meteorología UAPM, ICML-UNAM / CARICOMP por proveer los datos de irradiancia. A todo el personal de la Unidad Académica Puerto Morelos. A Susana Enríquez por el uso de su espectrofotómetro.

El apoyo financiero otorgado por CONACYT (beca No. 144220), DGEP-UNAM y al Edwin W. Pauley Summer Program 2002. Al proyecto de Radiación Ultravioleta en Corales, No. 32022-N del CONACYT y del apoyo del ICMYL.

De igual forma quiero agradecer a aquellos que a lo largo del camino me han apoyado y dado su confianza tanto en el ámbito académico como en el personal. Es imposible nombrarlos a todos así que solo nombrare a algunos, a mis compañeros y amigos, Xavier, Aimeé, Norma, Gaby†, Hugo, Nata, Toño López, Lupita Cortes. A Donald y Anielka. A las familias Basurto, Ramírez, León. A los chicos de la estación por sus porras. Pati, siempre que voy a la Posada tienes una sonrisa para todos nosotros. A Martín Merino, Gabriela Almaraz, Sergio Castillo, Yeini, Juanita. A Roberto Iglesias y Paty Thome.

A mi familia a la que nunca podré pagar todo lo que me han dado y gracias. Papá. Mamá, por su ejemplo y el saber que siempre podré contar con ustedes; Bebe y Mau, por sus consejos; Pina, Victor, Karla, Tania, Vale y el pilón. Y por supuesto a Xavier, por su apoyo, confianza y amor durante este tiempo.

Indice

Indice	I
Lista de Figuras.....	III
Lista de Tablas.....	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCION	1
Radiación solar	1
Los efectos de la RUV	2
El daño a la actividad fotosintética	7
Generación de las especies reactivas y fotoinhibición.....	9
Fotoprotección de la UV	12
Micosporinas parecidas a aminoácidos (MAAs).....	13
Origen de las MAAs	14
Diversidad filotípica de los simbioses.....	15
Relación entre el filotipo del simbiote y MAAs	16
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares	17
METODOLOGÍA.....	19
Obtención de colonias de corales.....	19
Exposición de fragmentos de coral.....	19
Irradiancia	20
Monitoreo de la eficiencia fotoquímica	21
Monitoreo de densidad algal, clorofilas y MAAs.....	22
Separación de tejido de coral y algas simbioses	22
Eficiencias de extracción de las MAAs	23
Análisis de los espectros de absorción.....	25
Clorofilas	25
Densidad algal.....	25
Análisis de datos	26
RESULTADOS	27

Irradiancia	27
Fluorescencia	30
Ciclo diurno de la fluorescencia	34
Ciclo diurno por tratamiento.....	34
Caída relativa de la cosecha cuántica y presión sobre el FSII	36
Tasa de transporte de electrones	37
Clorofilas	37
Densidad, índice mitótico (IM) y tamaño de simbiontes.....	44
Eficiencias de extracción de las MAAs	48
Micosporinas parecidas a aminoácidos.....	48
DISCUSION	56
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA	71
APENDICE.....	84
La señal de fluorescencia.....	84

Lista de Figuras

Fig. 1. Esquema de la cadena de transporte de carga del fotosistema II	8
Fig. 2. Irradiancia diaria registrada durante el experimento	28
Fig. 3. Cambios en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila <i>a</i> durante el ciclo diurno	32
Fig. 4. Ciclo diurno de <i>P. astreoides</i> y <i>D. strigosa</i>	33
Fig. 5. Disminución relativa de la cosecha cuántica	35
Fig. 6. Presión sobre el FSII a las 14:00 ($Q_{14:00}$)	38
Fig. 7. Cosecha cuántica máxima en relación a la irradiancia total diaria y presión a las 14:00 en función de la exposición acumulada	39
Fig. 8. Presión sobre el FSII a las 14:00 ($Q_{14:00}$) en relación con la exposición acumulada al día anterior.	40
Fig. 9. Variación de la tasa de transporte de electrones	41
Fig. 10. Densidad de clorofilas <i>a</i> y <i>c2</i>	43
Fig. 11. Densidad de clorofilas <i>a+c2</i> y proporción de clorofilas <i>a:c2</i> de ambas especies	44
Fig. 12. Concentración celular de clorofilas <i>a:c2</i>	45
Fig. 13. Densidad, índice mitótico y diámetro celular de los dinoflagelados simbioses	47
Fig. 14. Espectros de absorción de MAAs	51
Fig. 15. Cambios en los espectros de absorción del tejido coralino	52
Fig. 16. Cambios en los espectros de absorción de los dinoflagelados aislados	53

Lista de Tablas

Tabla 1. Irradiancia registrada durante el experimento	29
Tabla 2. Parámetros de la fluorescencia de <i>P. astreoides</i> y <i>D. strigosa</i>	31
Tabla 3. Coeficiente y eficiencia de extracción de los protocolos examinados	49
Tabla 4. Longitudes de onda de máxima absorción en los picos de MAAs	54
Tabla 5. Relación de la absorbancia de MAAs por unidad de Chl <i>a</i>	55

RESUMEN

Los arrecifes tropicales se caracterizan por alta incidencia de radiación ultravioleta (RUV) tanto UV-B (280-320 nm) como UV-A (320-400 nm) debido a la capa delgada de ozono en el ecuador. La RUV tiene un efecto inhibitorio en la fotosíntesis, por lo que varias especies han desarrollado mecanismos de protección, por ejemplo, la síntesis de compuestos que absorben RUV como las micosporinas parecidas a aminoácidos (MAAs). El propósito de este trabajo fue evaluar los efectos de la exposición a PAR y RUV en la eficiencia fotoquímica y en la presencia de MAAs en dos corales *Porites astreoides* y *Diploria strigosa*. Los organismos fueron expuestos durante 30 días a PAR, PAR+UVA y PAR+UVA+UVB de luz solar natural. La diferencia entre la presencia y la ausencia de luz ultravioleta en la eficiencia fotoquímica del PSII en los dinoflagelados de las dos especies fue de aproximadamente un 5%. Este incremento en la eficiencia fotoquímica no se ve reflejado en la tasa de transporte de electrones por lo que se sugiere que los organismos expuestos a UVB dan preferencia a reparar los daños ocasionados a la célula por lo que disminuye la energía para el FSII. Es también probable que intervengan otros mecanismos que pueden participar cuando los organismos son expuestos a baja luz. La densidad de los simbioses, su tamaño y el contenido de clorofilas aunque no significativos evidenciaron las tendencias de los organismos en respuesta a las condiciones espectrales. Los MAAs se encontraron en tejido y simbioses aislados de ambas especies. El dinoflagelado simbiote de *D. strigosa*, perteneciente a los filotipos B o C que en cultivo no los sintetiza, *in hospite* si presenta MAAs. La absorción por MAAs en *P. astreoides* (hospedero y su simbiote de filotipo A) no cambia a través del tiempo lo mismo que el simbiote de *D. strigosa*, mientras que en el hospedero *D. strigosa* expuesto a todo el espectro solar se define un pico de absorción. Sin embargo, la disminución de la eficiencia fotoquímica en ambos corales expuestos a todo el espectro solar sugiere que la presencia de MAAs en *P. astreoides* y *D. strigosa* podría no ser suficiente para proteger a los corales de los efectos de la RUV a largo plazo.

INTRODUCCION

En años recientes la disminución del ozono estratosférico sobre la Antártida en el verano austral ha llevado a incrementar los niveles de UV-B en la superficie de la tierra, por ello sus efectos, tanto genéticos como fisiológicos, no sólo en plantas y animales terrestres, sino también en organismos del ambiente marino, han llegado a ser un tópico de gran interés para la comunidad científica. Diferentes estudios han llevado a los investigadores a concluir que la disminución en la productividad primaria probablemente afectaría por efectos cascada a todos los niveles tróficos (Bothwell *et al.* 1994). Sin embargo, el hecho es que las regiones tropicales reciben los niveles más altos de RUV al nivel del mar en la tierra (Baker *et al.* 1980). Estudiar los mecanismos de adaptación empleados por organismos en lugares donde la RUV es alta podría ser bastante útil para estimar los costos especie-específicos asociados con la mitigación de los efectos de la RUV ambiental en los trópicos antes de hacer predicciones considerando los efectos del exceso de RUV a altas latitudes.

El factor ambiental más importante que regula el crecimiento y desarrollo de los organismos autótrofos, es la luz, ya que provee la fuente de energía para la fotosíntesis. El éxito de los corales arrecifales ha sido atribuido a la relación simbiótica con los dinoflagelados fotosintéticos que viven dentro de sus tejidos (Trench 1979). Estos simbioses son de gran importancia para el hospedero debido a que una gran porción de los requerimientos energéticos del coral es satisfecha por la transferencia de carbono fijado fotosintéticamente por el simbiote al hospedero (Muscatine 1987, Muscatine *et al.* 1981). La presencia de los dinoflagelados simbioses limita la distribución de los corales hermatípicos a zonas eufóticas, con aguas transparentes, cálidas y oligotróficas, características de los trópicos.

Radiación solar

El efecto de la radiación solar en los procesos químicos y biológicos depende tanto de su intensidad como de su distribución espectral. La luz solar que llega a la superficie terrestre es dividida en tres bandas: infrarrojo, visible y ultravioleta. De la radiación solar considerada como visible, el intervalo de longitudes de onda de 400 a 700 nm es

también conocido como Irradiancia Fotosintéticamente Activa (PAR, por sus siglas en inglés: Photosynthetically Active Radiation) debido a que concuerda con el intervalo de absorción de los pigmentos que intervienen en los procesos fotosintéticos. La radiación ultravioleta (UVR, por sus siglas en inglés: UltraViolet Radiation), es la porción del espectro electromagnético del sol entre las longitudes de onda de 200 a 400 nm. La energía de estas longitudes de onda rompe y altera la estructura y función de las moléculas. La RUV se divide en tres sub-bandas basándose en sus características físicas y efectos biológicos: UV-C (200-280nm), UV-B (280-320 nm) y UV-A (320-400 nm) (Falkowski y Raven 1997). La UV-C es absorbida en la estratosfera principalmente por el oxígeno molecular y el ozono. Desde el punto de vista biológico es letal. Tanto UV-B como UV-A penetran a la tierra. La RUV que llega a la superficie de la tierra tiene una variación natural. Los factores que afectan dicha variación incluyen geométricos (hora del día, ángulo cenit solar, distancia sol-tierra, altitud, latitud, estación), atmosféricos (nubes, aerosoles) y el albedo (Díaz *et al.* 2000a, 2000b). Asimismo las longitudes de onda cortas de la UV-B son absorbidas por el ozono, por lo que la intensidad de la UV-B depende de la cantidad de ozono estratosférico que actúe como filtro. Las longitudes de onda más largas de UV-B y las de UV-A no son afectadas por el ozono.

Al entrar al agua la RUV se reduce debido a las influencias combinadas del agua y la absorción y esparcimiento de las partículas (Díaz *et al.* 2000a, 2000b) por lo que cambia tanto en cantidad como en calidad espectral (Kirk 1994). Se han registrado niveles biológicamente efectivos de RUV solar en la columna de agua en zonas tropicales a profundidades de al menos 30 m para UV-B y 39 m para UV-A (Shick *et al.* 1996). Esto se debe no solo a la transparencia a la RUV de las aguas oceánicas tropicales sino también a la relativa delgadez de la capa de ozono ecuatorial. Debido a lo anterior los organismos de aguas someras están expuestos a altas irradiancias tanto de las longitudes de onda del visible como las del ultravioleta lo que les representa un problema.

Los efectos de la RUV

En las regiones tropicales no se han registrado cambios en el grosor de la capa de ozono que es delgada y permite una mayor penetración de RUV. Por lo anterior los organismos

arrecifales de aguas someras normalmente están expuestos a altos niveles de radiación ultravioleta solar. Las radiaciones UV-B y las longitudes de onda cortas de UV-A, pueden inhibir la fotosíntesis algal y pueden ser fisiológicamente dañinas para muchas formas de vida marina incluyendo la epifauna de los arrecifes coralinos. Ello se debe a que las moléculas biológicamente importantes como ADN, ARN y proteínas absorben y son dañadas por la RUV. La UV-B causa mayor daño a los organismos porque al nivel celular es absorbida por compuestos aromáticos. La UV-A es menos dañina que la anterior puede causar daño indirecto originando especies reactivas.

De manera general el daño celular por la exposición a UV puede ocurrir por una reacción fotoquímica directa, por ejemplo la dimerización de timina en el ADN, ó indirectamente la producción fotodinámica de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en ingles: Reactive Oxygen Species) tales como oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y radicales superóxido (O_2^-). Por consiguiente, los organismos que habitan aguas someras y expuestos a altos niveles de RUV solar se han adaptado y evolucionado para resistir la exposición.

En el aparato fotosintético los efectos de la luz ultravioleta han sido definidos a partir de la exposición de membranas fotosintéticas aisladas. Renger *et al.* (1986a, 1986b) sugirieron que la RUV modifica sobretudo la proteína de enlace de las plastoquinonas primarias y secundarias del lado aceptor del FSII (apoproteína Q_A - Q_B), que conduce simultáneamente a un bloqueo funcional del aceptor primario. Greenberg *et al.* (1989) encontraron que el sitio de daño de la UV-B es la proteína 32-kDa del centro de reacción del FSII, que forma parte de D1. La UV-B produjo una mayor tasa de degradación de D1 que la luz visible, por lo que una porción significativa de la degradación de la proteína 32-kDa en la luz solar es atribuida a la UV-B. Sin embargo, el hecho de que la radiación ultravioleta perjudique prácticamente todos los procesos biológicos ocasiona que sea complejo individualizar los efectos dentro del organismo. Se ha comprobado que la tolerancia a la UV-B del aparato fotosintético en microalgas esta asociado con una gran capacidad para recuperarse del daño por UV-B y esta relacionada con el ciclo de reparación y recambio de D1 (Xiong 2001). Niveles moderados de PAR durante la

exposición a UV-B disminuyen la pérdida neta de D1 y D2 incrementando la tasa de síntesis *de novo* de proteínas dentro del cloroplasto (Vass *et al.* 1999).

Existen trabajos en los que se evidencian los efectos de la RUV sobre organismos arrecifales. Jokiel (1980) demostró que la epifauna arrecifal críptica moría al ser sometida a la exposición aguda de RUV solar en aguas someras. La muerte podía ser evitada si los organismos eran colocados bajo filtros que absorbieran UV y transmitían luz visible. Sugirió que la estructura de los arrecifes de coral era afectada por la tolerancia relativa de sus especies constituyentes. Por lo tanto, la luz ultravioleta puede ser considerada como un factor físico significativo que regula la distribución de organismos en un arrecife de coral.

Los corales son el componente más conspicuo en los arrecifes coralinos. El crecimiento de los corales hermatípicos o constructores en aguas tropicales es responsable de la estructura del arrecife de coral. Esto es posible gracias a la simbiosis que existe entre corales y dinoflagelados, o sea, un consumidor y un productor primario. Los dinoflagelados transfieren carbono fijado fotosintéticamente a los tejidos de sus hospederos, siendo el glicerol el compuesto más común. La transferencia de fotosintetatos por el dinoflagelado simbiote representa en algunos casos más del 100% de los requerimientos metabólicos basales de las asociaciones intactas (Muscatine *et al.* 1981). En tanto que el hospedero provee a los dinoflagelados de compuestos como dióxido de carbono, nitrógeno y fósforo. Debido al alto grado de integración ecológica y nutricional presente en la simbiosis los dinoflagelados son cruciales para el funcionamiento de los corales y cualquier evento que perturbe la relación entre ellos puede tener consecuencias para la supervivencia del holobionte.

Existe evidencia que sugiere que la radiación UV en el ambiente arrecifal podría ser en asociación con alto PAR y/o temperatura (Lesser *et al.* 1990) un agente causal del fenómeno de blanqueamiento de corales (coral bleaching), fenómeno en el que se rompe la relación simbiótica entre el coral y los dinoflagelados simbiotes (Lesser *et al.* 1990, Brown *et al.* 1995) y consiste en la desaparición de los simbiotes de los tejidos del hospedero o la pérdida de pigmentos fotosintéticos en los dinoflagelados simbiotes

(Hoegh-Guldberg y Salvat 1995, Brown 1997). Aunque se considera que el blanqueamiento en arrecifes de coral tiene como factor ambiental primario el incremento en la temperatura (Fitt *et al.* 2001) existe evidencia de que no todos los eventos de blanqueamiento están relacionados con el incremento en la temperatura y que la UV puede jugar un papel en el blanqueamiento, particularmente en combinación con el incremento en temperatura del agua de mar (Brown 1997).

Se ha demostrado que la exclusión a largo plazo de la RUV causa un incremento en la tasa de calcificación en los corales (Jokiel y York 1982, Gleason 1993, Kuffner 2001b). Por otra parte la exposición de diferentes corales a RUV artificial produjo en los corales diferentes síntomas, retraimiento en el coralito, descarga de mucus, extrusión de los filamentos mesenteriales e incluso la muerte (Siebeck 1981, 1988). En *Porites porites* se comprobó el daño al ADN con la formación de dímeros de timina y su variación al ser expuesto a diferentes dosis de RUV (Anderson *et al.* 2001). Asimismo se comprobó el descenso de la tasa de supervivencia de plánulas de *Agaricia agaricites* hasta en un 74% dependiendo de la profundidad y origen de las larvas (Gleason y Wellington 1995) y disminución de la tasa de asentamiento de las plánulas de *Pocillopora damicornis* (Baker 1995, Kuffner 2001a) debido a la RUV. Wellington y Fitt (2003) observaron que en *Acropora palmata*, *Montastraea annularis* y *M. franksi* había menor supervivencia de larvas originadas de colonias de mayor profundidad, debido principalmente a la UV-B y en menor proporción a la UV-A. La exposición a la RUV reduce la densidad de simbioses en algunas especies de coral (Gleason y Wellington 1993, Shick *et al.* 1999) al igual que en otros cnidarios simbióticos (Lesser *et al.* 1990). Asimismo, se ha reportado que la RUV aumenta la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa tanto en el hospedero como en el simbiote (Lesser *et al.* 1990, Lesser 1996).

Estos resultados sugieren que la RUV es un parámetro ecológico importante el cual influencia la fisiología y el crecimiento de corales bajo condiciones ambientales normales en arrecifes de coral.

Por otra parte, existen trabajos en los que se evidencian los efectos de la RUV sobre los dinoflagelados simbiotes. Además de inhibir la fotosíntesis, la RUV modifica diversos procesos metabólicos, que a largo plazo afectan el crecimiento y la supervivencia de los dinoflagelados (Jokiel y York 1982, 1984, Banaszak y Trench 1995a, 1995b). La RUV disminuye la tasa de crecimiento de dinoflagelados simbiotes en cultivo entre los que se encuentran de *Symbiodinium microadriaticum* aislado de la anémona *Aiptasia tagetes* (Jokiel y York 1982, 1984) y *S. californium* (Banaszak y Trench 1995a). El índice mitótico de los dinoflagelados simbiotes también es afectado por la exposición a UV ya sea disminuyendo como en los simbiotes del morfo café de *P. astreoides* (Gleason 1993), o bien aumentando como sucede en los de *Stylophora pistillata* y *Acropora* sp. (Shick *et al.* 1999). También se ha encontrado que disminuye la movilidad de *S. microadriaticum* y *S. californium* (Banaszak y Trench 1995a). Entre los cambios morfológicos que ocasiona la RUV se encuentran la formación de paredes multicapa en dinoflagelados en cultivo (Banaszak y Trench 1995a), disminución de la densidad superficial de las lamelas del tilacoide del cloroplasto y aumento del volumen de cuerpos de acumulación (asociados con envejecimiento de la célula y autofagia) (Lesser y Shick 1990). La exposición a RUV también ocasiona un aumento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y ascorbato peroxidasa dentro de las células del simbiote (Lesser *et al.* 1990, Shick *et al.* 1991, Lesser 1996). La densidad de clorofilas puede no ser afectada (Jokiel y York 1982, Scelfo 1985, Lesser *et al.* 1990, Shick *et al.* 1991), o bien disminuir (Gleason y Wellington 1993, Lesser 1996). La concentración de clorofila por célula de simbiote al igual que la densidad puede no ser influida (Lesser y Shick 1989b, Gleason y Wellington 1993, Banaszak y Trench 1995a) o bien reducirse (Banaszak y Trench 1995a, Lesser 1996).

Las radiaciones UV-B y las longitudes de onda cortas de UV-A, pueden inhibir la fotosíntesis algal. Diversos estudios han señalado que tanto la radiación UV-B, como la UV-A producen fotoinhibición, siendo la UV-B muy efectiva debido a la mayor energía de sus fotones. Los papeles relativos de la UV-A y UV-B no han sido totalmente descritos, porque aunque el daño ponderado debido a UV-B es mayor que el de UV-A, la proporción entre UV-B y UV-A en la radiación natural es solo 3:100 (Cullen y Neale

1994). Por lo que, en la naturaleza, el efecto inhibitorio de la UV-A parece ser también importante debido al mayor flujo de fotones UV-A de la radiación solar incidente. La mayoría de los estudios no distinguen entre los efectos de la UV-A (320–400 nm) y aquellos de la UV-B (280–320 nm) a pesar de que los organismos pueden tener diferentes respuestas a cada banda de RUV. La inhibición de la fotosíntesis por la RUV ha sido demostrada en dinoflagelados simbióticos, tanto aislados (Lesser y Shick 1989a, Masuda *et al.* 1993, Shick *et al.* 1995) como *in hospite* (Jokiel y York 1982, Shick 1993, Masuda *et al.* 1993, Lesser y Lewis 1996, Lesser 2000), así como en dinoflagelados de vida libre *in situ* (Banaszak y Neale 2001) y en cultivo (Neale *et al.* 1998). Fitt y Warner (1995) encontraron que en el coral *Montastraea annularis* la UV-A y las longitudes de onda del azul inhibían más la fotosíntesis que la UV-B.

En otros cnidarios simbióticos también se ha encontrado un efecto inhibitorio de la RUV en la fotosíntesis de los dinoflagelados tanto en cultivo (Jokiel y York 1982, Lesser 1996) como *in hospite* y recién aislados (Shick 1993).

El daño a la actividad fotosintética

Los procesos fotosintéticos se saturan rápidamente cuando el flujo lumínico supera la capacidad del organismo para utilizarlo en la fotoquímica primaria, por lo que la energía luminosa en exceso es potencialmente dañina para la maquinaria fotosintética. Los tejidos de los corales constructores de arrecifes son relativamente transparentes lo cual facilita la transmisión de la luz fotosintéticamente activa a la célula endosimbiótica (Dunlap *et al.* 1988). La cantidad de luz recibida por el dinoflagelado simbiote es modificada por el hospedero, atenuando o incrementando el esparcimiento por los tejidos y esqueletos, en algunos casos, debido al empaquetamiento de los simbioses, el autosombreamiento modifica los campos lumínicos que el alga percibe. Se ha comprobado que la morfología del hospedero puede modificar el micro-hábitat de los simbioses en una escala de cm a mm (Kühl *et al.* 1995). Incluso el campo lumínico dentro de un solo pólipo puede ser heterogéneo (Kühl *et al.* 1995, Ralph *et al.* 2002). Trabajos realizados actualmente muestran que la amplificación del PAR debido al

esqueleto del coral puede ser de 10 veces o más, siendo menor para la RUV (R. Iglesias-Prieto y S. Enríquez, Com. Pers.).

Esta energía luminosa es absorbida por la clorofila y los pigmentos accesorios que se encuentran anclados a complejos pigmento-proteína conocidos también como antenas fotosintéticas. Estas antenas fotosintéticas se ubican en la membrana del tilacoide y están asociadas a los llamados centros de reacción o fotosistemas a los que transfieren la energía absorbida. Es con esta energía que se lleva a cabo la separación de carga en el Fotosistema II (FSII) que inicia el transporte de electrones de la fotoquímica primaria. En la reacción fotoquímica primaria, un electrón es transferido desde el pigmento P_{680} en el primer estado excitado de singlete (P_{680}^*) a la feofitina. De allí el electrón es transferido al aceptor primario Q_A (tipo quinona). La separación de carga crea un oxidante altamente activo, P_{680}^+ . Este recibe un electrón desde el donador secundario Z , que ha sido identificado como residuo tirosina de la proteína D1. El donador oxidado, Z^+ , es reducido por un electrón del sistema de oxidación del agua. En una reacción más lenta, que puede involucrar un átomo de hierro, el electrón es transmitido a la quinona Q_B . Después de recibir dos electrones, Q_B liga dos protones del lado del lumen de la membrana del tilacoide y se combina en el pool de plastoquinona (PQ)/plastohidroquinona (PQH) (Fig. 1).

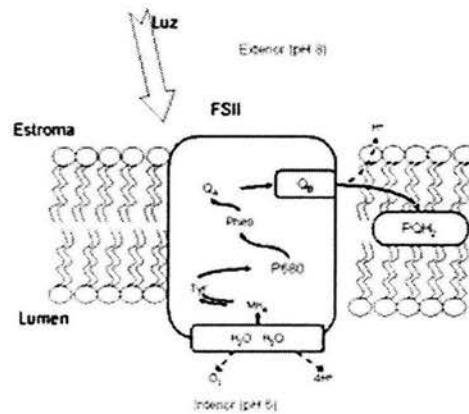


Fig. 1. Esquema de la cadena de transporte de carga del fotosistema II.

Generación de las especies reactivas y fotoinhibición

La absorción de fotones lleva a la clorofila-*a* (Chl-*a*) a un estado excitado de singlete ($^1\text{Chl-}a^*$) del cuál puede retornar a su estado basal mediante la canalización de la energía a las reacciones de fotoquímica primaria las cuáles representan una vía muy importante de desactivación de la energía de excitación. Esta energía también puede ser reemitida en forma de fotones en lo que se conoce como fluorescencia de la cuál se estima que disipa la energía de aproximadamente un 0.6-3% de los fotones absorbidos. Cuando la absorción de fotones supera la capacidad del organismo para utilizarlos, se incrementa el tiempo de permanencia de la clorofila en singlete lo que aumenta la probabilidad de la formación de la forma de triplete de la clorofila ($^3\text{Chl-}a^*$) del cuál puede retornar a su estado basal transfiriendo su energía al O_2 o bien mediante la emisión de fotones conocidos como fosforescencia. La transferencia de la energía al oxígeno genera su forma singlete ($^1\text{O}_2^*$) la cuál es una especie altamente reactiva capaz de oxidar lípidos, proteínas y pigmentos de la membrana del tilacoide. Los lípidos tienen un papel alrededor del FSII como cofactores de pigmentos así como estabilizadores de subunidades proteicas como la subunidad D1 del FSII, por lo que su daño resulta en la inactivación de este centro de reacción (Niyogi 1999, 2000). Se ha observado que la proteína D1 tiene una alta tasa de recambio por lo que se considera como un sitio muy susceptible al daño (Greenberg *et al.* 1989). Esta inactivación de los centros de reacción ha sido propuesta como un mecanismo de protección conocido como fotoinhibición.

Cuando las condiciones lumínicas exceden la capacidad de los organismos de utilizar la energía, se acumula energía en exceso que genera daño dentro del aparato fotosintético afectando su buen desempeño. Existen mecanismos encargados de disipar una parte importante de esta energía en exceso en forma de calor a los cuáles se les ha denominado como mecanismos de desactivación no-fotoquímica o NPQ (por sus siglas en inglés: Non-Photochemical Quenching). Estos mecanismos involucran la interconversión de pigmentos protectores denominados xantofilas, a los cuales se propone la clorofila transfiere la energía de excitación y estos la liberan en forma de calor, con cambios conformacionales para que esto suceda y que promueven propiedades protectoras. A estos mecanismos se les ha denominado como desactivadores

dependientes de la energía (q_E), debido a que su activación depende del incremento del gradiente de pH entre el lumen y el estroma del tilacoide como resultado del transporte de electrones, y es el que más aporta al NPQ total del organismo. Existe también la posibilidad de redistribuir la energía entre los fotosistemas I y II mediante la migración de las antenas de un centro de reacción a otro, en lo que se conoce como los estados de transición de las antenas fotosintéticas (q_S). Finalmente el último componente corresponde a la desactivación por fotoinhibición (q_I) e involucra los mecanismos de reparación de los elementos dañados del aparato fotosintético.

La fotoinhibición de la fotosíntesis se define como el efecto debilitante de altas intensidades de luz visible sobre la capacidad fotosintética de los organismos. El término se extiende para incluir los efectos de la luz ultravioleta en las reacciones del cloroplasto (Jones y Kok 1966). La inhibición puede ser el resultado ya sea de procesos que sirven para desactivar la energía de excitación de los centros de reacción II, desactivación de estos centros de reacción o ambos. La disminución de la fotosíntesis a altas irradiancias puede ser debido a un fotodaño en el aparato fotosintético y/o a una estrategia de protección llamada fotoinhibición. La recuperación de la fotosíntesis es más rápida en la fotoinhibición que en el fotodaño.

El daño fotoinhibitorio a los centros de reacción II se presenta cuando la capacidad de los mecanismos protectores es agotada. Por lo general, resulta de la degradación de la proteína D1 del centro de reacción II, que usualmente es reparada en pocas horas (Warner *et al.* 1996). Cada especie reacciona de diferente manera a la fotoinhibición, así como la capacidad para recuperar la fotosíntesis. El ciclo de daño y reparación del FSII implica el desacoplamiento del holocomplejo y la degradación y sustitución de la proteína D1/32K (Aro *et al.* 1993, Melis 1999). El ciclo de reparación y daño del FSII es esencial para la fotosíntesis. Debido a todos los mecanismos implicados en dicho ciclo el costo energético de su mantenimiento es alto.

Mediciones de la inducción de la fluorescencia de la clorofila *in vivo* han sido usadas para estimar la cosecha cuántica potencial del FSII en organismos adaptados a la oscuridad. La principal ventaja del análisis de la actividad fotosintética por medio de la

fluorescencia de la clorofila es la naturaleza no invasiva de la técnica y el desarrollo de la fluorimetría de pulsos de amplitud modulada (PAM, por sus siglas en inglés: pulse amplitude modulated) ha permitido estudios de fluorescencia para medir la cosecha efectiva del FSII bajo condiciones de ambiente lumínico (Schreiber y Bilger 1993). La técnica tiene las siguientes ventajas: es no-invasiva, las mediciones se realizan *in situ* y es cuantitativa, además de que la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (FSII) (F_v/F_m) puede ser un indicador de la condición fotosintética de los organismos.

Hace aproximadamente 10 años se desarrolló un PAM sumergible que permitió realizar investigaciones directamente bajo el agua, éste, conocido como Diving PAM (Walz, Alemania), trabaja considerando que la cosecha cuántica total de la conversión fotoquímica de la energía puede ser dada por

$$\text{Cosecha cuántica} = \frac{(F_m' - F)}{F_m'} = \frac{\Delta F}{F_m'} \quad 1$$

Esta expresión fue introducida por Genty *et al.* (1989). La fluorimetría de pulsos modulados permite la cuantificación de la activación fotoquímica (q_p) y no-fotoquímica (NPQ), admitiendo de ese modo la delineación de procesos de fotoprotección versus fotodaño durante estrés inducido de forma ambiental o experimentalmente (Krause y Weis 1991, Schreiber y Bilger 1993). Debido a que los corales típicamente contienen altas densidades de dinoflagelados simbioses que viven dentro de las delgadas capas del tejido animal, la fluorimetría de pulsos de amplitud modulada es valiosa para el análisis del estado fisiológico del simbionte mientras permanece *in hospite* (Warner *et al.* 1996).

En corales, el primer trabajo en el que se mide la tasa de transporte de electrones (ETR) y la cosecha cuántica utilizando el Diving-PAM y bajo condiciones naturales fue realizado por Beer *et al.* (1998). Ralph *et al.* (1999) fueron los primeros en publicar los cambios diurnos en F_v/F_m así como en la ETR en *Acropora aspera*, *Goniastrea* sp. y *Porites* sp. Ellos informaron que las tres especies de coral presentaban una depresión aparente al mediodía, de la cual se recuperaban durante la tarde, cuando la irradiancia disminuía. Ellos propusieron que la disminución se debía a la activación de mecanismos de fotoprotección. Posteriores investigaciones mostraron que la cosecha cuántica de los

dinoflagelados simbióticos dentro de los corales disminuía después del amanecer hasta alcanzar un mínimo entre el mediodía y las primeras horas de la tarde, recuperándose a los primeros niveles del amanecer durante la tarde. Este patrón ha sido informado para diferentes especies tanto de corales (Brown *et al.* 1999b, 2000, Hoegh-Guldberg y Jones 1999, Gorbunov *et al.* 2001, Jones y Hoegh-Guldberg 2001, Lesser y Gorbunov 2001, Winters *et al.* 2003) como de hidrocorales (Banaszak *et al.* 2003). Al anochecer Jones y Hoegh-Guldberg (2001) muestran una disminución en la cosecha cuántica que atribuyen a la posible existencia de una cadena de transporte de electrones dependiente de oxígeno dentro del cloroplasto llamada clororespiración. Este fenómeno no fue observado por Gorbunov *et al.* (2001) en sus mediciones con un fluorómetro de alta repetición (FRRF, por sus siglas en inglés: Fast Repetition Rate Fluorometer). Sin embargo, existe evidencia de que el evento de la disminución de la cosecha cuántica durante la noche se origina en la clororespiración en los dinoflagelados simbiotes de coral (Hoegh-Guldberg y Jones 1999, R. Iglesias-Prieto y X. Hernandez-Pech Com. Pers.).

El primer trabajo donde se evaluó el efecto diferencial de la UV sobre la eficiencia fotoquímica de los dinoflagelados simbiotes *in hospite* fue realizado por Fitt y Warner (1995). Estos autores expusieron a *Montastraea annularis* a diferentes condiciones espectrales y a una temperatura de 32°C y encontraron que los niveles naturales de UV-B tenían muy poco efecto. Mientras que la exposición a UV-A y luz azul ocasionaron que la eficiencia fotoquímica disminuyera más rápido que la exposición a PAR.

Fotoprotección de la UV

La radiación ultravioleta puede ocasionar en los organismos efectos deletéreos que se manifiestan genéticamente y fisiológicamente, sin embargo, los organismos marinos no están indefensos. Muchos organismos poseen una variada capacidad para reparar y mitigar el daño inducido por la RUV. Se han identificado varios mecanismos que protegen a los organismos contra el daño de la RUV: bloqueadores o pantallas (tanto físicos como bioquímicos), desactivación y reparación (Roy 2000, Banaszak y Neale 2001, Banaszak 2003). La efectividad de los mecanismos que protegen a los organismos de la RUV determina sustancialmente su sensibilidad a la exposición a la radiación

ultravioleta. Pero la mejoría del daño inducido por la UV mediante mecanismos protectores significa que la sensibilidad de una especie particular no refleja simplemente la dosis de RUV, sino también depende de la tasa de dosis y su ambiente luminoso pasado. La sensibilidad a la RUV puede ser descrita por una función biológica ponderada (BWF, por sus siglas en inglés: Biological Weighting Function), en la que se pondera el efecto que tiene cada longitud de onda en los procesos biológicos.

Los organismos fotosintéticos necesitan absorber PAR y por ello también están expuestos a RUV debido a esto los mecanismos fotoprotectores deben ser de longitudes de onda específicas para proteger contra la RUV mientras permite la transmisión de PAR (Banaszak 2003). Una de las soluciones evolucionarias es la adaptación bioquímica, una respuesta de protección es la adquisición de compuestos que absorben RUV: flavonoides en angiospermas y micosporinas parecidas a aminoácidos (MAAs, por sus siglas en inglés: Mycosporine-like Amino Acids:) en organismos acuáticos como bacterias y algas marinas. La familia química de las micosporinas que son metabolitos que absorben RUV asociados con la esporulación inducida por la luz en hongos terrestres, es en donde se clasifican las MAAs (Favre-Bonvin *et al.* 1987).

Micosporinas parecidas a aminoácidos (MAAs)

Las MAAs de organismos marinos, son iminas derivadas de micosporinas (enamino-iminas) que contienen sistemas de anillos amino-ciclohexanimina, con absorción máxima en el UV entre los 309 y 360 nm (Bandaranayake 1998, Banaszak 2003) y son transparentes en la región de la luz visible (PAR). En combinación, estos compuestos proveen una banda filtro que intercepta la RUV ambiental potencialmente dañina sin disminuir la fotosíntesis algal. La glicina es el aminoácido más común en las MAAs (Bandaranayake 1998). La sustitución con diferentes grupos funcionales en el C-3 de la micosporina-glicina determina la absorción máxima específica de cada MAA (Bentley 1990). Las MAAs son sustancias hidrofílicas, ópticamente activas y altamente inestables que una vez extraídas del citoplasma, experimentan deshidratación y aromatización, así como hidrólisis (Dunlap y Chalker 1986, Dunlap *et al.* 1986, Bandaranayake 1998).

Se han identificado 19 MAAs en organismos que van desde fitoplancton hasta vertebrados (Dunlap y Shick 1998, Banaszak y Trench 2001), 13 de los cuales se han encontrado en corales (Shick y Dunlap 2002). En corales el descubrimiento de las MAAs fue hecho por Shibata (1969) quien las denominó “S-320”.

Ademas de su papel de filtro o fotoprotector contra RUV (Dunlap y Chalker 1986, Dunlap *et al.* 1986, Banaszak y Trench 1995b, Kuffner *et al.* 1995, Shick *et al.* 1995, Jokiel *et al.* 1997, Banaszak *et al.* 1998, Bandaranayake 1998, Dunlap y Shick 1998, Neale *et al.* 1998, Shick *et al.* 1999) se ha detectado en algunos MAAs una función de defensa activa contra los efectos foto-oxidativos de la radiación solar en organismos marinos (Dunlap y Yamamoto 1995, Dunlap *et al.* 1999, Conde *et al.* 2000, Suh *et al.* 2003, Shick 2004). Sin embargo, se considera que la presencia de MAAs no siempre es suficiente para la protección completa contra RUV.

Además de la RUV, la presencia de MAAs puede ser modificada por otros factores como son el flujo de agua (Jokiel *et al.* 1997, Kuffner 2001b), alto PAR (Scelfo 1985, Neale *et al.* 1998), y temperatura (Lesser *et al.* 1990). Asimismo se han observado variaciones estacionales de las MAAs tanto en los corales como en su mucus (Kinzie 1993, Drollet *et al.* 1997, Michalek-Wagner 2001) y ligada al sexo (Michalek-Wagner 2001). En otros corales escleractinios se han reportado fluctuaciones diarias de las MAAs correlacionadas con el ciclo diurno de la radiación solar tanto en invierno como en verano (Yakovleva e Hidaka 2004).

Origen de las MAAs

La biogénesis de micosporinas y MAAs no esta probada, pero la unidad básica, una β -dicetona se origina de los primeros pasos de la Vía Acida Shikimato, un proceso de biosíntesis presente sólo en algas, hongos y bacterias y ausente en metazoos (Bentley 1990, Bandaranayake 1998). Shick *et al.* (1999) y Shick (2004) comprobaron que el glifosato, un inhibidor de la vía shikimato, ocasionaba la reducción o detenía por completo la acumulación de MAAs. Debido a que no se conoce una vía biosintética similar en animales (Bentley 1990), las MAAs son obtenidas de otras fuentes como es la

dieta (Banaszak y Trench 1995b, Carroll y Shick 1996, Mason *et al.* 1998, Carefoot *et al.* 2000, Newman *et al.* 2000).

En organismos simbioses se sugirió que las algas simbioses sintetizaban MAAs y proveían a sus hospederos (Dunlap y Chalker 1986). Se ha observado que los dinoflagelados simbioses pueden o no sintetizar MAAs en respuesta a la RUV dependiendo de la especie. Banaszak y Trench (1995b) encontraron que en *Cassiopeia xamachana* el simbiote sintetiza y transfiere MAAs al tejido del animal. La escifistoma aposimbiótica es incapaz de sintetizar MAAs en respuesta a la exposición a RUV, y su simbiote *Symbiodinium microadriaticum* sintetiza y libera MAAs en cultivo. Sin embargo, no ocurre lo mismo con *Anthopleura elegantissima* en la que el simbiote *S. californium* tanto recién aislado como en cultivo y en el medio de cultivo no encontraron MAAs. Lo que sugiere que la anémona, probablemente los obtiene de una fuente exógena, tal vez su dieta (Banaszak y Trench 1995b).

Existe una variación en la síntesis y presencia de MAAs en el tejido del hospedero y en el simbiote. Banaszak y Trench (1995b) encontraron seis MAAs en tejidos de *A. elegantissima*, pero su alga simbiote en cultivo no producía ninguna, mientras que en *C. xamachana* y su simbiote *S. microadriaticum* en cultivo se encontraron los mismos tres tipos de MAAs. Shick *et al.* (1999) y Shick (2004) en especímenes del coral *Stylophora pistillata* sin alimentar y expuestos a diferentes condiciones espectrales detectaron la acumulación de 10 MAAs. Sin embargo, Banaszak *et al.* (2000) al analizar las MAAs producidas en cultivos por los simbioses de *S. pistillata* encontraron solo una (shinorina), mientras que Shick (2004) reporta cuatro MAAs. Es probable que al encontrarse dentro de su hospedero el simbiote pueda producir las otras MAAs o bien producir precursores que puedan ser transferidos al hospedero y ahí sean transformados.

Diversidad filotípica de los simbioses

Otro componente que debe ser tomado en consideración al analizar las diferentes respuestas de los dinoflagelados simbioses a factores como irradiancia, temperatura y presencia o no de MAAs es la diversidad de los dinoflagelados simbioses. Schoenberg y Trench (1980) hicieron el primer cambio al concepto de una sola especie pandémica,

al cultivar los dinoflagelados simbioses satisfaciendo los postulados de Koch (Trench 1997). En términos generales la aplicación de métodos moleculares para la resolución de diferencias específicas en dinoflagelados simbioses ha confirmado las conclusiones obtenidas a través del uso de métodos clásicos (Trench 1997).

El análisis de ADN de los genes que codifican a la subunidad pequeña del ARN ribosomal, indica que el grado de divergencia dentro del género *Symbiodinium* es similar al encontrado en dinoflagelados de vida libre pertenecientes a diferentes ordenes (Rowan y Powers 1991, LaJeunesse *et al.* 2003). Actualmente se ha propuesto la existencia de diferentes clades dentro de este género. A la clade también se le denomina filotipo o tipo filogenético. La clade es un taxa definido en base al análisis de polimorfismos de longitud en fragmentos de restricción (RFLP) de la subunidad pequeña ribosomal (ssRNA) (Rowan y Powers 1991). A las clades en *Symbiodinium* se les denomina A, B, C, D, etc. e incluso existen subdivisiones de las mismas por medio del análisis de las regiones ITS (LaJeunesse 2001).

Relación entre el filotipo del simbiote y MAAs

Banaszak *et al.* (2000) probaron que existe una relación entre los filotipos determinados tanto por RFLP como por el análisis de secuencias parciales del gen de la subunidad pequeña ribosomal y la síntesis de MAAs por dinoflagelados simbioses en cultivo bajo condiciones de RUV (UV-B/A) y PAR. De las 24 especies de *Symbiodinium* que analizaron, encontraron que las trece especies de *Symbiodinium* pertenecientes al filotipo A, sintetizaban de uno a tres MAAs, mientras que ninguna de las 11 especies de *Symbiodinium* de los filotipos B y C los sintetizaban. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si los mismos patrones de síntesis de MAAs que presentan los dinoflagelados simbioses en cultivo los muestran dentro del hospedero en el ambiente natural.

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de diferentes condiciones espectrales (RUV (UV-B/A) y PAR) en la eficiencia fotoquímica o de separación de carga del FSII de *Diploria strigosa* y *Porites astreoides* además en este trabajo se propone la hipótesis de que dentro del tejido coralino existe una relación entre los filotipos de dinoflagelados simbioses y la presencia de micosporinas parecidas a los

aminoácidos (MAAs) bajo la influencia de RUV (UV-B/A) y PAR. Para ello se utilizaron corales que presentan diferentes clades (A y B o C) de dinoflagelados de manera que se pueda establecer una relación entre el espectro de absorción de MAAs en el coral y la presencia de determinado filotipo, con el fin de determinar como influenciaban las diferentes condiciones espectrales se analizó como variaba la absorción de las MAAs en los corales y sus simbioses aislados en tres tiempos.

Los organismos que se utilizaron para este estudio son *Porites astreoides* (clade A, LaJeunesse 2002) y *Diploria strigosa* (clade B o C, Baker y Rowan 1997, LaJeunesse 2002). Para seleccionar estas especies de corales se hicieron las siguientes consideraciones: a) las colonias se encuentran casi a la misma profundidad, por lo que la irradiancia que reciben es similar, b) es factible encontrar colonias de superficie casi plana, lo que permite asegurar que este sometida a la misma irradiancia y disminuye la probabilidad de variación intracoloniales en el contenido de MAAs (A. T. Banaszak com. Pers., Muszynski *et al.* 1998) c) se conoce que clade de simbiote puede tener, d) la mayoría de los organismos que se sabe pertenecen a los filotipos b o c, no son corales y e) se pueden obtener fácilmente debido a que habitan en la laguna arrecifal de Puerto Morelos y se les puede encontrar en las inmediaciones de la Unidad Académica Puerto Morelos.

Objetivo general

Investigar el efecto de la radiación ultravioleta (UV-A y UV-B) en la eficiencia fotoquímica y la presencia de MAAs en dos corales con simbiote de clade diferente.

Objetivos particulares

- Comparar los cambios a largo plazo de la eficiencia fotoquímica de los simbioses de *Porites astreoides* (filotipo A) y *Diploria strigosa* (filotipo B ó C) bajo diferentes condiciones espectrales en luz natural (PAR, PAR+UV-A, PAR+UVA+UV-B).

- Comparar los cambios en la concentración de clorofila, densidad de simbiontes e índice mitótico para cada condición espectral en el tiempo.
- Verificar la presencia de MAAs en dinoflagelados de diferente filotipo y determinar si hay cambios en los espectros de absorción de las MAAs del simbionte y del tejido coralino bajo diferentes condiciones espectrales en el tiempo

METODOLOGÍA

Obtención de colonias de corales

Para el desarrollo de este estudio 4 colonias de *Diploria strigosa* y 4 de *Porites astreoides* fueron colectadas con cincel y martillo a 5 m de profundidad en la zona de la bocana de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo, México. Los especímenes, de superficie plana, fueron seleccionados de la misma zona para asegurar que hubieran estado expuestos a una irradiancia similar. Las colonias se mantuvieron en un tanque de 0.6 x 2.0 x 0.7 m con flujo de agua permanente y cubierto con una malla de densidad neutra que cortó el 86.6% de luz durante doce días para su aclimatación. Las colonias fueron cortadas en fragmentos de 15 cm² en promedio, al octavo y noveno día, obteniendo un total de 48 porciones. Los fragmentos de coral se colocaron sobre placas de acrílico de 5 x 5 cm, fijándolos con plastilina negra para que conservaran la misma posición durante el experimento y asegurar que la incidencia luminosa fuera uniforme. Los efectos del manejo y manipulación de los fragmentos de coral fueron mitigados manteniéndolos tres días en recuperación bajo las condiciones antes señaladas.

Exposición de fragmentos de coral

Los fragmentos de coral con sus placas de acrílico se colocaron bajo tres diferentes tratamientos espectrales. Dos fragmentos de cada especie de coral fueron distribuidos aleatoriamente en 9 acuarios, 3 para cada tratamiento. Los acuarios de 30 x 30 x 10 cm fueron fabricados con acrílico Plexiglas® opaco a la RUV de 6 mm de grosor. Los acuarios tuvieron flujo permanente con un recambio constante del agua de mar. Las condiciones espectrales en los acuarios fueron producidas con las cubiertas (tapas) que actuaban como filtros.

Los tratamientos espectrales a los que se expusieron los corales fueron: 1) PAR evitando el paso de longitudes de onda menores a 400 nm con una hoja de acrílico Plexiglas® opaco al UV; 2) PAR+UVA permitiendo el paso de todas las longitudes de onda con una hoja de acrílico transparente a la RUV y una hoja de poliéster Mylar® para cortar las longitudes de onda menores a 320 nm. Puesto que el Mylar® es

fotodegradable, se realizaron espectros de transmitancia cada tercer día y de ser necesario el Mylar® fue reemplazado y 3) PAR+UVA+UVB, permitiendo el paso de todas las longitudes de onda con una hoja de acrílico Plexiglas® de 6 mm de grosor.

Se colocaron tres acuarios cada uno con diferente condición espectral dentro de 3 estanques fabricados con fibra de vidrio de 0.7 x 2.0 x 0.6 m, situados en el área de estanquería abierta de la Unidad Académica Puerto Morelos. Los acuarios fueron acomodados evitando el efecto de borde. Para minimizar el efecto de auto-sombreo los estanques fueron instalados con su eje más largo orientado en dirección este-oeste. Con el fin de evitar cambios en la composición espectral de la luz los estanques fueron pintados de color negro mate. Los estanques tuvieron circulación permanente de agua de mar proveniente de la laguna arrecifal y filtrada a través de un cartucho con fibras de polietileno (delcron). Los filtros fueron reemplazados cada tercer día. Cada unidad muestral estuvo constituida por un estanque con un total de 12 fragmentos de coral.

Para asegurar que la irradiancia recibida por los corales fuera similar a la de su entorno natural se redujo la luz uniformemente cubriendo los estanques con una malla de densidad neutra que aunada al efecto del agua y de los filtros permitió una transmitancia de 11.05 a 14.31% de la irradiancia ambiental. El periodo de exposición fue de 30 días.

Irradiancia

Durante el experimento se registró la irradiancia en superficie en $W m^{-2}$ cada hora, con un sensor tipo piranómetro, corregido por coseno LI-200 SZ (Li-Cor, Lincoln, Nebraska) con respuesta espectral en el intervalo de 400 a 1100 nm, situado en la estación meteorológica de la Unidad Académica Puerto Morelos. Con el objetivo de comparar los datos obtenidos con los publicados en la literatura se transformaron de unidades energéticas ($W m^{-2}$) a unidades cuánticas ($\mu mol \text{ cuanta } m^{-2} s^{-1}$). El factor de conversión se obtuvo realizando mediciones simultáneas con el piranómetro y con un sensor cuántico corregido por coseno LI-210SA (Li-Cor, Lincoln, Nebraska) con respuesta espectral de 400 a 700 nm (en unidades $\mu mol \text{ cuanta } m^{-2} s^{-1}$) y acoplado a un registrador LI-1400 (Li-Cor, Lincoln, Nebraska). Con los datos obtenidos se llevó a cabo un análisis de regresión lineal. Los valores de irradiancia registrados durante el

experimento se transformaron con el factor antes mencionado y se añadió el porcentaje de transmitancia de la malla de densidad neutra, el filtro y la atenuación por el agua. De esta forma se calculó la irradiancia en $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que llegó a los corales dentro del acuario en cada tratamiento durante el experimento.

Monitoreo de la eficiencia fotoquímica

Antes y durante el experimento se tomaron mediciones de fluorescencia usando un fluorómetro sumergible Diving-PAM (Walz, Alemania).

Los parámetros registrados en el Diving-PAM fueron la fluorescencia basal (F_0), la fluorescencia máxima (F_m) y la cosecha cuántica máxima del fotosistema II, todos en oscuridad y la fluorescencia basal (F o F_t), la fluorescencia máxima (F_m') y la cosecha cuántica efectiva del fotosistema II, todos en presencia de luz actínica.

A partir de estos datos se calculó la presión sobre el fotosistema II (Q) (Iglesias-Prieto *et al.* 2004). La presión sobre el fotosistema II es un descriptor del grado de reducción de la fracción de FSII activos; sus valores van de 0 (máxima eficiencia de los FSII) a 1 (el 100% de los FSII están cerrados) y esta dado por la ecuación

$$Q = 1 - \left[\frac{(\Delta F \div F_m')}{(F_v \div F_m)} \right] \quad (\text{Iglesias-Prieto, et al. 2004}) \quad (2)$$

Los parámetros bajo los cuales se operó el Diving PAM durante el experimento fueron los siguientes: Intensidad de luz de medición (measuring intensity) $MI = 8$; intensidad del pulso de saturación (saturation pulse intensity) $SI = 11$; ancho del pulso de saturación (saturation pulse width) $SW = 0.8$; ganancia (gain setting) $G = 2$; amortiguación (damping) $D = 1$.

La condición de las algas simbiotes fue monitoreada 5 veces al día durante el experimento (a las 06:00, 10:00, 14:00, 18:00 y 22:00 hrs). Se evitó hacer sombra antes de las mediciones. La fibra óptica del Diving PAM era colocada dentro de un sujetador (holder) que mantenía a la fibra en ángulo recto en relación a la superficie del coral y a 3 mm de distancia de la misma. El sujetador se posicionaba en el mismo sitio sobre el coral utilizando marcas en la placa de acrílico, asegurando que las mediciones fueran realizadas en el mismo lugar del coral.

Monitoreo de densidad algal, clorofilas y MAAs

Se tomaron muestras de los fragmentos de coral al inicio, 15 y 30 días (T0, T1 y T2) para evaluar la densidad algal, el índice mitótico, la concentración de clorofilas *a* y *c2*, así como el contenido de proteínas disueltas en Metanol y MAAs. Las muestras se enjuagaron abundantemente con agua de mar filtrada y agua desionizada con el fin de evitar contaminación por los microorganismos que viven en el mucus (epibiontes) y se procedió a congelarlas a -70 °C hasta su procesamiento.

Separación de tejido de coral y algas simbiotes

El tejido del coral fue separado del esqueleto con buffer TE (10mM Tris, pH 8.6, 1mM Na₂EDTA) a presión usando un airbrush (Paasche Millennium, EUA). La suspensión resultante fue homogenizada con una licuadora de mano (handblender) (Braun, México). Se tomó una alícuota de 1 ml para conteo de algas simbiotes y el resto se centrifugó 5 min a 1050 x g en una centrifuga clínica Centra CL2 (IEC, EUA). Se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en buffer TE + Triton X-100 al 0.01%. La pastilla se homogenizó en un vortex y se volvió a centrifugar. La pastilla se lavó por resuspensión con buffer TE y centrifugación utilizando el procedimiento anterior tres veces pero usando un Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., EUA) para homogenizar la muestra con el fin de remover las membranas contaminantes del hospedero. La ausencia de peridina en la suspensión indicó que no había lisis de algas simbiotes, lo que se confirmaba examinando en Microscopio 1000x. La pastilla ó pellet algal de cada muestra fue dividido en 4 alícuotas iguales: una destinada para el análisis de MAAs, otra para la cuantificación de clorofilas y dos de respaldo. Cada alícuota fue conservada de acuerdo con su propósito: las alícuotas para conteo fueron preservadas con una gota de solución de Lugol. Para MAAs/proteínas y clorofilas se congelaron a -70 °C hasta su procesamiento.

El área de cada muestra fue medida cubriendo el esqueleto con una película de polietileno y remarcando el contorno del tejido del coral en ella. Los contornos fueron escaneados y procesados con el programa ScanPro4 para calcular el área. Cada contorno

fue medido tres veces. El área de cada coral se usó para normalizar la densidad algal, la concentración de pigmentos fotosintéticos y la absorbancia.

Eficiencias de extracción de las MAAs

Para determinar las eficiencias de extracción de las MAAs, se hicieron pruebas con dos colonias de coral, una de *Porites astreoides* y otra de *Diploria strigosa* colectadas a 50 cm de profundidad. Los corales se cortaron en 6 fragmentos cada una, tres fragmentos se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y tres se procesaron en fresco. Se separó el tejido del esqueleto con un aparato Waterpik (EUA) que expulsa líquido a presión probando tres soluciones amortiguadoras diferentes (agua de mar filtrada, agua desionizada y buffer TE).

La suspensión resultante se trató con un homogeneizador Tissue Tearor (Biospec Products, Inc., EUA) para disgregar el tejido del hospedero y dejar libres los simbiontes. Las suspensiones se centrifugaron en una centrífuga clínica Centra CL2, (IEC, EUA) a $2000 \times g$ durante 5 min. Se separó la pastilla (simbionte) del sobrenadante (tejido del hospedero), este se congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. La pastilla se resuspendió en el mismo buffer utilizado para separarlo del esqueleto y Triton X-100 al 0.01% (w/v) se agitó y centrifugó 2.5 min a $1050 \times g$. Se repitió el procedimiento sin el detergente para enjuagar otras dos veces y se congeló a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su liofilización. La ausencia de peridina en la suspensión del primer sobrenadante indicó que no había lisis de algas simbiontes. Se confirmó la ausencia de restos del tejido hospedero examinando en Microscopio a 1000x. El sobrenadante congelado fue liofilizado y se utilizó para las pruebas de eficiencia de extracción.

El tejido de coral se liofilizó en una liofilizadora (Labconco, EUA). Para preparar los extractos, a 0.1 g de las muestras separadas con agua de mar y a 0.01 g de las separadas con buffer TE y agua desionizada se les agregó 1.5 ml del solvente a probar (Metanol 100%, Metanol:agua 80:20 ó Metanol:Tetrahidrofurano 80:20). Las muestras se agitaron en un vortex y se incubaron en oscuridad para la extracción durante 1 hr a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 hrs a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y 24 hrs a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para cada combinación se hicieron dos replicas.

Al término de la extracción, se agitaron y centrifugaron 5 min a 2000 x g. La pastilla fue sometida al mismo procedimiento dos veces más y en cada una se apartó el sobrenadante manteniéndolo en refrigeración.

Para la detección de las MAAs se realizaron los espectros de absorción de los extractos en el intervalo de longitudes de onda de 280 a 400 nm con un Espectrofotómetro UV-Vis DW-2C SLM-Aminco de doble haz (Aminco, EUA) controlado por un sistema colector de datos OLIS (Olis, EUA). Utilizando una cubeta de cuarzo de 1 ml de volumen y un paso óptico de 1 cm, usando un colimador y con los siguientes parámetros: abertura (slit) 10 nm y filtro UV.

Para calcular las eficiencias de extracción se utilizaron los algoritmos publicados por de Chalker y Dunlap (1981). Para cada extracción la absorbancia (A) a cualquier longitud de onda esta dada por:

$$A = e (a N + b) \quad (3)$$

Donde

N = número de extracciones, a y b son constantes que se determinan de la relación logarítmica,

$$\ln A = a N + b, \quad (4)$$

Donde a es la pendiente de la línea (con valor negativo), y b es el valor de la ordenada al origen (intersección de y).

La eficiencia de extracción expresada como el coeficiente de absorción (E) para un par específico de pigmento-solvente es, por tanto, definido como la fracción del pigmento que es removida durante cada extracción bajo un conjunto dado de condiciones experimentales. De tal manera que

$$E_t = 1 - e^{-a} \quad (5)$$

Para realizar los cálculos para cada muestra, se seleccionó en el espectro de absorción la longitud de onda donde se producía el pico de absorbancia y se substituyó el valor de esta absorbancia en la ecuación 5.

El valor del coeficiente de extracción para cada combinación se obtuvo del promedio de las dos replicas.

Análisis de los espectros de absorción

Las algas simbiontes congeladas y fragmentos de coral fueron extraídos durante 24 hrs con 1 ml de Metanol:agua (80:20, v:v) a temperatura ambiente. Después de centrifugar 5 min a 1396 x g en una microcentrífuga Costar 10MVSS, (Corning Costar Co., EUA), se detectó la presencia de MAAs en el sobrenadante realizando un espectro de absorción en el intervalo de 250 a 400 nm, con el mismo espectrofotómetro. Los espectros fueron normalizados considerando: la dilución que se utilizó, el área de tejido que se extrajo y restando la absorción mínima a todo el espectro.

Clorofilas

El análisis de clorofilas *a* y *c2* se realizó de acuerdo con la técnica de Jeffrey y Humphrey (1975), modificado por Iglesias Prieto *et al.* (1992) utilizando una mezcla de Acetona : Dimetilsulfóxido (95:5, v:v). Los extractos de clorofila se analizaron en el Espectrofotómetro Elíptica registrando los picos de absorbancia en las longitudes de onda de 630 y 663 nm, utilizando una cubeta de vidrio de 3 ml, con un paso óptico de 1 cm, y como blanco se uso acetona. Las concentraciones de pigmentos fotosintéticos se obtuvieron utilizando las fórmulas definidas por Jeffrey y Humphrey (1975):

$$\text{Chl } a = (11.43 * \text{Abs}_{663}) - (0.64 * \text{Abs}_{630}) \quad (6)$$

$$\text{Chl } c2 = (27.09 * \text{Abs}_{630}) - (3.63 * \text{Abs}_{663}) \quad (7)$$

Para obtener la densidad de las clorofilas se normalizó con el área de superficie de coral (μg clorofila cm^{-2}). Para calcular la concentración celular de clorofilas la densidad de clorofilas se dividió entre la densidad de simbiontes.

Densidad algal

Las muestras conservadas con solución de Lugol fueron homogenizadas con el Tissue Tearor durante 10 seg. Posteriormente las muestras se agitaron con vortex durante 3 minutos y se tomaron de tres a cinco alícuotas para llevar a cabo el conteo de las algas

simbiontes usando un hemocitómetro tipo Neubauer a 400x de aumento. Antes de tomar la alícuota con una pipeta pasteur, la muestra era burbujeada con aire tres veces con el fin de evitar la sedimentación de las algas simbiontes. Se calculó el número de organismos por cm² de superficie de coral. Se midió el diámetro de 10 algas en cada conteo y se contabilizó el número de células que estaban dividiéndose para calcular el índice mitótico (MI = número de células en división / número de células contadas, expresado en %).

Análisis de datos

En los análisis estadísticos los datos obtenidos de las dos especies fueron comparados con el fin de determinar si había diferencias significativas aplicando pruebas de análisis de varianza, y para ver donde eran las diferencias, se utilizaron pruebas *t*. En el caso de que los datos no cumplieran los requisitos para la aplicación de pruebas paramétricas, se utilizaron pruebas no paramétricas. Se buscaron diferencias entre especies y dentro de cada especie, así como las diferencias entre los tratamientos. Se consideró una $\alpha=0.05$ para todos los análisis.

RESULTADOS

Las colonias planas fueron colectadas en la misma área, cercanas entre sí, con el fin de asegurar la misma incidencia de luz. Se mantuvieron en aclimatación durante 12 días. Se obtuvieron 5 colonias de *D. strigosa* de las cuales 4 se mantuvieron en buena condición ($F_v/F_m=0.672\pm 0.002$). De igual manera se obtuvieron 5 colonias de *Porites astreoides* todas con buena condición ($F_v/F_m=0.685\pm 0.003$). Algunos fragmentos de ambas especies mostraron valores bajos (F_v/F_m de 0.483 hasta 0.531) por lo que no se usaron para el experimento.

Durante el experimento de exposición por 30 días la temperatura registrada en la estación meteorológica de la UAPM-ICMyL en promedio fue 27 °C con un máximo de 29 °C (día 6) y un mínimo de 24 °C (días 3 y 6). Mediciones anteriores mostraron que el cambio en la temperatura del acuario con respecto al tanque podía ser hasta de ± 1 °C. El flujo se mantuvo constante, excepto durante dos horas el día 2 por la mañana, cuando fue necesario limpiar la bomba. A lo largo del experimento ningún fragmento de las especies mostró señales de deterioro del tejido, ni blanqueamiento. Por el contrario, por la noche los pólipos de las colonias mostraban actividad tentacular.

A los 15 días por la noche se cortaron los fragmentos de corales para obtener muestras para análisis de clorofila y MAAs. La misma noche se hizo limpieza de los acuarios debido al crecimiento de algas sobre el acrílico. Aunque el crecimiento de las algas fue de baja intensidad, se realizó la limpieza para evitar problemas con el flujo de agua y con el sobrecrecimiento en los fragmentos.

Irradiancia

Durante el experimento de exposición de fragmentos de coral el valor más alto de irradiancia registrado en la superficie fue 2078.96 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el día 21 y la menor irradiancia máxima fue 220.52 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ el día 11 (Fig. 2, Tabla 1). La mayor irradiancia total diaria (irradiancia integrada) se registró el día 3 y fue 53.47 $\text{mol cuanta m}^{-2} \text{d}^{-1}$ mientras que la menor fue 5.24 $\text{mol cuanta m}^{-2} \text{d}^{-1}$ el día 11, esto es 10 veces el valor de menor irradiancia total diaria (Tablas 1a y b). Con base en las mediciones de irradiancia se pueden identificar tres periodos con dos tipos de

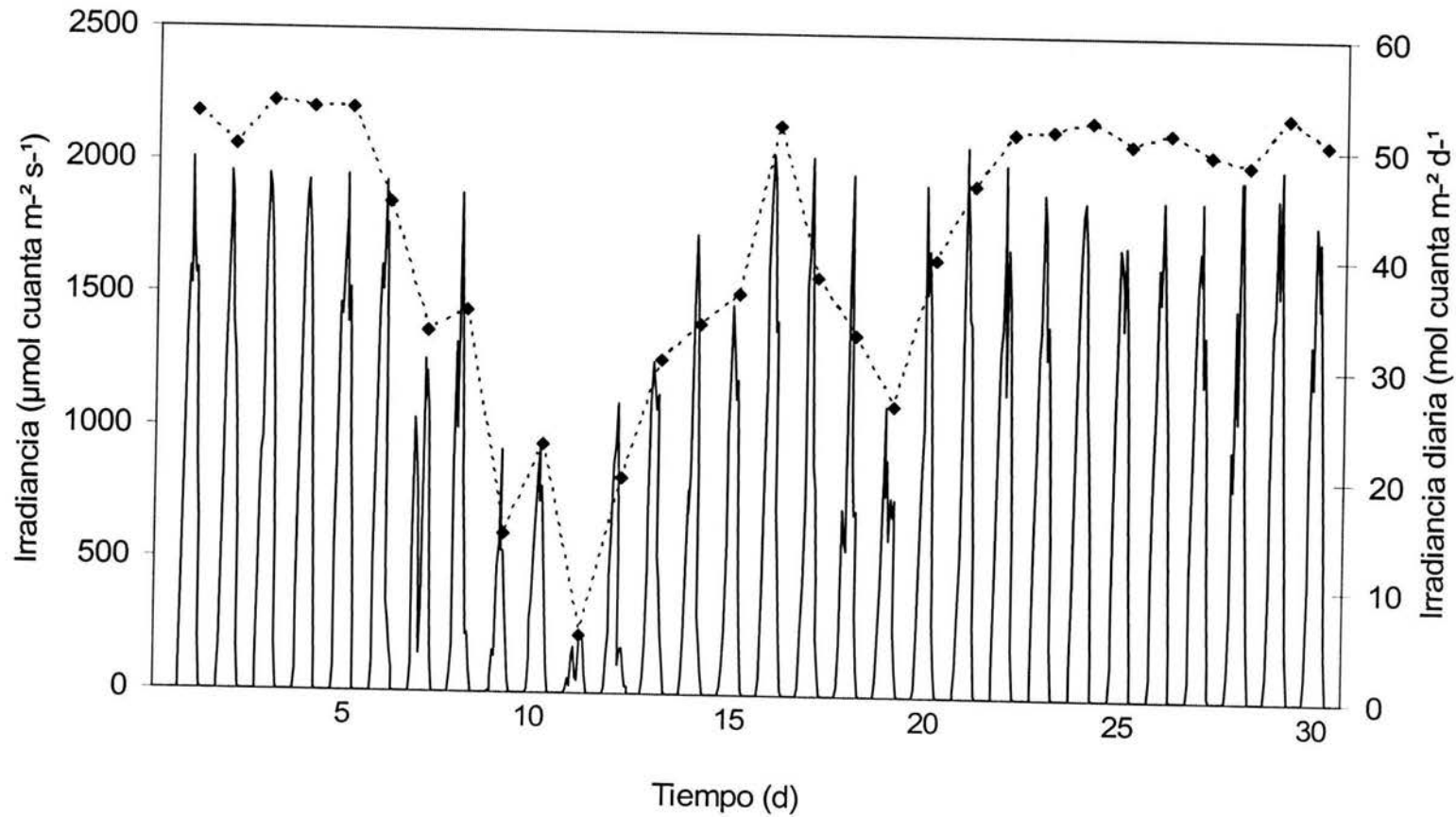


Fig. 2. Irradiancia diaria registrada durante el experimento. Se presenta el registro de cada hora ($\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, línea continua) y la irradiación total diaria ($\text{mol cuanta m}^{-2} \text{d}^{-1}$, línea punteada). Los registros se hicieron cada hora (en W m^{-2}) con un sensor tipo piranómetro LI-200 SZ colocado arriba de la caseta del muelle de la UNAM y fueron transformados a unidades cuánticas.

		Irradiancia total diaria (μmol cuanta m ⁻² d ⁻¹)			
		Irradiancia			
		solar	PAR	UVA	UVB
días 1-6	prom	50.93	7.29	7.07	5.63
	max	53.47	7.65	7.43	5.91
n=6	min	44.46	6.36	6.18	4.91
	subtotal	305.56	43.73	42.44	33.76
días 7-19	prom	29.11	4.17	4.04	3.22
	max	51.61	7.38	7.17	5.70
n=13	min	5.24	0.75	0.73	0.58
	subtotal	378.45	54.16	52.57	41.82
días 20-30	prom	49.46	7.08	6.87	5.47
	max	52.93	7.57	7.35	5.85
n=11	min	26.39	3.78	3.67	2.92
	subtotal	544.09	77.86	75.57	60.12
dosis diaria	PROM	40.94	5.86	5.69	4.52
	max	53.47	7.65	7.43	5.91
n=30	min	5.24	0.75	0.73	0.58
irradiación acumulada total		1228.10	175.74	170.58	135.71

		Irradiancia máxima (μmol cuanta m ⁻² s ⁻¹)			
		Irradiancia			
		solar	PAR	UVA	UVB
días 1-6	prom	1954.15	279.64	271.43	215.93
	max	2010.01	287.63	279.19	222.11
n=6	min	1929.84	276.16	268.05	213.25
días 7-19	prom	1380.44	197.54	191.74	152.54
	max	2042.86	292.33	283.75	225.74
n=13	min	220.52	31.56	30.63	24.37
días 20-30	prom	1916.12	274.20	266.15	211.73
	max	2078.96	297.50	288.77	229.73
n=11	min	1097.95	157.11	152.50	121.32
dosis diaria	PROM	1691.60	242.07	234.96	186.92
	max	2078.96	297.50	288.77	229.73
n=30	min	220.52	31.56	30.63	24.37

		Dosis (MJ m ⁻²)			
		superficie			
		superficie	PAR	UVA	UVB
días 1-6	prom	24.96	3.57	3.47	2.76
	max	26.21	3.75	3.64	2.90
n=6	min	21.79	3.12	3.03	2.41
	subtotal	149.79	21.43	20.81	16.55
días 7-19	prom	14.27	2.04	1.98	1.58
	max	25.30	3.62	3.51	2.80
n=13	min	2.57	0.37	0.36	0.28
	subtotal	185.51	26.55	25.77	20.50
días 20-30	prom	24.25	3.47	3.37	2.68
	max	25.95	3.71	3.60	2.87
n=11	min	12.94	1.85	1.80	1.43
	subtotal	266.71	38.17	37.05	29.47
dosis total (MJ m ⁻²)		602.01	86.15	83.62	66.52

Tabla 1. Irradiancia registrada durante el experimento. Irradiancia solar se refiere a la registrada en la superficie con el piranómetro y transformada a unidades cuánticas. a) irradiación máxima diaria, b) irradiación total diaria y c) Dosis. Se presentan para los distintos tratamientos los datos ajustados considerando la transmitancia de la cubierta del acuario, la atenuación por el filtro neutro y el agua en el acuario se presentan bajo los encabezados de PAR, UVA y UVB. La dosis fue calculada a partir de los datos de irradiación.

condiciones lumínicas dependientes de la irradiancia máxima registrada y la dosis. Para efectos prácticos hubo dos periodos de irradiancias mayores se les denominó de “soleado” con irradiancia promedio diaria de 50.93 mol cuanta $m^{-2} d^{-1}$ y 49.46 mol cuanta $m^{-2} d^{-1}$ y exposición promedio de 24.96 MJ m^{-2} y 24.25 MJ m^{-2} , mientras que para el periodo con nubosidad, donde la dosis es cambiante y menor que los anteriores, se le denominó “variable” la irradiancia máxima registrada en el día vario de 220.52 hasta 2042.86 μmol cuanta $m^{-2} s^{-1}$, la irradiancia diaria promedio fue 29.11 y la exposición promedio de 14.27 MJ m^{-2} . En la figura 2 se aprecian que los primeros seis días (primer periodo soleado) presentaron alta irradiancia y exposición similar (Tabla 1); el segundo periodo fue de irradiancia y exposición variable, abarcando de los días 7 al 19, encontrándose el valor más bajo de irradiancia máxima e irradiancia total diaria el día 11, con 27.57 μmol cuanta $m^{-2} s^{-1}$ y 0.723 mol cuanta $m^{-2} d^{-1}$ respectivamente. Por último se presentó un periodo de 10 días (del 20 al 30) con valores altos de irradiancia máxima e irradiancia total diaria.

Al calcular la irradiancia y la exposición dentro de los acuarios se consideró la atenuación por el filtro neutro, el agua en acuario y la transmitancia de la cubierta del acuario. Tanto la irradiancia como la exposición dentro de los acuarios vario para cada tratamiento debido a que los filtros cortaban una parte del PAR (Tablas 1a, b y c). Los factores de ajuste fueron PAR=0.1431, UVA=0.1389 y UVB=0.1105.

La dosis total fuera de los acuarios fue 602.1 MJ m^{-2} . La exposición diaria máxima durante el experimento fue 26.21 KJ m^{-2} y la mínima 2.57 KJ m^{-2} (Tabla 1c). Dentro de los acuarios la dosis total fue PAR=86.15 MJ m^{-2} , UVA=83.62 MJ m^{-2} y UVB=66.52 MJ m^{-2} . La dosis que recibió el tratamiento de UVA fue 2.96% menor que la de PAR y 20.45% mayor que la de UVB. Los corales expuestos a UVB recibieron una dosis 22.78% menor que los de PAR.

Fluorescencia

Usando todos los valores de las cosechas cuánticas registradas durante el experimento e ignorando los efectos tanto de la hora de registro como el tratamiento se encontró que *P. astreoides* presentó un valor significativamente más alto de la eficiencia fotoquímica que

	<i>P. astreoides</i>	<i>D. strigosa</i>
Cosecha cuántica global	0.656 ± 0.047	0.629 ± 0.043
Fluorescencia máxima	1035.5 ± 319.4	1133.2 ± 279.7
Fluorescencia basal	347.6 ± 104	415.4 ± 102

Tabla 2. Parámetros de la fluorescencia de *P. astreoides* y *D. strigosa*. Valores globales de las cosechas cuánticas, fluorescencias máxima y basal para las dos especies. Media y desviaciones estándar de todos los datos obtenidos durante el experimento de exposición sin considerar las diferentes condiciones espectrales, ni la hora de registro.

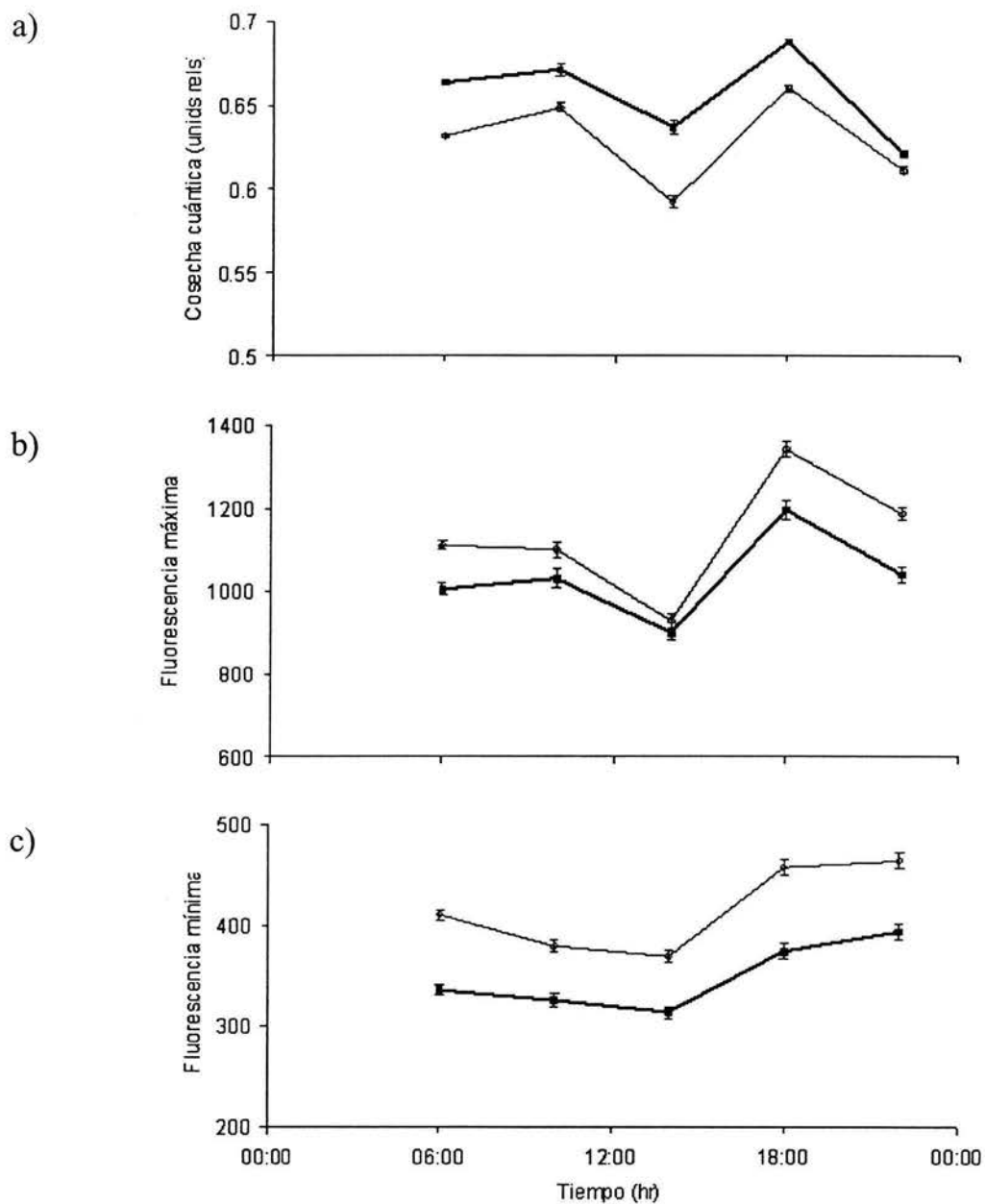


Fig. 3. Cambios en los parámetros de la fluorescencia de la clorofila *a* durante el ciclo diurno. Tanto de los dinoflagelados simbiotes de *P. astreoides* (cuadrado, línea gruesa) como de *D. strigosa* (círculo, línea delgada). a) Cosecha cuántica de la separación de carga del FSII. b) Fluorescencia máxima. c) Fluorescencia mínima. Media y error estándar de todos los datos obtenidos durante el experimento de exposición para cada hora de registro y sin considerar las diferentes condiciones espectrales.

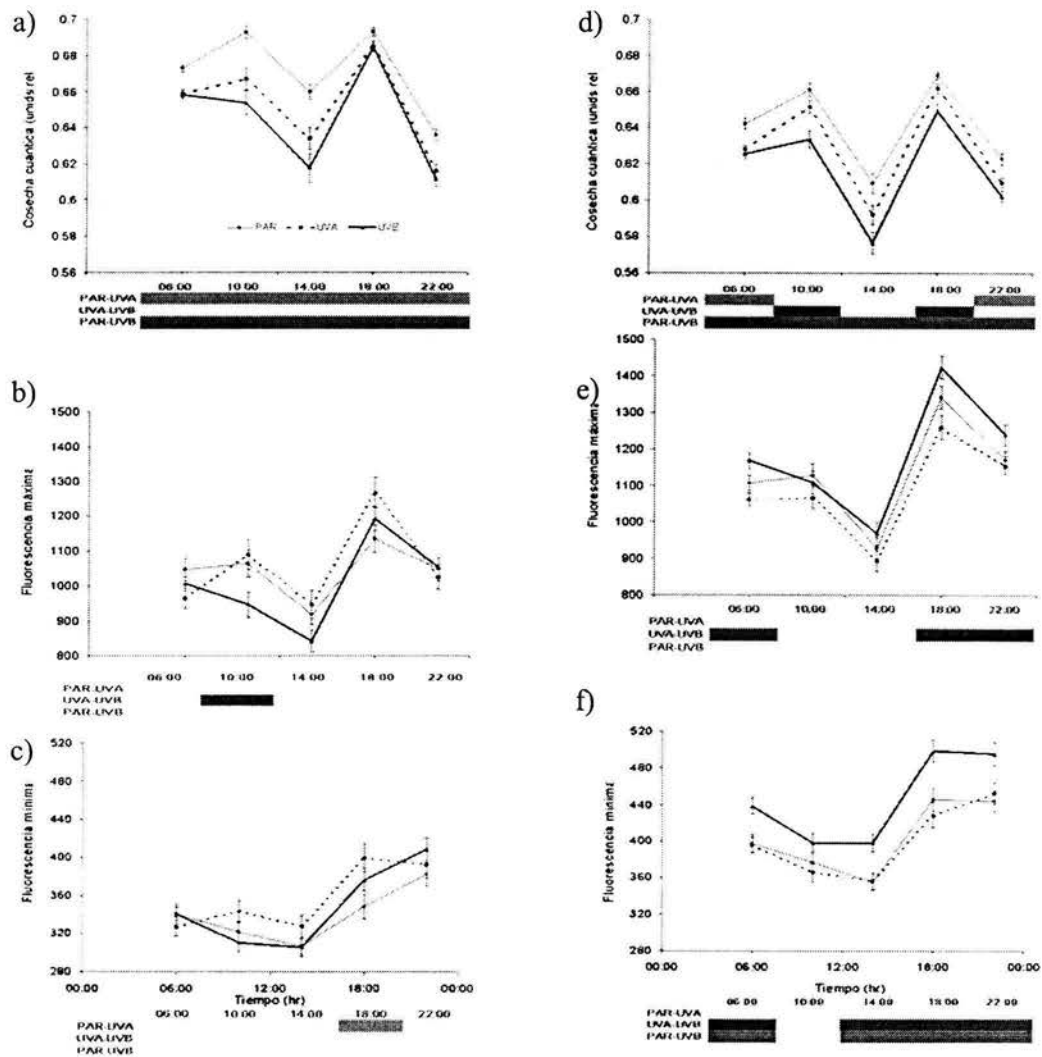


Fig. 4. Ciclo diurno de *P. astreoides* y *D. strigosa*. Promedio de los 30 días de exposición y las 3 replicas de cada tratamiento. En la parte inferior de cada grafico se presentan en color aquellas horas en las que hubo diferencias significativas entre los tratamientos. *P. astreoides*: a) cosecha cuántica, b) fluorescencia máxima c) fluorescencia mínima. *D. strigosa*: d) cosecha cuántica, e) fluorescencia máxima f) fluorescencia mínima. PAR (línea delgada, círculo), PAR+UVA (línea punteada, cuadrado), PAR+UVA+UVB (línea gruesa, triángulo). Media y error estándar.

D. strigosa (0.656 ± 0.047 y 0.629 ± 0.043 respectivamente) (Tabla 2). Esto contrastó con los valores de F_m y F_o , puesto que *P. astreoides* ($F_m = 1035.5 \pm 319.4$ y $F_o = 347.6 \pm 104$) presentó valores significativamente menores que *D. strigosa* ($F_m = 1133.2 \pm 279.6$ y $F_o = 415.4 \pm 102$) (Tabla 2).

Ciclo diurno de la fluorescencia

Al considerar el efecto debido a la hora de registro el ciclo diurno de la cosecha cuántica de ambas especies presentó una forma de “M”, la cual no fue tan evidente en el ciclo de F_m y no se observa en F_o . Comparando los ciclos diurnos de las cosechas cuánticas de ambas especies (Fig. 3a) hubo diferencias significativas de las 06:00 hasta las 18:00, mientras que a las 22:00 no hubo diferencias entre ambas (Tukey HSD Test, $p=0.234$). La diferencia fue mayor a las 14:00. La fluorescencia máxima durante las horas registradas presentó valores mayores en *D. strigosa* que en *P. astreoides*, no existiendo diferencias significativas a las 10:00 y a las 14:00 hrs entre ambas especies. La mayor diferencia se presentó a las 22:00 (Fig. 3b). *D. strigosa* también presentó valores significativamente más altos de Fluorescencia mínima (F_o) que *P. astreoides*, siendo a las 18:00 la mayor diferencia (Fig. 3c).

Ciclo diurno por tratamiento

Durante los 30 días de exposición la cosecha cuántica de *P. astreoides* a las 5 diferentes horas de medición presentó comúnmente valores mayores en los organismos expuestos sólo a PAR, en tanto que los expuestos a UVA y UVB presentaron valores menores y semejantes (Fig. 4a). Empleando el promedio de los 30 días y las 3 replicas, se encontraron diferencias significativas entre PAR y UVA (Tukey $p < 0.05$) y entre PAR y UVB (Tukey $p < 0.05$), no existiendo diferencias significativas entre UVA y UVB (Tukey $p > 0.05$). La fluorescencia máxima de *P. astreoides* presentó en promedio, valores más altos en los organismos expuestos a PAR+UVA, excepto a las 6:00 que tuvo el menor valor (Fig. 4b). Los valores menores en los tres tratamientos fueron a las 14:00 y los mayores a las 18:00. La fluorescencia mínima (Fig. 4c) solo mostró diferencias significativas entre los tratamientos de PAR y UVA a las 18:00. De las 10:00 a las 18:00

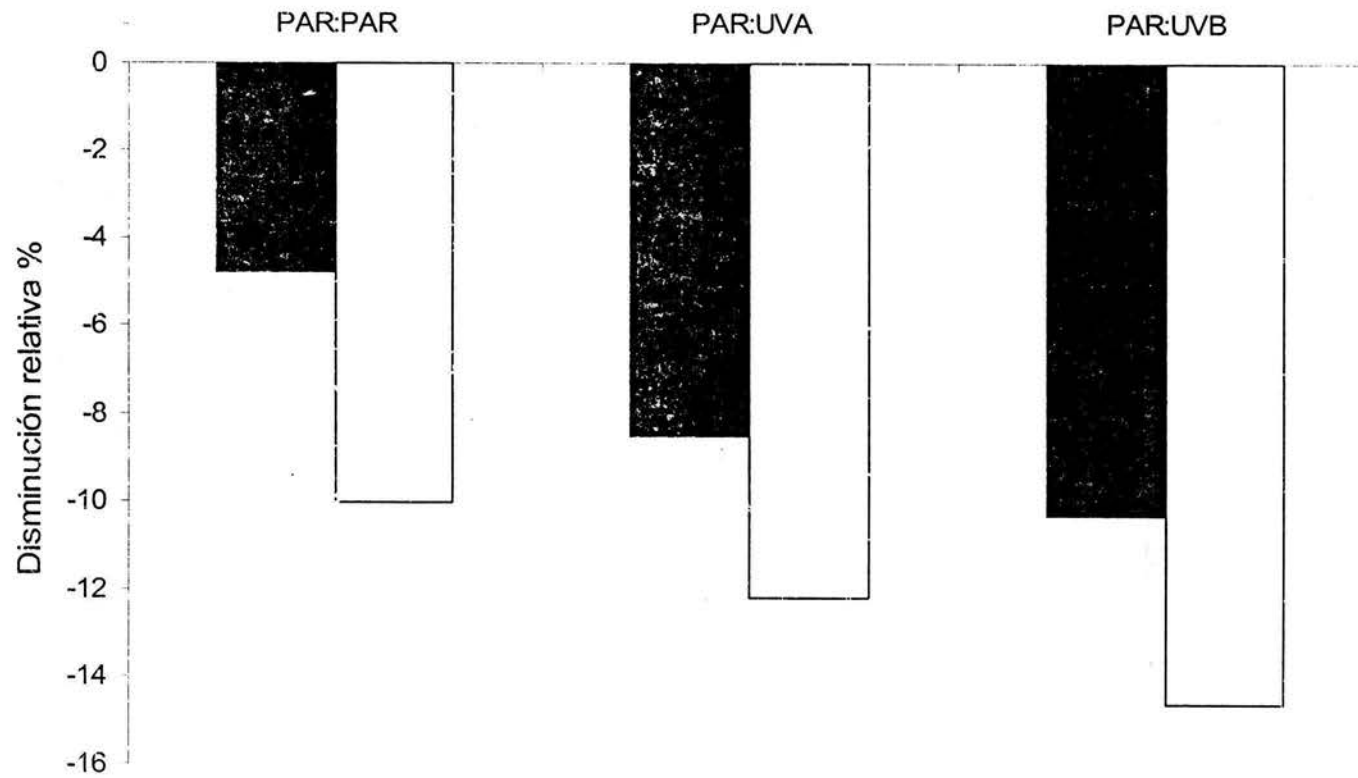


Fig. 5. Disminución relativa de la cosecha cuántica. Comparación entre *P. astreoides* y *D. strigosa* en cada tratamiento de la disminución ó caída relativa de la cosecha cuántica a las 14:00 con respecto a la máxima obtenida durante el día (18:00, tratamiento de PAR) para cada especie. *P. astreoides* (barra negra). *D. strigosa* (barra blanca).

los expuestos a PAR tuvieron valores de fluorescencia mínima mayores que los otros de los otros dos tratamientos.

En *D. strigosa* existen diferencias significativas en la cosecha cuántica de los organismos expuestos a PAR y los expuestos a UVB durante todo el ciclo diurno. El comportamiento de los 3 tratamientos es similar por lo que la forma del ciclo es semejante. A las 6:00 y a las 22:00 existen diferencias significativas entre PAR y UVA, mientras que a las 10:00 y las 18:00 las hay entre UVA y UVB (Fig. 4d). Con respecto a la F_m , no hubo diferencias significativas entre los expuestos a PAR y los de UVB, así como entre PAR y UVA, pero si existen diferencias entre UVA y UVB a las 6:00, 18:00 y 22:00 cuando se registran los valores menores de irradiancia (Fig. 4e). En la fluorescencia mínima promedio de *D. strigosa* (Fig. 4f) hubo diferencias significativas durante todas las horas de registro entre los organismos expuestos a UVB con respecto a los expuestos a PAR y UVA, aunque el comportamiento del ciclo fue similar. *D. strigosa* tuvo valores más altos de F_o y F_m mientras que su cosecha cuántica fue menor. Hubo más diferencias significativas entre los tratamientos de *D. strigosa*.

Caída relativa de la cosecha cuántica y presión sobre el FSII

En la figura 5 se compara la disminución ó caída relativa de la cosecha cuántica a las 14:00 de *P. astreoides* y *D. strigosa* en cada tratamiento con respecto a la máxima obtenida durante el día para cada especie que fue en el tratamiento de PAR a las 18:00. La caída relativa de la cosecha cuántica en *P. astreoides* disminuyó del 4.7 al 10.3%, mientras que en todos los casos el decremento fue mayor en *D. strigosa* de 10.0 a 14.6%). Los organismos de ambas especies expuestos a PAR+UVA+UVB presentaron una mayor caída que los expuestos a PAR.

Se calculó la presión sobre el FSII a las 14:00 considerando la cosecha cuántica máxima (F_v/F_m) a la registrada a las 18:00 debido a que tenía valores mayores que los de las 06:00 y 22:00. En la figura 6 se muestra la presión sobre el FSII promedio de 24 días (sólo se consideraron los días en que se realizaron todos los registros para las dos especies). En general *P. astreoides* presentó valores menores de presión que *D. strigosa* (Fig. 6). Los organismos de las dos especies expuestos a PAR tuvieron menor presión

que los expuestos a todo el espectro solar. En *P. astreoides* no hubo diferencias significativas entre PAR+UVA y PAR+UVA+UVB. La presión sobre el FSII en *D. strigosa* a las 14:00 fue 0.13, 0.12 y 0.11 para UVB, UVA y PAR, mientras que para *P. astreoides* 0.1, 0.08 y 0.06 respectivamente.

Al relacionar la cosecha cuántica máxima (18:00) con la irradiancia total diaria (Fig. 7a y b) se observa que *D. strigosa* presenta valores menores que *P. astreoides* pero la tendencia de disminución de la cosecha cuántica máxima es más conspicua. Por otra parte en las dos especies los expuestos a todo el espectro solar presentaron valores más bajos que los expuestos solo a PAR. En promedio, caídas relativas mayores que *P. astreoides*, excepto en los días nublados. Al relacionar la presión sobre el fotosistema II modificada para las 14:00 ($Q_{14:00}$) a partir de la propuesta por Iglesias-Prieto *et al.* (2004) (que utiliza usando la cosecha cuántica a las 12:00) con la exposición acumulada se observó que *D. strigosa* presenta, en promedio, mayores presiones que *P. astreoides*, excepto en los días nublados.

En la figura 8 se compara la respuesta de ambas especies en cada tratamiento por medio de la presión sobre el FSII a las 14:00 ($Q_{14:00}$) en relación con la exposición acumulada hasta el día anterior. Consistentemente *D. strigosa* presentó valores más altos que *P. astreoides*.

Tasa de transporte de electrones

Al graficar la irradiancia contra la tasa de transporte de electrones se observa que la ETR más alta fue obtenida con $396 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Fig. 9) y fue de $114.9 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para *P. astreoides* y $108.4 \mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en *D. strigosa* con $392 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. En ambas especies las curvas no alcanzaron la fase asintótica. No hay diferencias significativas entre los tratamientos en ninguna especie.

Clorofilas

Las dos especies presentan diferencias en la densidad de clorofila *a* y *c2*. *P. astreoides* presenta mayor cantidad en los tres tiempos y mayor variabilidad (Fig. 10). La densidad de las clorofilas *c2* mostró el mismo patrón que la clorofila *a* (Fig. 10a y b). *P.*

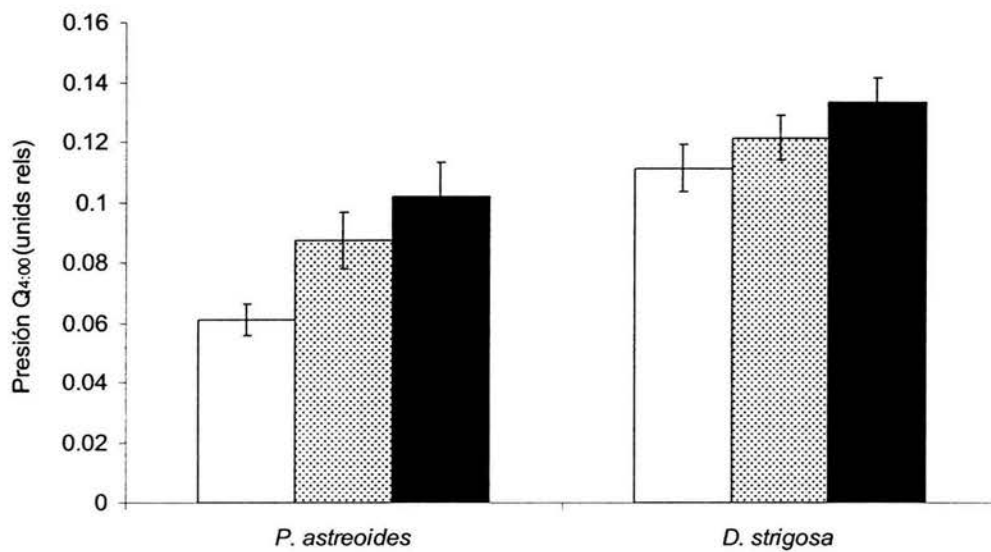


Fig. 6. Presión sobre el FSII ($Q_{14:00}$). Se promediaron solo los días que tenían todos los datos de las diferentes horas de registro ($n=63$). PAR (barra blanca), PAR+UVA (barra punteada), PAR+UVA+UVB (barra negra).

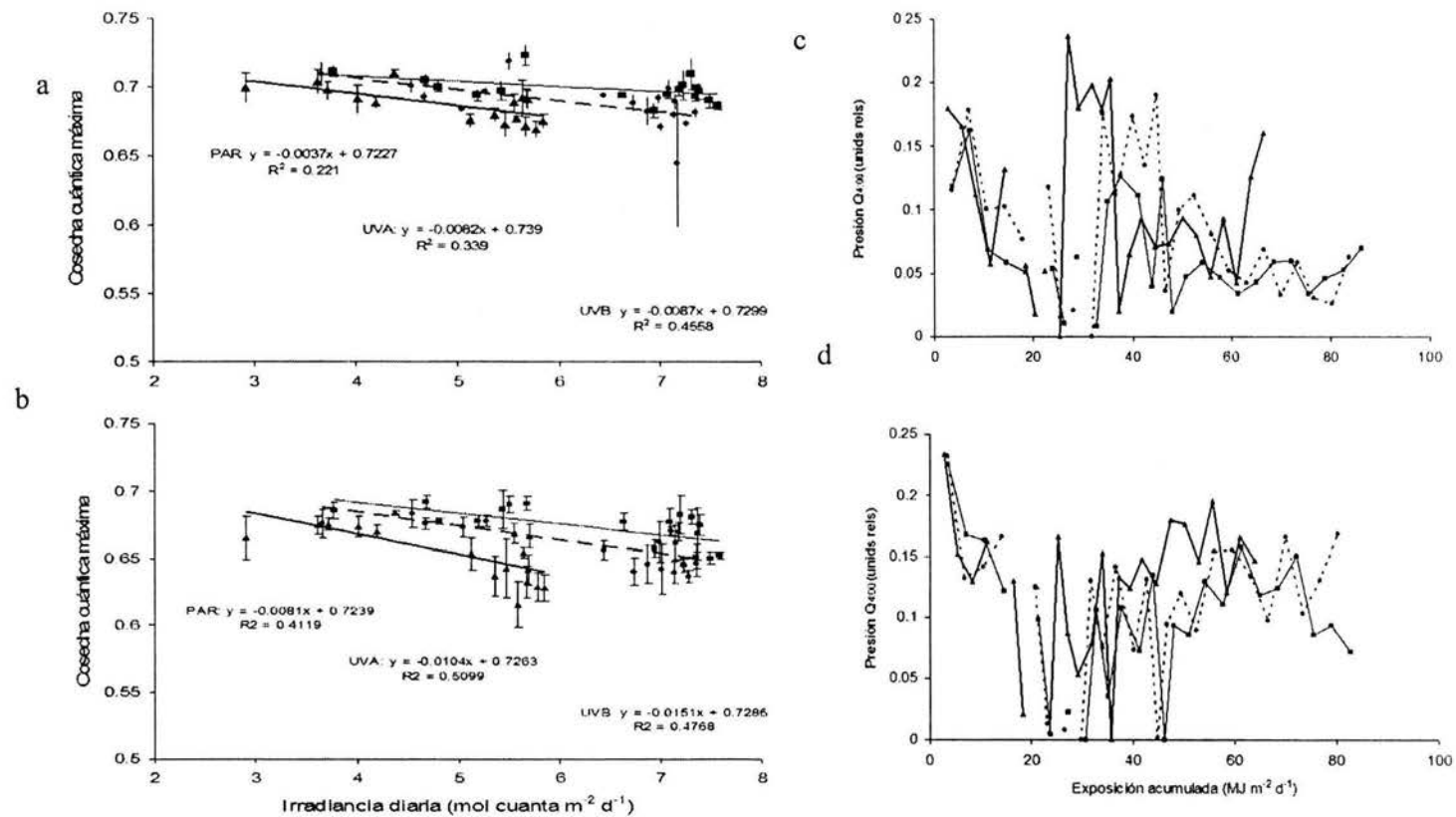


Fig. 7. Cosecha cuántica máxima en relación a la irradiancia total diaria y presión a las 14:00 en función de la exposición acumulada. La cosecha cuántica máxima (a las 18:00) de los últimos diez días en relación con la irradiancia total diaria. Datos de los simbiontes *in situ* de a) *P. astreoides* b) *D. strigosa*. Presión sobre el fotosistema II a las 14:00 ($Q_{14:00}$), c) *P. astreoides*, d) *D. strigosa*. PAR (cuadro, línea delgada), UVA (círculo, línea punteada), UVB (triángulo, línea gruesa).

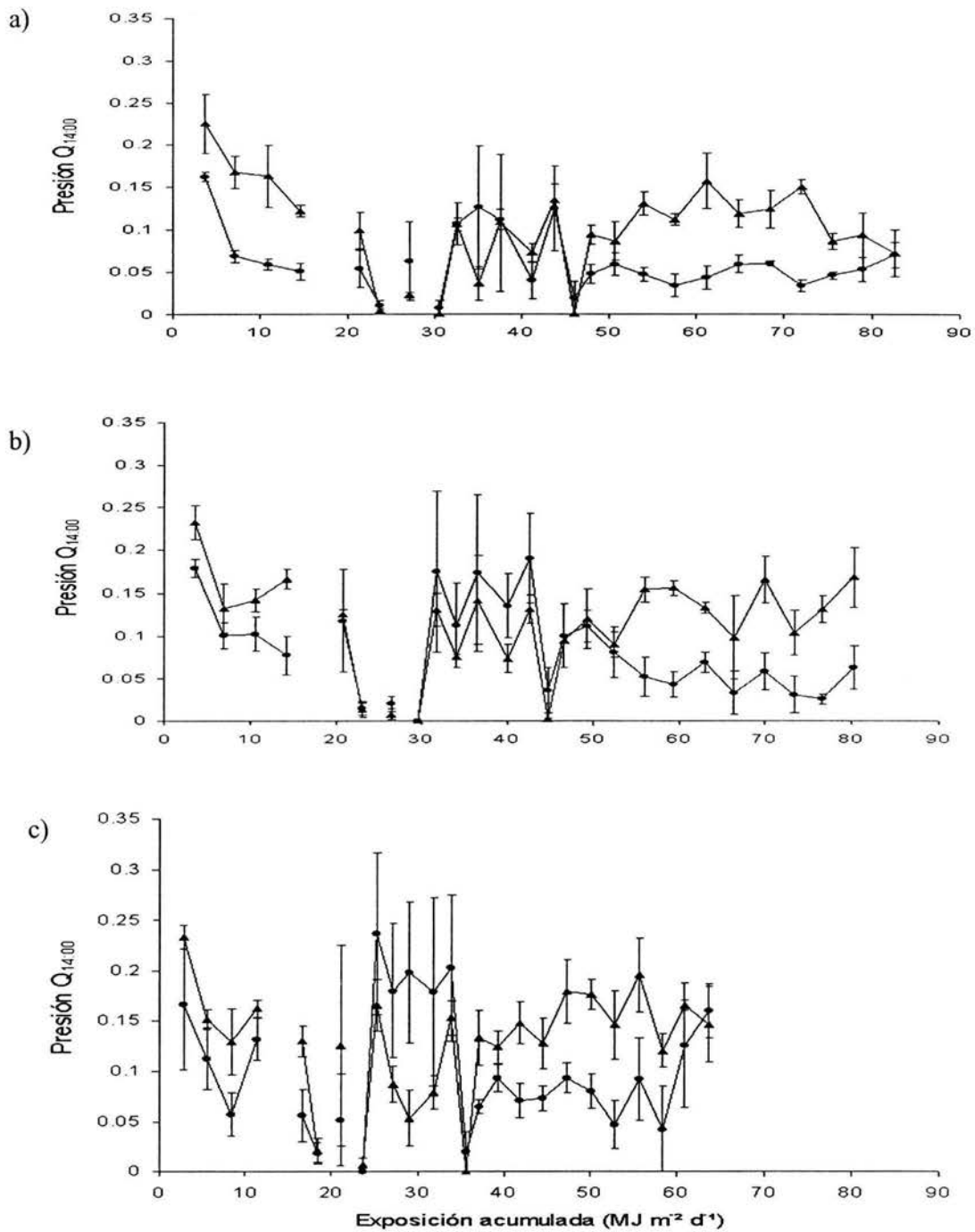


Fig. 8. Presión sobre el FSII a las 14:00 ($Q_{14:00}$) en relación a la dosis acumulada al día anterior. Los dinoflagelados simbiotes de *P. astreoides* (círculo) y *D. strigosa* (triángulo). a) PAR, b) UVA, c) UVB. Media y ES, $n=3$.a)

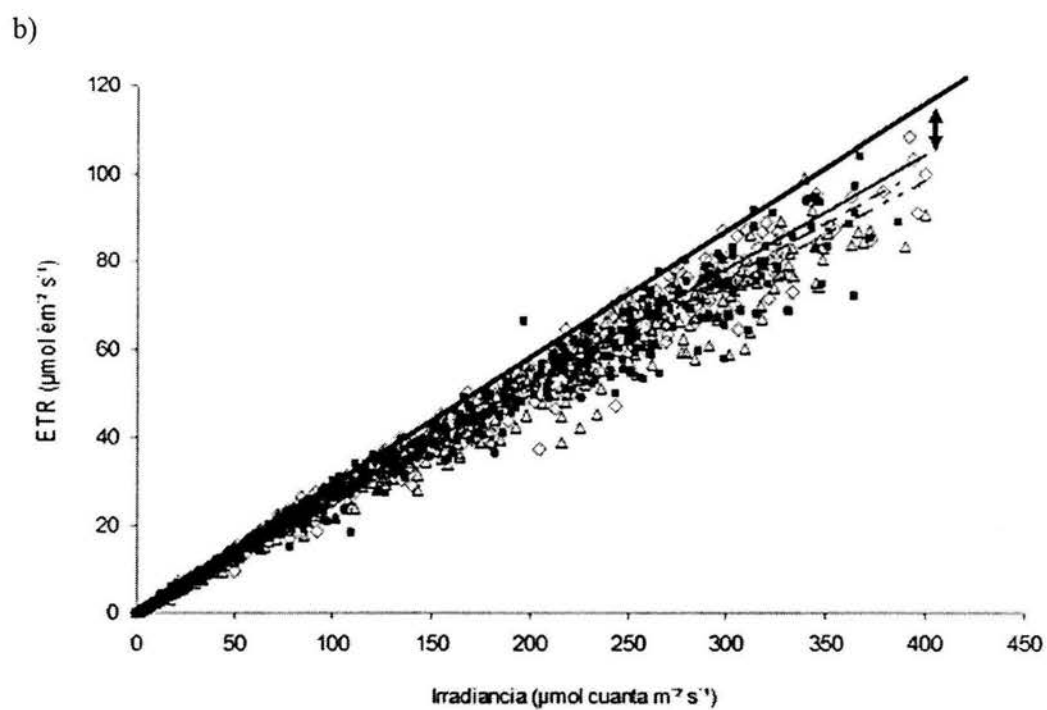
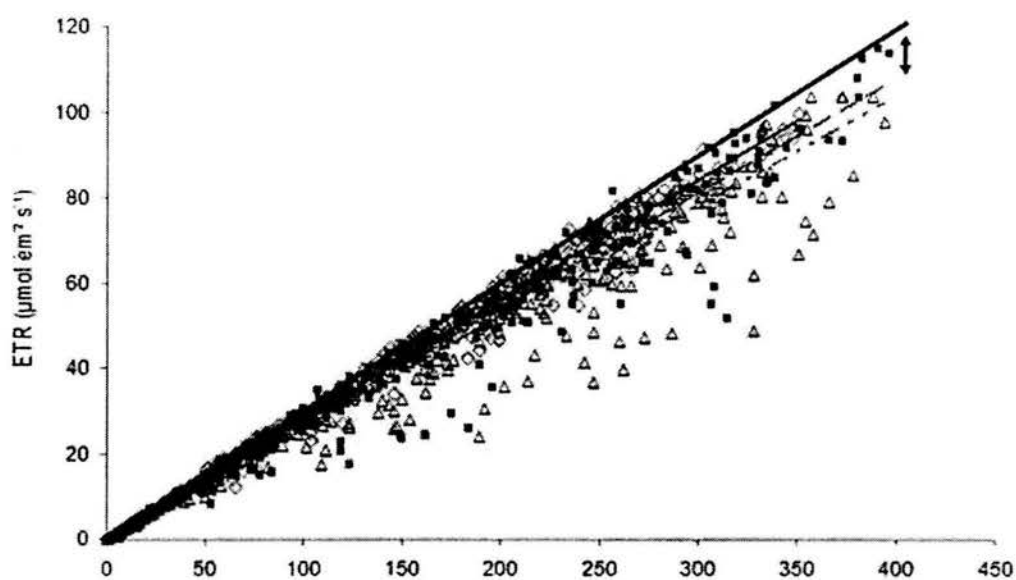


Fig. 9. Variación de la tasa de transporte de electrones. Las curvas son función al tratamiento (PAR: rombo vacío, UVA: cuadrado negro, UVB: triángulo) y a la irradiancia a la que estuvieron expuestos durante los 30 días del experimento. La irradiancia fue registrada en el sensor del Diving PAM al momento de hacer la medición. a) *P. astreoides*, b) *D. strigosa*.

astreoides al final del experimento presentó una menor concentración que al inicio (Fig. 10a y b). En *D. strigosa* se observó una tendencia de incremento en la densidad de clorofilas *a* y *c2* con el tiempo en los expuestos a UVA y UVB (Fig. 10c y d). Al comparar las dos especies sin considerar el tratamiento, se encontró que existían diferencias significativas en clorofila *a* y *c2* de *D. strigosa* para el tiempo 0 (inicio) con respecto al tiempo 2 (30 días) (Tukey HSD test, $t_{(0.05; 6,3)}$ $p > 0.0318$ y $t_{(0.05; 6,3)}$ $p > 0.04611$).

La densidad de clorofilas *a+c2* presentaron un comportamiento similar en ambas especies al ser expuestas a PAR, presentando un aumento en la concentración en el T1 y disminuyendo en el T2, sin embargo, el decremento no fue significativo (Fig. 11a y c). Las dos especies de coral expuestas a PAR+UVA presentaron un comportamiento opuesto a través del tiempo; en *P. astreoides* la concentración de clorofilas *a* y *c2* disminuyó mientras que en *D. strigosa* se incrementó. En tanto que en ambas especies los expuestos a PAR+UVA+UVB aumentaron su concentración de clorofila *a* en el T1 y mientras que en *P. astreoides* decreció de manera evidente en el T2, siendo la diferencia significativa con respecto al T0, en *D. strigosa* aumentó de manera significativa. La clorofila *c2* presentó una pauta similar. En *D. strigosa* se encontraron diferencias significativas entre T0 y T2 del tratamiento UVB.

La proporción clorofila *a:c2* fue mas alta en *P. astreoides* que en *D. strigosa* (Fig. 11b y d), sin embargo, no existieron diferencias significativas debidas al tiempo o al tratamiento, aunque hubo un incremento en el T1 en *P. astreoides* expuesto a UVB, no fue estadísticamente significativo.

En las concentraciones clorofilas (*a + c2*) por célula de simbionte en *P. astreoides* en los tratamientos de PAR y UVA hubo una tendencia a incrementar con el tiempo al igual que en *D. strigosa* bajo tratamiento de UVB. La concentración de clorofila por célula de dinoflagelado simbionte de *P. astreoides* (Fig. 12a) aumentó significativamente en los organismos expuestos solo a PAR, en tanto que no hubo diferencias a través del tiempo en los expuestos a PAR+UVA. En *D. strigosa* la concentración celular de clorofila no presentó diferencias significativas debidas al tratamiento ni al tiempo (Fig. 12b).

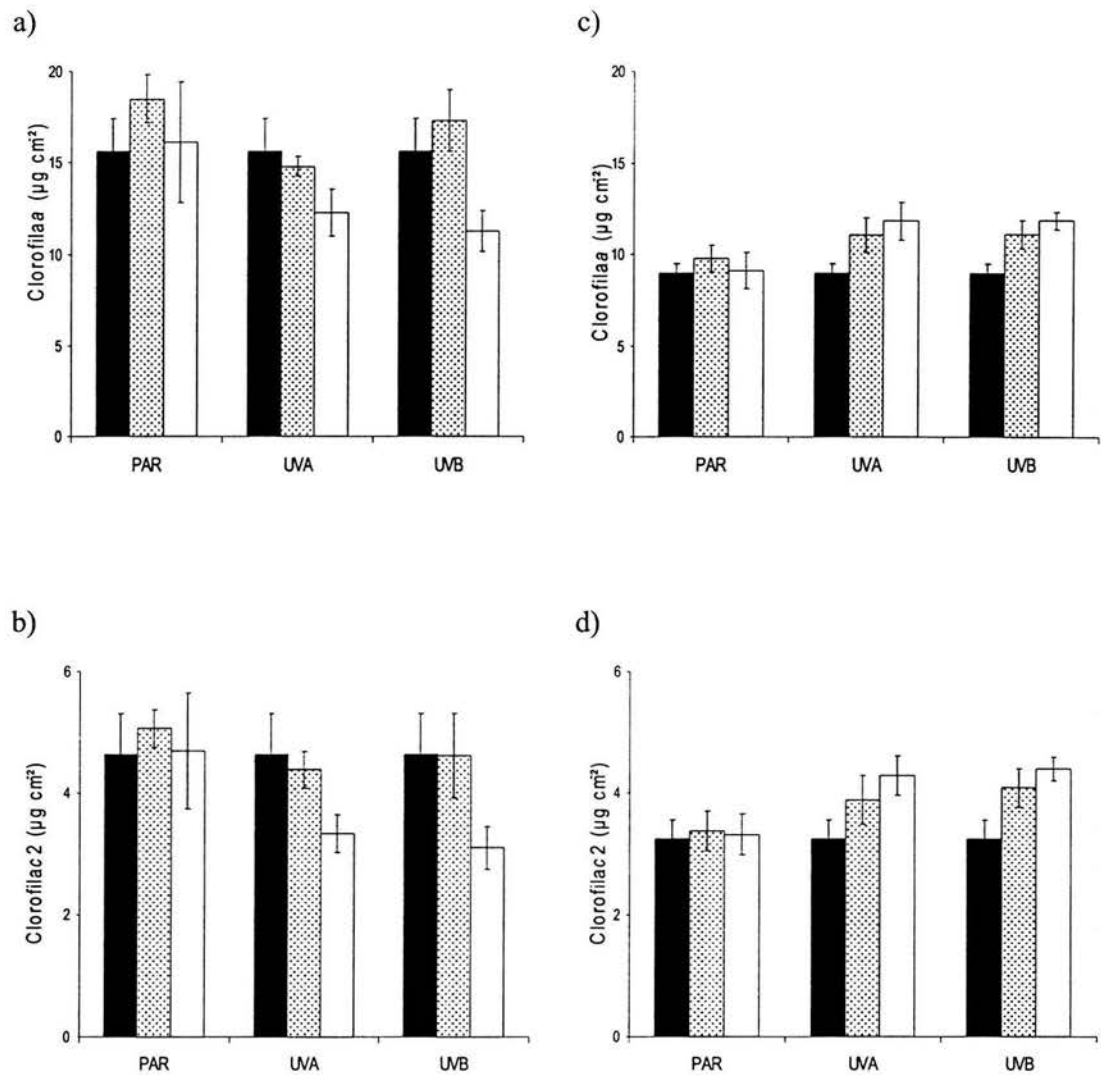


Fig. 10. Densidad de clorofilas *a* y *c2*. En *P. astreoides* y *D. strigosa* al inicio (negro), 15 (punteado) y 30 (blanco) días de exposición en los diferentes tratamientos. a) Densidad de la clorofila *a* en *P. astreoides*, b) Densidad de clorofila *c2* en *P. astreoides*. c) Densidad de clorofila *a* en *D. strigosa* d) clorofila *c2* en *D. strigosa*. Media y error estándar, T0, n=3; T1 y T2, n=6.

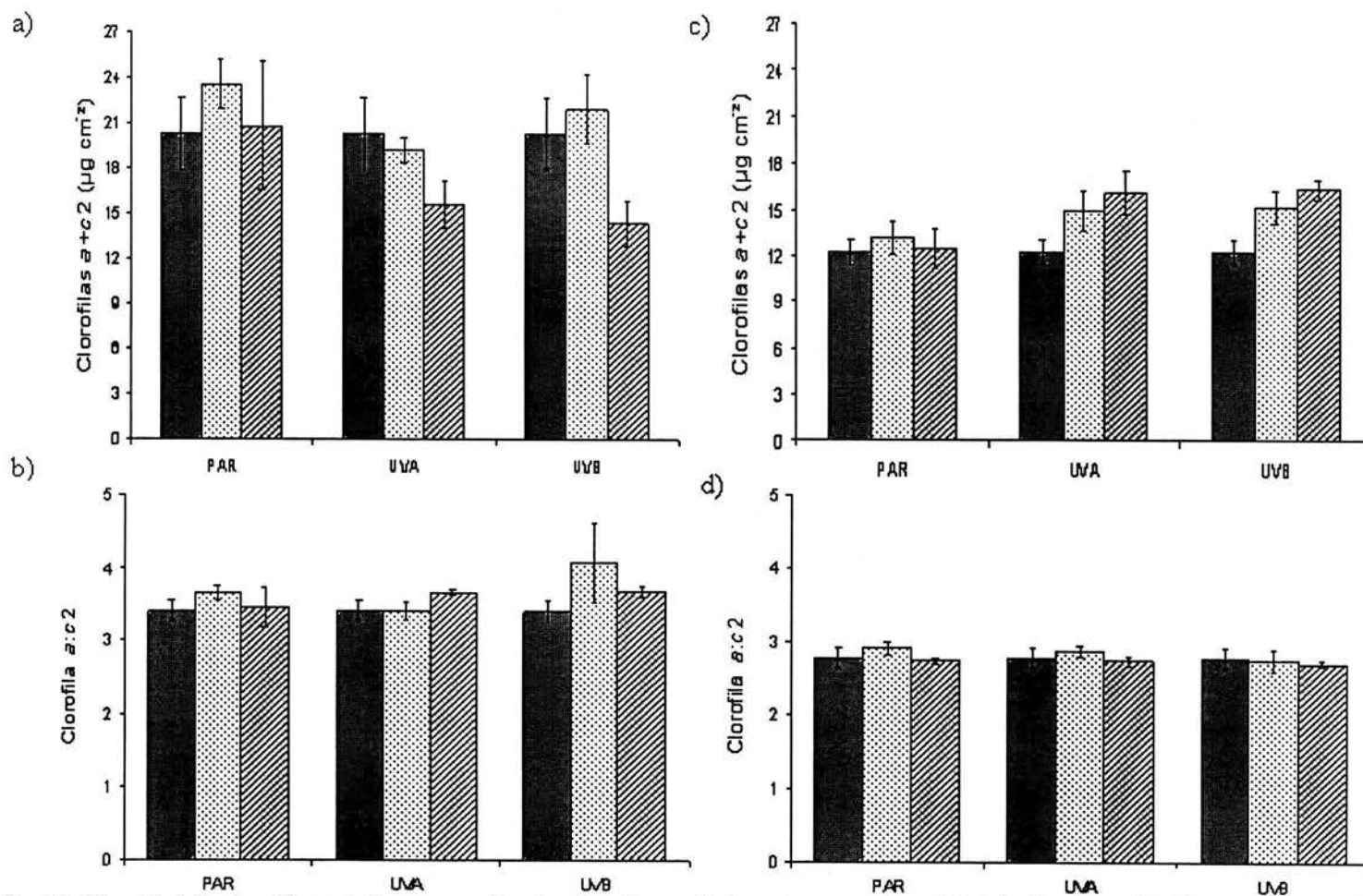


Fig. 11. Densidad de clorofilas *a+c2* y proporción de clorofilas *a:c2* de ambas especies. Al inicio (sombreado), 15 (punteado) y 30 (diagonales) días de exposición en los diferentes tratamientos. *P. astreoides*: a) densidad de clorofilas *a+c2*, b) proporción de clorofila *a:c2*. *D. strigosa*: c) densidad de clorofilas *a+c2*, d) proporción clorofila *a:c2*. Media y error estándar, T0, n=3; T1 y T2, n=6.

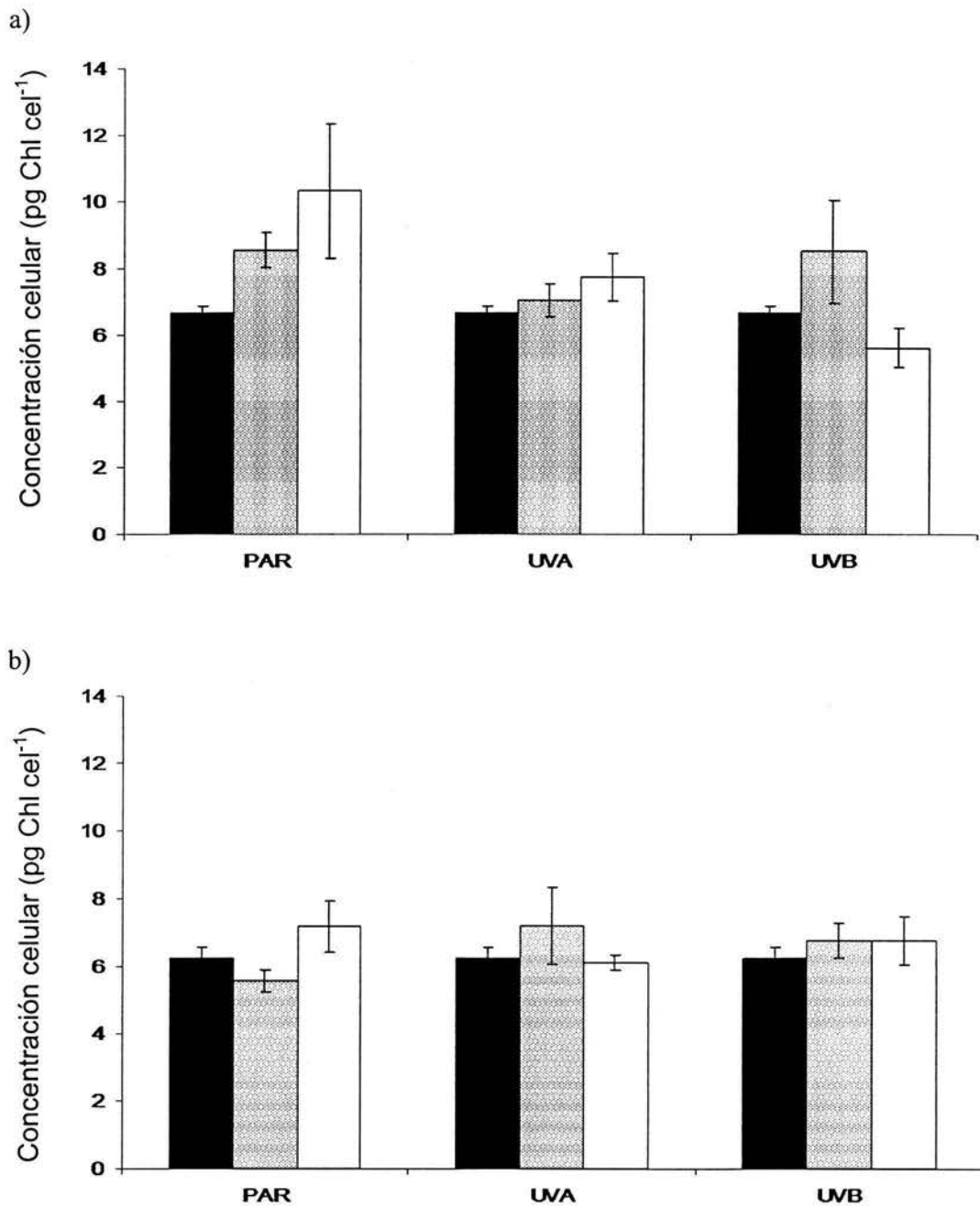


Fig. 12. Concentración celular de clorofilas *a+c2*. En los dinoflagelados simbiotes al inicio (negro), 15 (punteado) y 30 (blanco) días, a) *P. astreoides* y b) *D. strigosa*. Media y error estándar, T0, $n=3$; T1 y T2, $n=6$.

Densidad, índice mitótico (IM) y tamaño de simbioses

Sin considerar el tratamiento y el tiempo, la densidad de simbioses en *D. strigosa* fue menor (2.2×10^6 cél cm^{-2}) que la de *P. astreoides* (2.6×10^6 cél cm^{-2}), cuyas muestras presentaron mayor variación. En las tres condiciones espectrales *P. astreoides* presentó tendencia a la reducción en la densidad de simbioses con respecto al tiempo disminuyendo desde 3.1×10^6 hasta 2.0×10^6 cél cm^{-2} (Fig. 13a). Los organismos expuestos a PAR en el T2 presentaron el mayor decremento siendo diferente de T0 y T1. En los otros tratamientos no existieron diferencias significativas para cada tiempo. La densidad de simbioses en *D. strigosa* (Fig. 13b) no presentó una sola tendencia para las diferentes condiciones espectrales. Los expuestos a PAR+UVA y PAR+UVA+UVB presentaron un incremento no significativo en la densidad con el tiempo, mientras que los expuestos a PAR tuvieron un incremento al tiempo 1 (15 días) con respecto al inicio, para posteriormente disminuir a los 30 días (T2). No hubo diferencias en la densidad de simbioses en el T0 y T1 entre los tratamientos, en tanto que en el T2 hubo diferencias en los expuestos a PAR.

En ausencia de UVB y UVA el índice mitótico disminuyó en ambas especies. En general el índice mitótico fue mayor en *P. astreoides* que en *D. strigosa*, variando entre 0.55 y 2.88% en *P. astreoides* y 0.17 y 1.2% en *D. strigosa*, sin embargo la variación dentro de los tratamientos fue muy grande, evidenciado por los errores estándar (Fig. 13c y d).

En *P. astreoides* el diámetro de los dinoflagelados aumentó con el tiempo en los expuestos a todo el espectro solar en tanto que los expuestos a PAR y PAR+UVA hubo un incremento al T1 y después una reducción (Fig. 13e). Se presentaron diferencias significativas estadísticamente entre el T0 y el T2 en los tratamientos de UVA y UVB. En los expuestos a PAR el tamaño aumentó de manera significativa del T0 al T1. En *D. strigosa* la tendencia fue a disminuir de tamaño (diámetro) en los tres tratamientos, habiendo diferencias significativas entre el T0 y T2 (Fig. 13f).

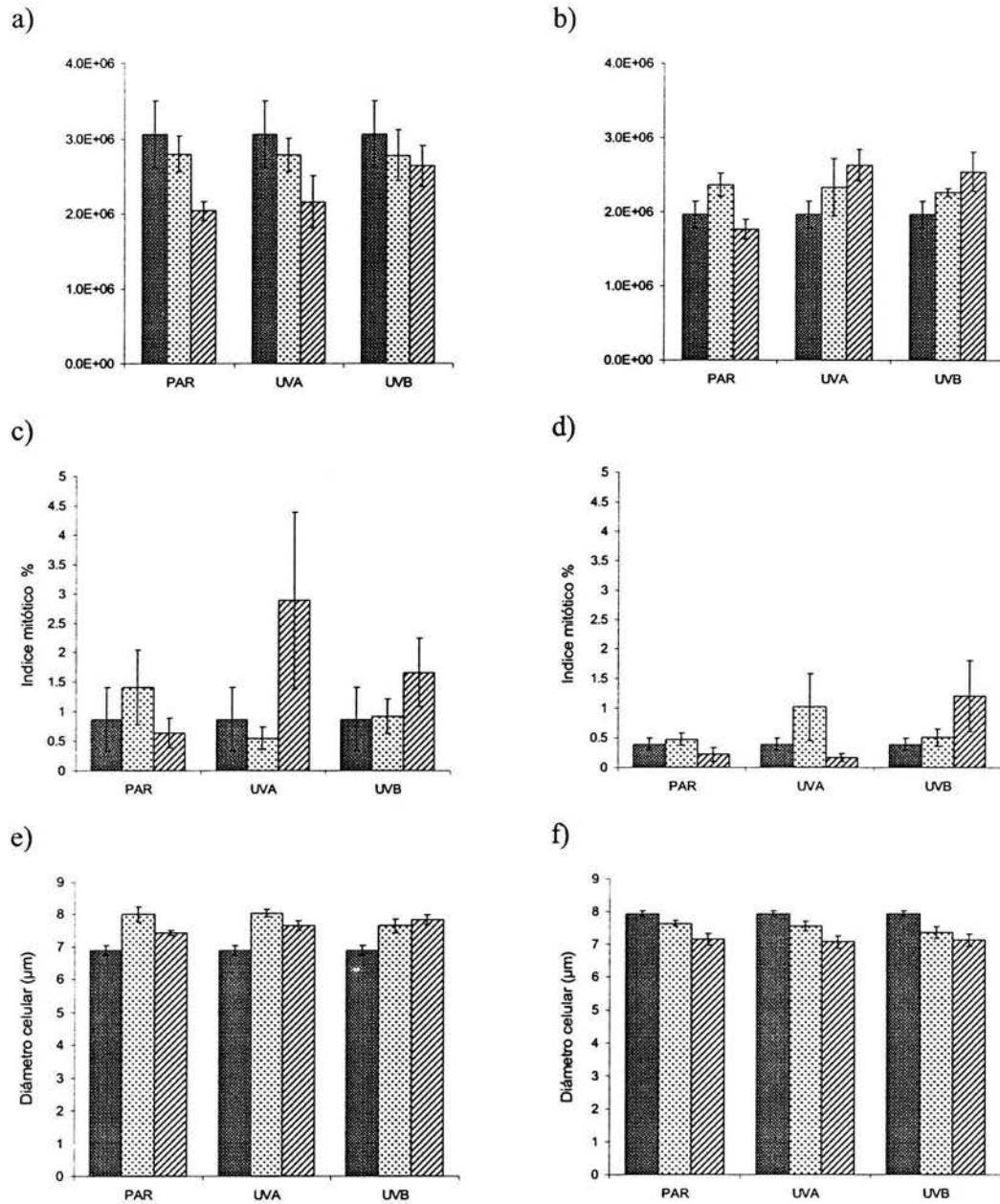


Fig. 13. Densidad, índice mitótico y diámetro celular de los dinoflagelados simbiotes. La densidad es dinoflagelados por cm^2 de superficie del esqueleto al inicio (sombreado), 15 (punteado) y 30 (diagonales) días. a) *P. astreoides*, b) *D. strigosa*. Índice mitótico c) *P. astreoides*, d) *D. strigosa*. Diámetro celular e) *P. astreoides*, f) *D. strigosa*. Media (\pm ES). T0, $n=3$; T1 y T2, $n=6$.

Eficiencias de extracción de las MAAs

Al comparar los diferentes protocolos utilizados se encontró que existe más variabilidad en el coeficiente de extracción (E_1) después de la primera extracción (variaba de 0.591 ± 0.075 a 0.897 ± 0.031 ; Tabla 3a) que en la eficiencia de extracción ($E_N = E_3$) después de 3 extracciones seriales (0.928 ± 0.038 a 0.999 ± 0.001) (Tablas 3a y b). Los menores E_1 y E_3 fueron obtenidos al usar una muestra congelada de *P. astreoides* utilizando agua desionizada para remover el tejido del esqueleto de coral y después de 3 extracciones seriales de 24 hr con metanol:THF a -20 °C, mientras los mayores fueron usando una muestra fresca removida con buffer TE y 3 extracciones seriales de 1 hr con metanol 100%.

No hubo diferencias significativas al utilizar una muestra congelada o una fresca (Tabla 3b). La proporción de MAAs removidos después de la primera extracción estimada con el coeficiente de extracción (E_1) en los 54 protocolos analizados vario de 0.591 ± 0.075 a 0.897 ± 0.031 . (Tabla 3a). Para remover el tejido los mejores resultados se obtuvieron utilizando buffer TE, el solvente más eficiente fue metanol:agua 80% (Tabla 3).

Micosporinas parecidas a aminoácidos

En general todos los espectros de absorción de los extractos metanólicos tanto del tejido del coral como de los simbiontes aislados presentaron un pico de absorción de MAAs (Fig. 14a, b y c), sin embargo, en algunos casos se confirmó utilizando la 1ª y 2ª derivada de los espectros. La altura de los picos de *P. astreoides* fue casi el doble de la de *D. strigosa* tanto en el tejido como en el simbionte aislado (Fig. 14b y c). En tanto que si se comparan los espectros normalizados a área obtenidos de los dinoflagelados aislados de *P. astreoides* y el tejido del coral, se observa que las diferencias en absorbancia son de un orden de magnitud. Los espectros de absorción de UV de los extractos metanólicos del tejido de *P. astreoides* presentaron un pico bien definido a 328-330 nm (Fig. 15), mientras que en el extracto metanólico del tejido de *D. strigosa* no se presentó un pico definido en el UV, con excepción de los expuestos al tratamiento

a)

Líquido rompimiento de muestra		Agua de mar filtrada		Buffer T. E.		Agua deionizada	
Time, Temp (°C)	solvente de extracción	Fresca	Congelada	Fresca	Congelada	Fresca	Congelada
1hr, 25°C	metanol	0.723	0.792	0.897	0.828	0.838	0.742
	met-agua	0.861	0.814	0.864	0.829	0.845	0.858
	met-THF	0.727	0.689	0.772	0.800	0.802	0.721
5hr, 0°C	metanol	0.727	0.731	0.749	0.779	0.778	0.717
	met-agua	0.759	0.760	0.839	0.844	0.828	0.827
	met-THF	0.726	0.752	0.754	0.731	0.755	0.656
24hr, -20°C	metanol	0.622	0.771	0.746	0.783	0.779	0.700
	met-agua	0.706	0.712	0.865	0.867	0.842	0.833
	met-THF	0.709	0.727	0.696	0.726	0.719	0.591

b)

Líquido rompimiento de muestra		Agua de mar filtrada		Buffer T. E.		Agua deionizada	
Tiempo, Temp (°C)	Solvente de extracción	Fresca	Congelada	Fresca	Congelada	Fresca	Congelada
1hr, 25°C	100% metanol	0.979	0.991	0.999	0.994	0.995	0.983
		-0.001	-0.001	-0.001	-0.005	-0.005	-0.004
	80% metanol-agua	0.997	0.993	0.997	0.994	0.996	0.997
5hr, 0°C	100% metanol	0	-0.002	-0.001	-0.005	-0.003	-0.001
		0.979	0.969	0.988	0.992	0.992	0.978
	20% THF-metanol	-0.004	-0.011	-0.001	-0.001	-0.001	-0.001
24hrs, -20°C	100% metanol	0.979	0.98	0.984	0.989	0.989	0.977
		-0.006	-0.009	0	-0.003	-0.004	-0.005
	80% metanol-agua	0.985	0.985	0.996	0.996	0.995	0.995
24hrs, -20°C	80% metanol-agua	-0.01	-0.011	-0.002	-0.001	-0.002	-0.002
		0.979	0.984	0.985	0.981	0.985	0.959
	20% THF-metanol	-0.003	-0.009	-0.001	0	-0.001	-0.009
24hrs, -20°C	100% metanol	0.938	0.988	0.984	0.99	0.989	0.973
		-0.051	-0.003	-0.001	-0.001	-0.002	-0.003
	80% metanol-agua	0.971	0.976	0.998	0.998	0.996	0.995
24hrs, -20°C	20% THF-metanol	-0.023	-0.006	0	-0.001	0	0
		0.975	0.98	0.972	0.979	0.978	0.928
	0	-0.002	-0.003	-0.004	-0.002	-0.038	

Tabla 3. Coeficiente y eficiencia de extracción de los protocolos examinados. a) Coeficientes de extracción (E1), resaltados se indican los valores máximo y mínimo. b) Eficiencias de extracción (E3), en negritas se señalan las eficiencias mayores a 0.99 y encerradas en cuadrados las eficiencias máxima y mínima. Media y error estándar, $n=2$.

de PAR+UVA+UVB, que tanto al T1 como al T2 presentaron un pico a los 313 nm (Fig. 15d y f, Tabla 4). Los espectros de absorción de UV de los extractos metanólicos de los simbiontes aislados de *P. astreoides* se caracterizaron por un pico máximo entre 335-338 nm y otro más pequeño en los 308-310 nm (Fig. 16a, c, e), mientras que los espectros de los simbiontes de *D. strigosa* (Fig. 16b, d, f) presentaron un pico de absorción a los 332-335 nm y otro a 308, sin embargo, el tamaño del pico fue menor y no estaba bien definido (Tabla 4).

En el T1 los espectros del tejido de *D. strigosa* presentan diferencias en el tratamiento de PAR+UVA con respecto a las otras dos condiciones espectrales, en tanto que en *P. astreoides* la diferencia significativa en la altura del pico se da entre PAR y PAR+UVA+UVB, los errores estándar del espectro de los expuestos a PAR+UVA, se traslapan con los de los otros dos tratamientos. Al final del experimento (T2) la diferencia fue en el espectro del tejido de *D. strigosa* expuesta a PAR+UVA+UVB que tuvo una altura mayor y un pico bien definido a los 313 nm. En el espectro del extracto del tejido de *P. astreoides* al T2 la diferencia se presentó entre los tratamientos de PAR y PAR+UVA y entre PAR+UVA y PAR+UVA+UVB.

En los espectros de absorción de los extractos metanólicos del dinoflagelado de *D. strigosa* al final de la exposición (T2) se presentan diferencias no significativas en solo PAR con respecto a los otros dos tratamientos (Fig. 16d). En los espectros del dinoflagelado de *P. astreoides* no se observan cambios significativos debido al tratamiento en cada tiempo (Fig. 16b).

Al analizar la absorbancia del pico de MAAs en función a la clorofila *a*, se encontró que aunque hubo cambios en ambas especies, estos no fueron significativos (Tabla 5).

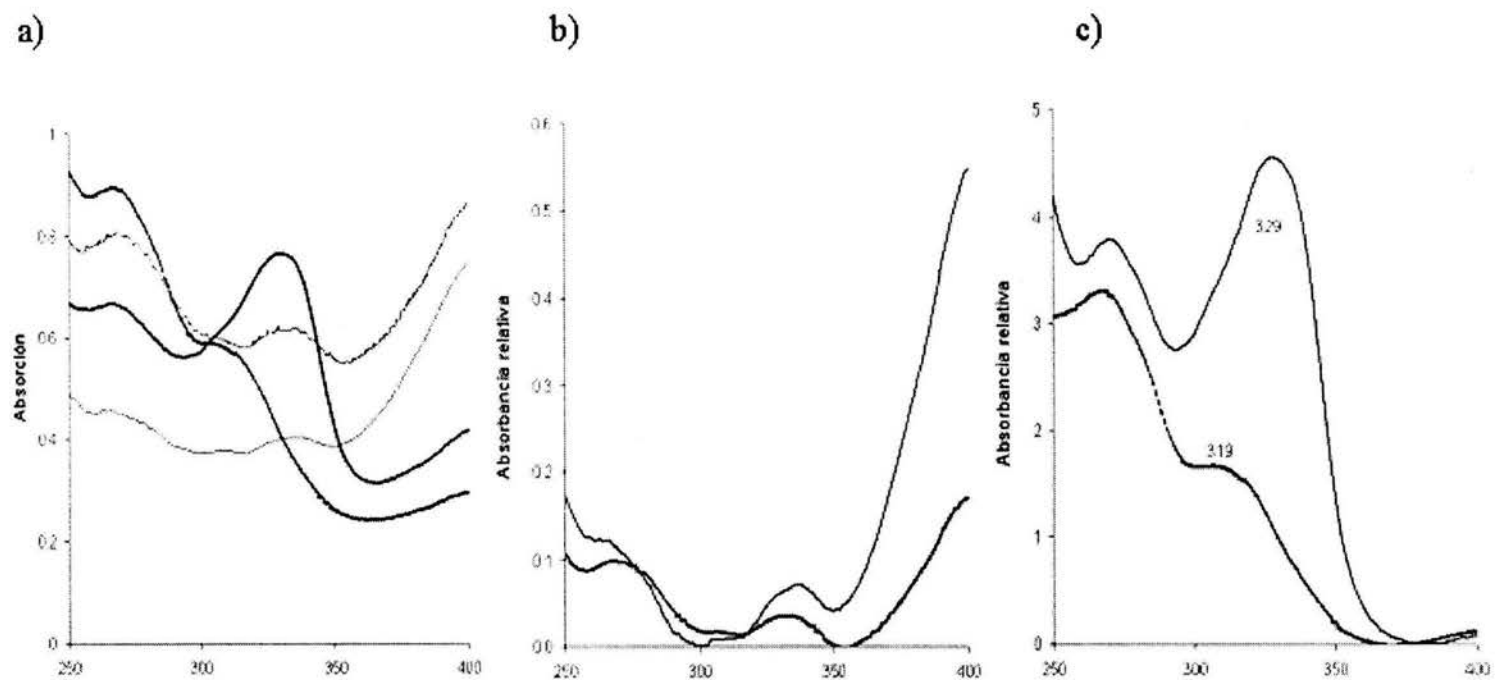


Fig. 14. Espectros de absorción de MAAs. a) Sin normalizar, de los extractos metanólicos del holosimbionte (*P. astreoides*, línea continua gruesa; *D. strigosa* (línea punteada gruesa) y de los simbiontes aislados (*P. astreoides*, línea continua delgada; *D. strigosa*, línea punteada delgada). Espectros de absorción normalizados considerando la absorción mínima en cada uno. b) Dinoflagelados aislados. c) Holosimbionte. *P. astreoides* (línea continua) y *D. strigosa* (línea punteada) antes de ser expuestos a los diferentes tratamientos. El pico de *D. strigosa* se confirmó con la 2a derivada.

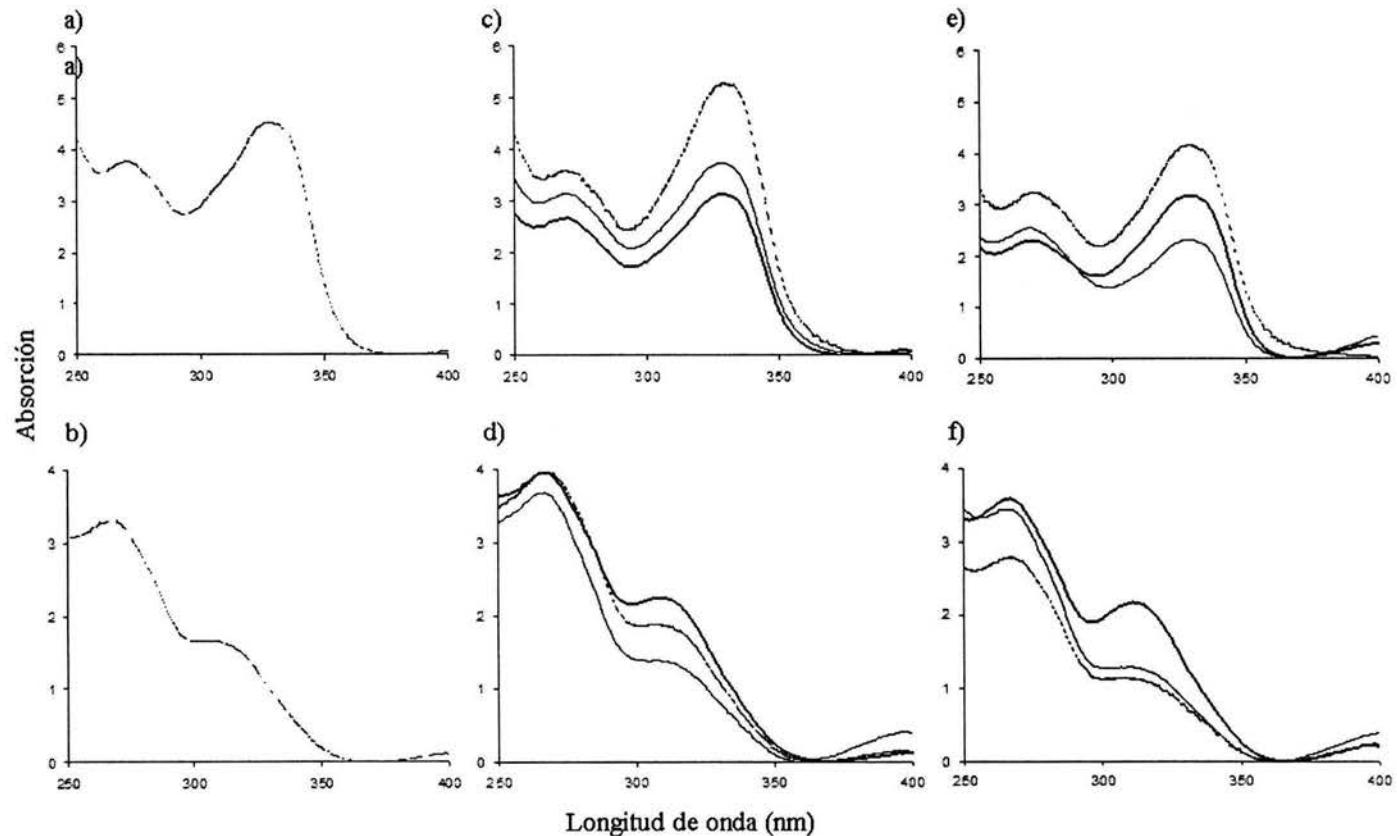


Fig. 15. Cambios en los espectros de absorción del tejido coralino. Los espectros normalizados de los extractos metanólicos del tejido intacto de *P. astreoides* y *D. strigosa* en cada tiempo en las tres condiciones espectrales. Espectros de *D. strigosa*: a) tiempo 0 (inicio), c) tiempo 1 (15 días), e) tiempo 2 (30 días). Espectros de absorción de *P. astreoides*. b) tiempo 0 (inicio), d) tiempo 1 (15 días), f) tiempo 2 (30 días). Para cada espectro se presenta la media (T0, $n=4$; T1, $n=6$; T2, $n=6$; se omiten los errores estándar para mayor claridad). (PAR: tratamiento de solo PAR, línea punteada; UVA: tratamiento de PAR+UVA, línea delgada; UVB: tratamiento de PAR+UVA+UVB, línea gruesa).

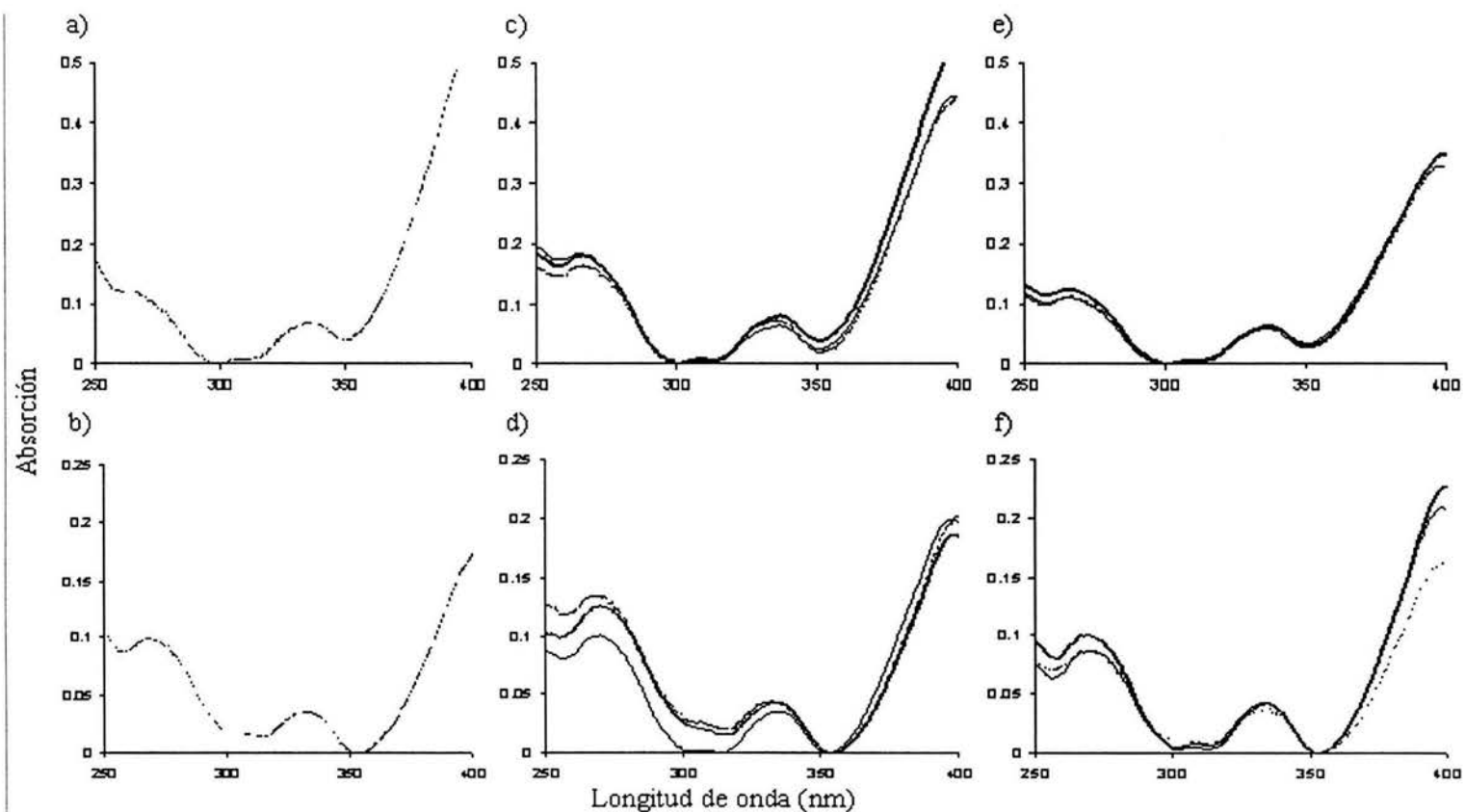


Fig. 16. Cambios en los espectros de absorción de los dinoflagelados aislados. Los espectros normalizados de los extractos metanólicos de los simbioses aislados de *P. astreoides* y *D. strigosa* en cada tiempo en las tres condiciones espectrales. Espectros de *D. strigosa*: a) tiempo 0 (inicio), c) tiempo 1 (15 días) e) tiempo 2 (30 días). Espectros de absorción de *P. astreoides*. b) tiempo 0 (inicio), d) tiempo 1 (15 días) f) tiempo 2 (30 días). Para cada espectro se presenta media (T0, n=4; T1, n=6; T2, n=6). (PAR: tratamiento de solo PAR, línea punteada; UVA: tratamiento de PAR+UVA, línea delgada; UVB: tratamiento de PAR+UVA+UVB, línea gruesa).

Tratamiento	Tiempo	<i>P. astreoides</i>		<i>D. strigosa</i>	
		tejido	dinoflagelado	tejido	dinoflagelado
inicio	T0	328	337, 308	319	333, 308*
PAR	T1	330	336, 310		333, 308*
PAR+UVA	T1	328	337, 310		334, 308*
PAR+UVA+UVB	T1	328	337, 310	317	334, 308
PAR	T2	329	335, 308		334, 308*
PAR+UVA	T2	328	337, 308		333, 308
PAR+UVA+UVB	T2	329	337, 308	313	335, 308

* picos que no estan bien definidos en el espectro, pero que se detectan con la 2a derivada

Tabla 4. Longitudes de onda de máxima absorción en los picos de MAAs. Los picos se observaron en el intervalo de 250 a 400 nm en los espectros de absorción de UV de los extractos metanólicos de tejido coralino y dinoflagelados aislados. Los espectros son el resultado del promedio de las diferentes muestras (T0, $n = 4$; T1 y T2, $n = 6$).

Tratamiento	Tiempo	<i>P. astreoides</i>			<i>D. strigosa</i>		
		longitud de onda	absorbancia /ng chl <i>a</i>	absorbancia / μ mol chl <i>a</i>	longitud de onda	absorbancia / μ g chl <i>a</i>	absorbancia / μ mol chl <i>a</i>
inicio	T0	337	3.673	3.282	334	3.02	2.698
PAR	T1	336	3.097	2.767	333	3.291	2.94
PAR+UVA	T1	337	3.386	3.025	334	2.506	2.239
PAR+UVA+UVB	T1	337	3.754	3.354	334	2.801	2.502
PAR	T2	335	3.327	3.935	334	3.092	2.762
PAR+UVA	T2	337	4.426	3.954	333	2.778	2.482
PAR+UVA+UVB	T2	337	4.804	4.297	335	2.616	2.338

Tabla 5. Relación de absorbancia por unidad de chl *a*. Se consideró la relación entre las longitudes de máxima absorción de las MAAs en los espectros de absorción de UV de los extractos metanólicos de dinoflagelados aislados y la concentración de clorofila *a*. (T0, n = 4; T1 y T2, n = 6).

DISCUSION

En esta investigación se utilizó luz solar natural, con el fin de exponer a los corales a condiciones de irradiancia semejantes a su ambiente natural y evitar desviaciones del espectro solar. Los estudios de laboratorio utilizan a menudo espectros de radiación que se desvían del espectro solar, especialmente en las longitudes de onda de radiación de UV-A (320-400nm) que causan tanto fotoreparación como fotoinhibición (Helbling *et al.* 1992). Por ello los espectros de radiación artificiales han sido evitados en algunos estudios utilizando luz de sol natural (Jokiel y York 1984, Behrenfeld *et al.* 1992, Kinzie 1993).

Muchos de los trabajos realizados para estudiar los efectos de la RUV analizan solo la presencia o ausencia de la misma, sin embargo, este trabajo junto con el de Fitt y Warner (1995) demuestra que existe un efecto diferencial en la eficiencia fotoquímica debido a la UV-A y a UV-B. Usualmente los efectos de la luz ultravioleta en los procesos biológicos *in vivo* involucran interacciones entre regiones espectrales, por ejemplo, la reparación de algunos componentes del aparato fotosintético es dependiente de la presencia de UVA. No obstante, la UV-A también es fuente de daño indirecto al ser inductora de la formación de especies reactivas de oxígeno.

Las propiedades ópticas del tejido coralino y del esqueleto de *P. astreoides* y *D. strigosa* no son conocidas. Pero la morfología del esqueleto de *P. astreoides* con colonias con pequeños montículos, corallum fenestrado y coralitos pequeños es diferente a la de *D. strigosa* que presenta colonias hemiesféricas con valles meandroides y coralitos continuos. Estas diferencias sugieren que el campo lumínico al que están expuestos los simbioses de estas especies es diferente. El corallum fenestrado de *P. astreoides* permite a los simbioses migrar hacia adentro del esqueleto para evitar las altas irradiancias (tanto PAR como RUV) y a los pólipos coralinos retraerse más, mientras que *D. strigosa* que no tiene un esqueleto fenestrado, tanto los simbioses como los pólipos tienen menos probabilidades de evadir la irradiancia. Existen trabajos como los de Kühl *et al.* (1995) y Ralph *et al.* (2002) en los que se analiza el campo lumínico en el coral, pero estos trabajos sólo se limitan al comportamiento de la luz visible en

tanto que se desconoce lo relacionado a la luz ultravioleta. De acuerdo con R. Iglesias-Prieto, S. Enríquez y E. Méndez (Com. Pers.) el esqueleto de los corales tiene propiedades de amplificación de la luz visible hasta de 10 veces. Esto es importante si consideramos que durante el experimento realizado la dosis diaria que recibieron los organismos varió en un factor de 10 (Fig. 2, Tablas 1a y c). Es por ello que uno de los factores importantes en la regulación de la fotosíntesis del dinoflagelado es el campo lumínico dentro del tejido coralino.

Así como existe un efecto de amplificación de PAR, también puede haber un efecto de amplificación de la luz ultravioleta debido al incremento del paso óptico dentro del tejido coralino. La expulsión de los dinoflagelados simbiotes del tejido del coral puede aumentar la amplificación y dejarlo totalmente expuesto. El daño por RUV bajo estas condiciones puede tener un papel importante en la mortalidad masiva de los corales que sufren blanqueamiento. Por lo anterior es importante realizar estudios detallados de los cambios en la radiación ultravioleta debidos al esqueleto y al tejido coralino y sus efectos tanto en el simbiote como en el hospedero.

Durante el experimento los corales expuestos a PAR+UVA+UVB recibían la radiación solar normal, por lo que los tratamientos no consistieron en imponer un estrés, sino más bien pudo existir una relajación de las influencias ambientales normales para los corales expuestos solo a PAR y PAR+UVA. Este estudio mostró cómo los corales responden a las condiciones de su ambiente bajo los flujos de UV actuales y bajo circunstancias de irradiancia solar no saturante. La capacidad de estos corales para funcionar bajo estas condiciones es un reflejo de su adaptación a largo plazo a los ambientes de aguas someras tropicales donde viven.

Este trabajo es el primero en evaluar el efecto diferencial de la RUV-A y RUV-B a largo plazo sobre la eficiencia fotoquímica en los dinoflagelados simbiotes de los corales *P. astreoides* y *D. strigosa*. La variabilidad de las condiciones climáticas permitió observar como respondían los organismos a condiciones de irradiancia mayor y relativamente constante y de irradiancia variable, esta debido a la nubosidad durante algunos días. La respuesta de los organismos a la irradiancia pone de manifiesto la

importancia de la historia de exposición o historia lumínica (Fig. 2). El periodo con días nublados permitió que los organismos se relajaran, por lo que en los últimos 10 días es posible observar la respuesta a condiciones de irradiancia y dosis diarias semejantes. La variación de la cosecha cuántica diaria durante los 30 días de experimento muestra el patrón característico de disminución con el aumento de la irradiancia así como una recuperación a las horas de menor intensidad lumínica (Fig. 3a, 4a y d) como reportan otros autores para dinoflagelados simbioses *in hospite* de corales e hidrocorales (Brown *et al.* 1999b, 2000, Hoegh-Guldberg y Jones 1999, Lesser *et al.* 2000, Jones y Hoegh-Guldberg 2001, Lesser y Gorbunov 2001, Banaszak *et al.* 2003, Winters *et al.* 2003). Los valores mínimos registrados de la cosecha cuántica con respecto al valor máximo presentaron diferencias promedio de 0.05 de unidad, mientras que otros trabajos informan diferencias superiores del orden de 0.08 a 0.4 de diferencia (Jones y Hoegh-Guldberg 2001, Banaszak *et al.* 2003). Sin embargo, las irradiancias que se registraron en el presente trabajo fueron menores con respecto a los trabajos comparados lo que explica la baja diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la cosecha cuántica. Las mediciones registradas a las 22:00 muestran una reducción en la cosecha cuántica (Fig. 3a) la cual podría tener su origen en la vía de la cloro-respiración como reportan Jones y Hoegh-Guldberg (2001) y R. Iglesias-Prieto y X. Hernández-Pech (Com. Pers.).

Durante el experimento *P. astreoides* presentó valores de F_v/F_m más altos que *D. strigosa* (Tabla 2, Fig. 3) debido a que sus valores de F_m y F_o fueron menores. Durante el ciclo diurno de F_v/F_m la disminución se debió mayormente a la caída de F_m y no a F_o en ambas especies (Fig. 3). Los valores más altos de la cosecha cuántica y de F_m se registraron a las 18:00 y no cerca del amanecer (a las 06:00).

En general en ausencia de radiación ultravioleta (280–400 nm) los dinoflagelados simbioses de los corales *P. astreoides* y *D. strigosa* (Fig. 4) presentaron un incremento en la cosecha cuántica del FSII, en comparación con los que fueron expuestos a todo el espectro solar. La ausencia de UV-B (280-320 nm) provocó un incremento en la cosecha cuántica estadísticamente significativo para *P. astreoides* (Fig. 4a) en todas las horas registradas y sólo a las 06:00 y 22:00 para *D. strigosa* (Fig. 4d). Esto indica que ambos

corales tienen diferente sensibilidad a la UV-A. Lo anterior contrasta con la respuesta obtenida por Fitt y Warner (1995) en *Montastraea annularis* que presentó una disminución de la eficiencia fotoquímica al ser expuesta a UV-A y luz azul mientras que la UV-B casi no la afectó.

El mayor cambio en la cosecha cuántica en ambas especies coincide con las horas de mayor irradiancia tanto de PAR como de RUV (Fig. 4). La cosecha cuántica mejoró en ausencia de UV-A y UV-B en *P. astreoides* 5.56% y en *D. strigosa* 4.57%; en ausencia de UV-B se optimizó 1.79 % y 2.41% respectivamente (Fig. 5). El hecho de que en el tratamiento de ausencia de UVB mejora solo un 2% sugiere un mayor efecto sobre la cosecha cuántica por la luz UVA. Lo anterior se puede explicar debido a que existen en la atmósfera mayor cantidad de fotones de UVA con respecto a UVB.

Al comparar las ETR obtenidas en este experimento para los tres tratamientos con las del trabajo de Ayala-Schiaffino (2000) se muestra que los organismos se encontraban en la fase no limitante por luz. La misma autora consideró la ETR máxima al transporte de electrones que se presentó al exponer a las colonias de *P. astreoides* a 2800 $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en tanto que para *D. strigosa* la ETR máxima se presentó al estar expuesta a $\sim 1850 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Los organismos estuvieron expuestos diariamente de 3 a 5 hrs a una irradiancia mayor que su índice de saturación lumínica (irradiancia a partir de la cual el control de la fotosíntesis pasa de los mecanismos relacionados con la absorción de luz y eficiencia cuántica a los enzimáticos). En *P. astreoides* el $E_k = 159.6 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (A. Rodríguez-Roman, Com. Pers.), mientras que en este experimento la irradiancia máxima promedio dentro de los acuarios varió de 187 a 242.1 $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabla 1).

En el experimento durante la mayor parte de las horas de luz *P. astreoides* estuvo por arriba del punto de compensación $E_c = 86 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, es decir la irradiancia a la cual la fotosíntesis es igual a la respiración. Sólo durante el periodo de irradiancia variable se presentó un día en el que los organismos estuvieron por debajo de este punto. No se tienen datos del E_c y E_k de *D. strigosa*, sin embargo, se trata de un organismo que requiere menos luz puesto que es más abundante a mayor profundidad que *P. astreoides*,

por lo que es probable que sus valores de E_c y E_k sean menores. Savage *et al.* (2002b) midieron los E_k y E_c de dinoflagelados aislados de *P. astreoides* y aunque los dinoflagelados eran del mismo filotipo (A) obtuvieron dos respuestas diferentes ($E_k=170.4$ y $190.6 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; $E_c=35.3$ y $11.2 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). El E_c es varias veces menor en dinoflagelados recién aislados que *in hospite*. Es necesario señalar que la E_c y la E_k dependen de la historia lumínica de los organismos. Lo antes señalado lleva al hecho de que los organismos utilizados en este experimento no se encontraron en condiciones de estrés lumínico por alto PAR, pero el que se encuentren cerca del óptimo de fotosíntesis (E_k) indica que probablemente el efecto observado se debe mayoritariamente a la presencia de UVA y/o UVB. Se ha comprobado que en baja luz bajo condiciones óptimas, la fotoquímica primaria ocurre con alta eficiencia (Krause y Weis 1991), casi todos los cuantos de luz absorbidos son utilizados para fotosíntesis.

Se conoce que la cosecha cuántica del fotosistema II es afectada por los procesos de fotoquímica y de fotoprotección (NPQ) (Niyogi 1999, 2000, Maxwell y Johnson, 2000). El incremento de la cosecha cuántica al eliminar el efecto de la RUV en este trabajo sugiere que puede haber una menor activación de mecanismos de fotoprotección o un incremento en los procesos fotoquímicos. Sin embargo existen otras cosas que se deben considerar.

Los datos de ETR no muestran diferencias significativas entre las tres condiciones espectrales en *P. astreoides* (Fig. 9a) ni en *D. strigosa* (Fig. 9b). Sin embargo, los simbioses sienten menos presión sobre el fotosistema II ($Q_{14:00}$) en ausencia de UV (Fig. 6). Esto sugiere que el incremento en la cosecha cuántica observado podría estar relacionado con los mecanismos de fotoprotección. Los mecanismos fotoprotectores abarcan un grupo de respuestas que incluyen la disipación térmica del exceso de excitación y la operación de un ciclo de reparación del fotosistema II. Los organismos fotosintéticos contienen mecanismos reguladores del aparato fotosintético que participan en la disipación del exceso de energía y protegen contra la fotoinhibición. Q_I implica los mecanismos de síntesis y reparación de los elementos que constituyen el aparato fotosintético y está implicado directamente en proteger a los corales del daño por UV.

Sin embargo, el hecho de que en las curvas de ETR no llegaran a la fase limitante por luz indica que no puede haber fotoinhibición. No obstante lo anterior, algunos autores (Ohad *et al.* 1994, Tyystjärvi y Aro 1996, Karen *et al.* 1997) hablan del síndrome de baja luz (low light syndrome) en el cual a bajas intensidades de luz hay una disminución de la tasa de recambio de D1. Existe una correlación entre la disminución de actividad de PSII y la pérdida de la proteína D1 de la membrana tilacoidal bajo condiciones de baja luz. A baja luz, la fotoinhibición ocurre tan lentamente que inactiva los centros del FSII con la proteína D1 esperando para ser degradada (Tyystjärvi y Aro 1996).

Existe otra posible explicación para los valores menores de la cosecha cuántica en los organismos expuestos a PAR+UVA+UVB en comparación con los otros tratamientos (Fig. 4), por una parte la irradiancia total diaria que recibieron los organismos fue entre 0.58 y 5.91 mol cuanta $m^{-2} d^{-1}$ (Tabla 1) y no llegaron a la fase limitante por luz de acuerdo con las curvas ETR (Fig. 9a y b) y los valores de presión (Fig. 6) fueron bajos en comparación con otros trabajos (Banaszak *et al.* 2003, Iglesias-Prieto *et al.* 2004), esto indica que no existe fotoinhibición (considerada como resultado de exposición a un alto flujo de densidad de fotones). Lo anterior sugiere que los organismos expuestos a UV-B usaron su energía preferentemente en la reparación de otros componentes celulares y mantenimiento metabólico anteponiéndolos a la reparación del FSII y recambio de D1, debido probablemente a que el costo energético es muy alto, ya que el tiempo de vida media de un FS II en *P. astreoides* es de 1.5 hrs (R. Iglesias-Prieto, Com. Pers.). El ciclo de reparación y daño del FS II, básicamente el fotodaño de D1 es seguido por a) un desacople parcial del holocomplejo PSII, b) exposición del núcleo del FS II fotodañado al estroma del cloroplasto, c) degradación del D1 fotodañado, d) síntesis *de novo* de D1 e inserción en la membrana del tilacoide, e) re-ensamblaje del holocomplejo FS II, seguido por la activación del proceso de transporte de electrones a través del heterodímero D1/D2 reconstituído (Aro *et al.* 1993, Melis 1999). Lo anterior requiere de una constante inversión energética, ya que el control de la síntesis de D1 y D2 puede ocurrir en varios pasos de la expresión genética del cloroplasto, incluyendo transcripción, procesamiento de RNA, a nivel de traducción y aún pos-trasduccional (Nickelsen y Rochaix 1994).

Los simbiosntes de ambas especies tienen diferente capacidad para reaccionar al ser expuestos a las mismas condiciones lumínicas cambiando, por ejemplo, la cantidad de pigmentos o su proporción, tal como lo demuestran diferentes autores para dinoflagelados en cultivo (Iglesias-Prieto y Trench 1994, 1997a, 1997b) y células aisladas y en el hospedero básicamente en interacción con otros factores como la temperatura (Ayala-Schiaffino 2000, Bhagooli e Hidaka 2003). Se sabe que no todos los corales son igual de sensibles al estrés ambiental. Los límites de tolerancia difieren entre especies y también difieren dentro de una holosimbiosis (Banaszak *et al.* 2003).

Los datos no muestran cambios estadísticamente significativos en la proporción de pigmentos (Fig. 11b y d) ni en la concentración de clorofilas por célula (Fig. 12a y b). La concentración de Chl *a* y *c2* por célula no difiere significativamente entre los tratamientos (Fig. 12a y b), aunque *P. astreoides* en ausencia de UV presentó un aumento de clorofila por célula. Estudios previos expresan generalmente poca o ausencia de respuesta de la Chl *a* a la RUV alterada experimentalmente (Jokiel y York 1982, Scelfo 1985, Lesser *et al.* 1990, Lesser y Shick 1989a). En tanto que la síntesis de clorofilas *a* y *c2* fue reducida por el efecto de la UV en *Symbiodinium microadriaticum* pero no en *Symbiodinium californium* simbiosntes de *Cassiopeia xamachana* y *Anthopleura elegantissima*, respectivamente (Banaszak y Trench 1995a). En *P. astreoides* hubo disminución en la densidad de clorofila *a* y *c2* (Fig. 10a y b), en tanto que en *D. strigosa* hubo un aumento en los expuestos a UVA y UVB, mientras que los expuestos a PAR no hubo modificaciones (Fig. 10c y d). La condición fisiológica de los dinoflagelados simbiosntes puede ser relacionada con la cantidad de clorofila por célula (Fitt *et al.* 1993). Los cambios en la calidad de la luz también afectan la concentración de los pigmentos accesorios así como la tasa de fotosíntesis (Kinzie y Hunter 1987). La disminución de luz incrementa la concentración de clorofila *a* por célula con el objetivo de obtener más energía luminosa (Hoegh-Guldberg y Smith 1989a, 1989b). Lo contrario, un incremento en la luz produce una menor concentración de clorofila *a*, ocasionado por la fotodegeneración de los pigmentos causada por exposición excesiva a la RUV (Gleason y Wellington 1993, Kinzie 1993).

La mayor variación en la densidad algal en *P. astreoides* se debe a la morfología del esqueleto, sin embargo, se observa una tendencia de decremento con el tiempo en los tres tratamientos. En *D. strigosa* la densidad de simbiontes en los organismos expuestos solo a PAR fue diferente de los que contenían todo el espectro. Se ha reportado que la RUV disminuye la densidad de simbiontes y su índice mitótico, no solo en corales sino en otros cnidarios (Lesser y Shick 1989b, Lesser *et al.* 1990). Sin embargo, la densidad algal también presenta fluctuaciones en respuesta a la época del año (estacionalidad) en corales tanto del pacífico, *Pocillopora damicornis* (Stimson 1997), *Coeloseris mayeri*, *Goniastrea retiformis*, *G. aspera* y *Porites lutea* (Brown *et al.* 1999a), como del atlántico, *Acropora palmata*, *A. cervicornis*, *Montastraea faveolata* y *M. annularis* (Fitt *et al.* 2000).

El índice mitótico (IM) fue diferente entre ambas especies y además fue muy variable dentro de las dos especies (Fig. 13c y d). La presencia de UVB ocasionó un aumento en el IM de *P. astreoides* y *D. strigosa*. En *P. astreoides* de diferente morfos (verde y café) Gleason (1993) encontró que la UV causaba una fotoinhibición del índice mitótico en morfos cafés, y no tenía efecto en los morfos verdes, el índice mitótico variaba entre 0.5 - 1.5% en los primeros y 1.0 - 1.25% en los segundos. Mientras que en otras especies de corales como *Stylophora pistillata* y *Acropora* sp. (Shick *et al.* 1999) el índice mitótico aumentó en presencia de UV. Los cambios en el índice mitótico pueden deberse a diferentes factores como son: disponibilidad de nutrientes, hora del día, estación del año.

En *P. astreoides* aunque la tendencia fue disminuir la densidad celular, el tamaño promedio de las células aumentó, mientras que el índice mitótico no sufrió cambios significativos. Debido a que el incremento fue en las tres condiciones espectrales no se puede atribuir al efecto de la UV. Se ha observado que el volumen y diámetro celular de los simbiontes puede variar en respuesta a factores como irradiancia, estación del año, nutrientes, etc. En dinoflagelados de *Cassiopeia xamachana* y *Anthopleura elegantissima* no se observaron cambios en el tamaño debido a la exposición a UV. En simbiontes de *Cassiopeia xamachana* Verde y McCloskey (1998) encontraron que el volumen y diámetro celular del simbionte eran mayores en enero que en septiembre. En

corales del Indo-Pacífico se encontraron cambios estacionales en el volumen de los dinoflagelados en tres de los cuatro corales estudiados (Brown *et al.* 1999a).

El efecto de los tratamientos en la densidad de los simbiontes, su tamaño o en su contenido de clorofila aunque no sea estadísticamente significativo, evidencia las tendencias que se presentan en los organismos en respuesta a las condiciones espectrales.

Un mecanismo de fotoprotección específico para RUV que se analizó en este estudio fue la presencia de MAAs tanto en el holobionte (tejido intacto) como en el dinoflagelado aislado. Detectándose primero la presencia de MAAs en los simbiontes aislado y en el tejido de ambas especies. Se determinaron los cambios debido a los tratamientos espectrales a través de tres diferentes tiempos.

Los espectros de absorción del tejido intacto de *P. astreoides* presentaron una mayor absorbancia en el pico de MAAs con respecto a los de *D. strigosa* (Fig. 14c). En este estudio se encontró que simbiontes de *D. strigosa* presumiblemente de clade B o C presentaron picos de absorción de MAAs al estar en relación simbiótica (Fig. 14a, b y 16). Aunque Banaszak *et al.* (2000) no muestran síntesis de MAAs para las clades B y C en cultivo, puntualizaron que la ausencia fenotípica de síntesis de MAA no indicaba una pérdida de la vía Shikimate en las algas que no sintetizaban MAAs. Existen varias posibles explicaciones para la presencia de MAAs tanto en los simbiontes como en el holosimbionte de *D. strigosa*. El hecho de que los dinoflagelados en cultivo presenten diferentes fotosintetatos (Stochaj y Grossman 1997) y expresión de proteínas de los que se encuentran *in hospite* (Sutton y Hoegh-Guldberg 1990) es evidencia de que el hospedero modifica la bioquímica del endosimbionte. De tal manera que es posible que los dinoflagelados sinteticen MAAs al estar dentro de su hospedero, si este proporciona algún estímulo o sustrato (Banaszak *et al.* 2000). Esto podría ser comprobado agregándole a cultivos de dinoflagelados de filotipos B y C un homogenizado de tejido de su hospedero con el fin de determinar si el hospedero es el que activa la síntesis de MAAs. Shick (2004) realizó un ensayo agregándole homogenizado de tejido coralino a dinoflagelados de *Stylophora pistillata* en cultivo, y no encontró evidencia de que la

producción de MAAs fuera cualitativamente afectada, sin embargo, no presenta datos ni explica las condiciones bajo las cuales el ensayo fue realizado.

Podría ser que los dinoflagelados sinteticen precursores que transfieran al hospedero donde puedan ser transformados a MAAs ya sea por el mismo hospedero o bien por la acción de bacterias (Shick *et al.* 1999) ó bien que el hospedero adquiera por dieta las MAAs (Banaszak y Trench 1995b, Carroll y Shick 1996, Newman *et al.* 2000) y éstas por difusión pasen a los dinoflagelados. Esto último es poco probable ya que Banaszak y Trench (1995b) no encontraron evidencia de MAAs en los dinoflagelados recién aislados ni en cultivo. Otra posible explicación es que en *D. strigosa* también existieran simbioses de clade A y que se tratara de poblaciones muy pequeñas, no representativas y no detectables al hacer un análisis genético. La mayoría de los corales contienen solo un tipo de simbiote perceptible (LaJeunesse 2002), sin embargo existe evidencia de que algunos cultivos de dinoflagelados simbioses no corresponden con los filotipos de los dinoflagelados recién aislados del hospedero (Carlos *et al.* 2000, Santos *et al.* 2001, LaJeunesse 2002, Savage *et al.* 2002a, 2002b). Una respuesta probable es que existan simbioses a bajas y presuntamente concentraciones indetectables en el hospedero que son favorecidos por el medio de cultivo artificial al ser aislados, tal como sucede en algunos bivalvos simbióticos (Carlos *et al.* 2000). En un individuo de *Cassiopeia xamachana* de la laguna de Cancún, LaJeunesse (2002) encontró simbioses de filotipos A1, A3 y C1, sin embargo, existen pocos casos de hospedero con más de un filotipo de simbiote (Rowan *et al.* 1997, Rowan 1998, Carlos *et al.* 2000, LaJeunesse 2002, LaJeunesse *et al.* 2003). No obstante, hasta el momento, solo han sido reportados colonias de *D. strigosa* únicamente con clade B o bien C (Baker y Rowan 1997, LaJeunesse 2002).

Con base en lo anterior, se puede especular, que posiblemente las MAAs que se encuentran en *D. strigosa* hayan sido adquiridos por el consumo de alimento y que sus simbioses los adquieren absorbiéndolos del hospedero, en tanto que en *P. astreoides* podría suceder lo contrario, los simbioses sintetizan las MAAs y las transfieren al hospedero.

El holosimbionte presentó un pico de absorción de MAAs un orden de magnitud mayor que el del dinoflagelado aislado (Fig. 15 y 16). Lo anterior sugiere, aún cuando no se realizó una cuantificación e identificación de MAAs, que la concentración de MAAs es mayor en el hospedero que en el simbiote. Existen trabajos en los que se han evaluado ambos y se ha observado mayor concentración en el hospedero que en el simbiotes, por ejemplo, el coral *Acropora microphthalma* (Shick *et al.* 1995), y la anémona *Anthopleura elegantissima* (Stochaj *et al.* 1994).

También se han reportado incrementos de la concentración de MAAs en corales y otros cnidarios en respuesta a la exposición a RUV (Jokiel y York 1982, Gleason y Wellington 1993, 1995, Banaszak y Trench 1995b, Kuffner 2001b, Shick *et al.* 1995, 1999, Jokiel *et al.* 1997). Aún cuando los espectros de absorción de los extractos metanólicos del holosimbionte presentaron cambios tanto en la absorbancia como en la longitud de máxima absorbancia, el análisis de los espectros no muestra cambios estadísticamente significativos en el espectro que sugieran modificaciones sustanciales en las concentraciones de MAAs a lo largo del tiempo. En la figura 15 se observan los cambios en cada tratamiento con respecto al tiempo en los espectros de absorción de los extractos metanólicos del tejido intacto de *D. strigosa* y *P. astreoides*, la absorbancia se normalizo considerando la dilución y al área de muestra extraída (cm²). Estudios realizados por Scelfo (1985) Stochaj *et al.* (1994) y Banaszak y Trench (1995b) en dos cnidarios no encontraron incrementos en la concentración de MAAs en respuesta a la exposición a largo plazo a RUV, lo que coincide con lo encontrado en este trabajo. En el dinoflagelado *S. microadriaticum* en cultivo (Banaszak y Trench 1995b) observaron que al inicio la concentración de MAAs aumentaba y posteriormente se nivelaba. En tanto que en *Stylophora pistillata* la concentración de MAAs se incrementaba rápidamente al principio para estabilizarse en los días 14 a 28 del experimento (Shick 2004).

No solo la RUV afecta la presencia de MAAs en los corales, existen otros factores reportados que alteran la concentración. El flujo de agua, es uno de estos factores que, en este experimento, se controló mediante la aplicación de un flujo constante en los corales dentro de los acuarios y la disposición de los tratamientos se realizó para evitar

el efecto de orilla, por lo que los cambios en los picos de absorbancia de MAAs en *D. strigosa* no pueden atribuirse al flujo. Jokiel *et al.* (1997) y Kuffner (2001b) encontraron que la concentración de MAAs en *P. damicornis* y *P. compressa* expuestos a RUV era modificada por el flujo de agua, incrementándose y después disminuyendo a los niveles iniciales en flujo alto de agua y aumentando constantemente en flujo bajo.

En el caso de *D. strigosa* en el que se observó un decremento en el pico de absorción de MAAs en los organismos expuestos a todo el espectro solar en función del tiempo, no hubo una disminución en la densidad de simbioses (Fig. 13b), además el pico de los espectros de los simbioses no sufrió cambios significativos debidos al tratamiento o al tiempo (Fig. 16b, d y f). Una posible explicación para la disminución del pico de absorción de MAAs en el tejido de *D. strigosa* expuesta a solo PAR es el que al no necesitarse estos compuestos para fotoprotección y debido a su alto contenido de nitrógeno, sean utilizados para llevar a cabo otras funciones metabólicas del coral. Se ha comprobado, en cultivos bajo limitación de nitrógeno del dinoflagelado de vida libre *Akashiwo sanguinea* (= *Gymnodinium sanguineum*) una disminución de casi 6 veces en la concentración celular de MAAs (Litchman *et al.* 2002).

Otra explicación para la ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos puede ser que debido a la transmitancia del filtro de acrílico los organismos expuestos a UVA recibieron un 20% más de dosis de PAR que los expuestos a UVB.

En este estudio se obtuvo la máxima absorción de *P. astreoides* (holosimbionte) de 328 a 330 nm. Esto es similar a los resultados de Corredor y colaboradores (2000) quienes trabajando con la misma especie reportan un pico máximo de absorción de MAAs a 328 nm. Ello aún cuando el solvente utilizado fue diferente, los aquí presentados fueron realizados con metanol:agua (80:20, V:V) y ellos utilizaron una extracción de metanol-tetrahidrofurano (80:20, V:V). Sin embargo las pruebas de eficiencia de extracción permitieron determinar que el mejor protocolo al emplear muestras congeladas era usar como solvente la combinación de metanol:agua (Tablas 3a y b) el cual daba mejores resultados que metanol:THF (80:20). No existen reportes de los espectros de absorción de MAAs para *D. strigosa*. En los espectros del tejido de *D.*

strigosa, se aprecia un hombro entre 300 y 320 nm, en el tratamiento de UVB se observa un pico en ese intervalo, los picos de los espectros de absorción de *D. strigosa* se obtuvieron con la 2a derivada.

El hecho de que exista una disminución de la eficiencia de separación de carga en *P. astreoides* y *D. strigosa* expuestos a PAR+UVA y a todo el espectro solar, bajo condiciones de irradiancia no saturante puede indicar que el organismo está usando las reservas energéticas que utiliza para la reparación del FS II hacia otros lados como es la reparación de otros componentes celulares. Por lo que es probable que la presencia de MAAs no sea suficiente para contrarrestar el daño por radiación ultravioleta en estos corales.

La sensibilidad de los organismos a la radiación UV depende de varios factores, tales como la irradiancia a la que han estado expuestos, el estado fisiológico y diferencias interespecíficas e intraespecíficas. De modo general la tolerancia que muestra cualquier organismo está relacionada con el número y la eficiencia de los sistemas de reparación, así como con la existencia de estrategias para evitarla (reducción de la exposición por medio de barreras físicas o compuestos que absorben radiación UV, o por mecanismos fisiológicos que pueden reconocer y reparar el daño).

CONCLUSIONES

La radiación ultravioleta afectó a los corales disminuyendo la eficiencia fotoquímica del FSII de *Diploria strigosa* y *Porites astreoides*.

Diploria strigosa presentó valores de eficiencia fotoquímica significativamente menores que *P. astreoides*.

La caída de la cosecha cuántica y la presión sobre el FSII a las 14:00 presentan un comportamiento similar en ambas especies, *D. strigosa* presenta valores más altos que *P. astreoides*.

Los simbioses de ambos corales responden a una exposición casi constante con una disminución de la cosecha cuántica máxima a través del tiempo y con un aumento en la presión a las 14:00. En ambos corales los organismos que estuvieron expuestos a PAR+UVA+UVB respondieron disminuyendo más que los expuestos solo a PAR.

Los datos de ETR y la irradiancia muestran que los organismos nunca estuvieron saturados por luz.

Debido a que no existen cambios en la ETR atribuibles a los tratamientos y que en ninguno de ellos llegó a la fase limitante por luz se sugiere que la reducción de la cosecha cuántica del FSII en los organismos expuestos a todo el espectro solar puede deberse a que los organismos desviaron preferentemente su presupuesto energético a reparar los daños ocasionados por la UV-B en otros procesos metabólicos que a la reparación del fotosistema II.

En ambas especies no hubo cambios estadísticamente significativos en la proporción de pigmentos ni en la concentración de clorofilas por célula.

El índice mitótico de ambas especies fue muy variable entre y dentro de las dos especies y no mostró una relación con la condición espectral.

El efecto de los tratamientos en la densidad de los simbioses, su tamaño o en su contenido de clorofila aunque no sean estadísticamente significativos, evidencia las

tendencias que se presentan en los organismos en respuesta a las condiciones espectrales.

P. astreoides presentó un pico de absorción de micosporinas parecidas a aminoácidos (MAAs) más alto que el de *D. strigosa*.

El tejido y los simbiontes recién aislados de *P. astreoides* presentaron un pico de absorción de MAAs que no presentó cambios significativos a través del tiempo o por el tratamiento.

Tanto el tejido como los simbiontes recién aislados de *D. strigosa* presentaron picos de absorción de MAAs.

El pico de absorción de MAAs de los simbiontes recién aislados de *D. strigosa* no mostró cambios significativos debido al tratamiento o al tiempo de exposición.

En el tejido de *D. strigosa* expuesto a PAR y PAR+UVA se observó una disminución en el pico de absorción de MAAs con el tiempo.

El nivel de fotoprotección es más alto en *P. astreoides* que en *D. strigosa*, no obstante, la presencia de MAAs en estos corales bajo las condiciones experimentales parece no fue suficiente para proteger a los simbiontes de los efectos de la radiación ultravioleta en la eficiencia fotoquímica.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson, S., R. Zepp, J. Machula, D. Santavy, L. Hansen y E. Mueller. 2001. Indicators of UV exposure in corals and their relevance to global climate change and coral bleaching. *Human Ecol. Risk Assess.* 7(5):1271-1282.
- Aro, E.-M., I. Virgin y B. Andersson. 1993. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143:113-134.
- Ayala-Schiaffino, B. N. 2000. Variaciones interespecíficas en la sensibilidad térmica de dinoflagelados simbioses de invertebrados y su relación con el blanqueamiento de coral. Tesis de Maestría en Ciencias del Mar (Oceanografía Química). UACPyP-UNAM. México. 100pp.
- Baker, A. C. 1995. Solar UV-A inhibition of planula larvae in the reef-building coral *Pocillopora damicornis*. *En: Ultraviolet Radiation and Coral Reefs*. Gulko, D. y P. L. Jokiel (eds). Hawai'i Inst. Mar. Biol. Tech. Rep. 41. Univ. of Hawai'i, Honolulu. Pp. 149-163.
- Baker, A. C. y R. Rowan. 1997. Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and eastern Pacific. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.* 2:1302-1306.
- Baker, K. S., R. C. Smith y A. E. S. Green. 1980. Middle ultraviolet radiation reaching the ocean surface. *Photochem. Photobiol.* 32:367-374.
- Banaszak, A. T. 2003. Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. *En: Comprehensive series in photochemistry and photobiology. Vol 1. UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. Helbling, E. W. y H. Zagarese (eds). Royal Society of Chemistry. pp. 329-356.
- Banaszak, A. T. y P. J. Neale. 2001. Ultraviolet radiation sensitivity of photosynthesis in phytoplankton from an estuarine environment. *Limnol. Oceanogr.* 46(3):592-603.
- Banaszak, A. T. y R. K. Trench. 1995a. Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. I. Response of the algal symbionts in culture and *in hospite*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194:213-232.
- Banaszak, A. T. y R. K. Trench. 1995b. Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194:233-250.
- Banaszak, A. T. y R. K. Trench. 2001. Ultraviolet sunscreens in dinoflagellates. *Protist* 152:93-101.

- Banaszak, A. T., M. P. Lesser, I. B. Kuffner y M. Ondrusek. 1998. Relationship between ultraviolet (UV) radiation and mycosporine-like amino acids (MAAs) in marine organisms. *Bull. Mar. Sci.* **63**(3):617-628.
- Banaszak, A. T., T. C. LaJeunesse y R. K. Trench. 2000. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **249**(2):219-233.
- Banaszak, A. T., B. N. Ayala-Schiaffino, A. Rodríguez-Román, S. Enríquez y R. Iglesias-Prieto. 2003. Response of *Millepora alcicornis* (Milleporina: Milleporidae) to two bleaching events at Puerto Morelos reef, Mexican Caribbean. *Rev. Biol. Trop.* **51**(S4):57-66.
- Bandaranayake, W. M. 1998. Mycosporines: are they nature's sunscreens? *Nat. Prod. Rep.* **15**:159-172.
- Beer S., M. Ilan, A. Eshel, A. Weil. e I. Brickner. 1998. Use of pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry for in situ measurements of photosynthesis in two Red Sea faviid corals. *Mar. Biol.* **131**:607-612.
- Behrenfeld, M. J., J. T. Hardy y H. Lee II. 1992. Chronic effects of ultraviolet-B radiation on growth and cell volume of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **28**:757-760.
- Bentley, R. 1990. The Shikimate Pathway – a metabolic tree with many branches. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **25**(5):307-384.
- Bhagooli, R. y M. Hidaka. 2003. Comparison of stress susceptibility of *in hospite* and isolated zooxanthellate among five coral species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **291**:181-197.
- Bothwell, M. L., D. M. J. Sherbot, C. M. Pollock. 1994. Ecosystem response to solar ultraviolet-B radiation: Influence of trophic-level interactions. *Science* **265**:97-100.
- Brown, B. E. 1997. Coral Bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs.* **16** (Suppl):S129-S138.
- Brown, B. E., M. D. A. Le Tissier y J. C. Bythell. 1995. Mechanisms of bleaching deduced from histological studies of reef corals sampled during a natural bleaching event. *Mar. Biol.* **122**:655-663.
- Brown, B. E., R. P. Dunne, I. Ambarsari, M. D. A. Le Tissier y U. Satapoomin. 1999a. Seasonal fluctuations in environmental factors and variations in symbiotic algae and chlorophyll pigments in four Indo-Pacific coral species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **191**:53-69.

- Brown, B. E., I. Ambarsari, M. E. Warner, W. K. Fitt, R. P. Dunne, S. W. Gibb y D. G. Cummings. 1999b. Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs* **18**:99-105.
- Brown, B. E., R. P. Dunne, M. E. Warner, I. Ambarsari, W. K. Fitt, S. W. Gibb y D. G. Cummings. 2000. Damage and recovery of photosystem II during a manipulative field experiment on solar bleaching in the coral *Goniastrea aspera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **195**:117-124.
- Carefoot, T. H., D. Karentz, S. C. Pennings y C. L. Young. 2000. Distribution of mycosporine-like amino acids in the sea hare *Aplysia dactylomela*: Effect of diet on amounts and types sequestered over time in tissues and spawn. *Comp. Biochem. Physiol.* **126C**:91-104.
- Carlos, A. A., B. K. Baillie y T. Maruyama. 2000. Diversity of dinoflagellate symbionts (zooxanthellae) in a host individual. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **195**:93-100.
- Carroll, A. K. y J. M. Shick. 1996. Dietary accumulation of UV-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) by the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). *Mar. Biol.* **124**:561-569.
- Conde, F. R., M. S. Churio, C. M. Previtali. 2000. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyrin-334 in aqueous solution. *J. Photochem Photobiol. B* **56**:139-144.
- Corredor, J. E., A. W. Bruckner, F. Z. Muszynski, R. A. Armstrong, R. García y J. M. Morell. 2000. UV-absorbing compounds in three species of Caribbean zooxanthellate corals: Depth distribution and spectral response. *Bull. Mar. Sci.* **67**(2):821-830.
- Cullen, J. J. y P. Neale. 1994. Ultraviolet radiation, ozone depletion and marine photosynthesis. *Photosynth. Res.* **39**:303-320.
- Chalker, B. E. y W. C. Dunlap. 1981. Extraction and quantitation of endosymbiotic algal pigments from reef-building corals. *Proc. 4th Int. Coral Reef Symp. Manila.* **2**:45-50.
- Díaz, S., G. Deferrari, D. Martinioni, A. Oberto. 2000a. Regression analysis of biologically effective integrated irradiances versus ozone, clouds and geometric factors. *J. Atmos. Sol. Terr. Phys.* **62**:629-638
- Díaz, S. B., J. H. Morrow y C. R. Booth. 2000b. UV physics and optics. *In: The effects of UV radiation in the marine environment.* De Mora, S., S. Demers y M. Vernet (eds). Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido. Pp 35-71.

- Drollet, J. H., T. Teai, M. Faucon y P. M. V. Martin. 1997. Field study of compensatory changes in UV-absorbing compounds in the mucus of the solitary coral *Fungia repanda* (Scleractinia: Fungiidae) in relation to solar UV radiation, sea-water temperature, and other coincident physico-chemical parameters. *Mar. Freshwater Res.* **48**:329-333.
- Dunlap, W. C., y B. E. Chalker. 1986. Identification and quantitation of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian. *Coral Reefs* **5**:155-159.
- Dunlap, W. y J. M. Shick. 1998. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J. Phycol.* **34**(3):418-430.
- Dunlap W. y Y. Yamamoto. 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comp. Biochem. Physiol.* **112B**:105-114.
- Dunlap, W. C., B. E. Chalker y J. K. Oliver. 1986. Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia. III. UV-B absorbing compounds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **104**:239-248.
- Dunlap, W. C., B. E. Chalker y W. M. Bandaranayake. 1988. Ultraviolet light absorbing agents derived from tropical marine organisms of the Great Barrier Reef, Australia. *Proc. 6th Int. Coral Reef Symp. Australia.* **3**:89-93.
- Dunlap, W., J. M. Shick e Y. Yamamoto. 1999. Sunscreens, oxidative stress and antioxidant functions in marine organisms of the Great Barrier Reef. *Redox Report* **4**(6):301-306.
- Falkowski, P. G. y J. A. Raven. 1997. *Aquatic Photosynthesis.* Blackwell Scientific. EUA. 375pp.
- Favre-Bonvin, J., J. Bernillon, N. Salin y N. Arpin. 1987. Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry* **26**:2509-2514.
- Fitt, W. K. y M. E. Warner. 1995. Bleaching patterns of four species of Caribbean reef corals. *Biol. Bull.* **189**:298-307.
- Fitt, W. K., H. J. Spero, J. Halas, M. W. White y J. W. Porter 1993. Recovery of the coral *Montastrea annularis* in the Florida Keys after the 1987 Caribbean "bleaching event". *Coral Reefs* **12**: 57-64.
- Fitt, W. K., F. K. McFarland, M. E. Warner y G. C. Chilcoat. 2000. Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol. Oceanogr.* **45**(3):677-685.

- Fitt, W. K., B. E. Brown, M. E. Warner y R. P. Dunne. 2001. Coral Bleaching: interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals. *Coral Reefs* **20**:51-65.
- Genty, B., J.-M. Briantais, y N. R. Baker. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **990**:87-92.
- Gleason, D. F. 1993. Differential effects of ultraviolet radiation on green and brown morphs of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *Limnol. Oceanogr.* **38**(7):1452-1463.
- Gleason, D. F. y G. M. Wellington. 1993. Ultraviolet radiation and coral bleaching. *Nature* **365**:836-838.
- Gleason, D. F. y G. M. Wellington. 1995. Variation in UVB sensitivity of planula larvae of the coral *Agaricia agaricites* along a depth gradient. *Mar. Biol.* **123**:693-703.
- Gorbunov, M. Y., Z. S. Kolber, M. P. Lesser y P. G. Falkowski. 2001. Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals. *Limnol. Oceanogr.* **46**(1):75-85.
- Greenberg, B. M., V. Gaba, O. Canaani, S. Malkin, A. K. Mattoo y M. Edelman. 1989. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction center protein in the visible and UV spectral regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6617-6620.
- Helbling, E. W., V. Villafañe, M. Ferrario y O. Holm-Hansen. 1992. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **80**:89-100.
- Hoegh-Guldberg, O. y R. J. Jones. 1999. Photoinhibition and photoprotection in symbiotic dinoflagellates from reef-building corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **183**:73-86.
- Hoegh-Guldberg, O. y B. Salvat. 1995. Periodic mass-bleaching and elevated sea temperatures: bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French Polynesia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **121**:181-190.
- Hoegh-Guldberg, O. y G. J. Smith. 1989a. Influence of the population density of zooxanthellae and supply of ammonium on the biomass and metabolic characteristics of the reef corals *Seriatopora hystrix* and *Stylophora pistillata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **57**: 173-186.
- Hoegh-Guldberg, O. y G. J. Smith. 1989b. The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the

- reef corals *Stylophora pistillata* Esper and *Seriatopora hystrix* Dana. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **129**: 279-303.
- Iglesias-Prieto, R. y R. K. Trench. 1994. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. Mar. Ecol. Prog. Ser. **113**:163-175.
- Iglesias-Prieto, R. y R. K. Trench. 1997a. Photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses. Proc. 8th Int. Coral Reef Symp. **2**:1319-1324.
- Iglesias-Prieto, R. y R. K. Trench. 1997b. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. Mar. Biol. **130**:23-33.
- Iglesias-Prieto, R., J. L. Matta, W. A. Robins y R. K. Trench. 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**:10302-10305.
- Iglesias-Prieto, R., V. H. Beltrán, T. C. LaJeunesse, H. Reyes-Bonilla y P. E. Thomé, 2004. Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern pacific. Proc. R. Soc. Lond. B. **271**:1757-1763.
- Jeffrey, S. W. y G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. Biochem. Physiol. Pfl. **167**:191-194.
- Jokiel, P. L. 1980. Solar ultraviolet radiation and coral reef epifauna. Science **207**:1069-1071.
- Jokiel, P. L. y R. H. York Jr. 1982. Solar ultraviolet photobiology of the reef coral *Pocillopora damicornis* and symbiotic zooxanthellae. Bull. Mar. Sci. **32**(1):301-315.
- Jokiel, P. L. y R. H. York Jr. 1984. Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. Limnol. Oceanogr. **29**(1):192-199.
- Jokiel, P. L., M. P. Lesser y M. E. Ondrusek. 1997. UV-absorbing compounds in the coral *Pocillopora damicornis*: interactive effects of UV radiation, photosynthetically active radiation and water flow. Limnol. Oceanogr. **42**(6):1468-1473.
- Jones L. W. y B. Kok. 1966. Photoinhibition of chloroplast reactions. I. Kinetics and action spectra. Plant Physiol. **41**:1037-1043.

- Jones, R. J. y O. Hoegh-Guldberg. 2001. Diurnal changes in the photochemical efficiency of the symbiotic dinoflagellates (Dinophyceae) of corals: photoprotection, photoinactivation and the relationship to coral bleaching. *Plant Cell Environ.* **24**:89-99.
- Kinzie R. A. III. 1993. Effects of ambient levels of solar ultraviolet radiation on zooxanthellae and photosynthesis of the reef coral *Montipora verrucosa*. *Mar. Biol.* **116**:319-327.
- Kinzie, R. A. III y T. Hunter. 1987. Effect of light quality on photosynthesis of the reef coral *Montipora verrucosa*. *Mar. Biol.* **94**: 95-109.
- Kirk, J. T. O. 1994. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. 2nd ed. Cambridge University Press. Reino Unido. 509 pp.
- Krause, G. H. y E. Weis. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**:313-349.
- Kuffner, I. B., M. E. Ondrusek y M. P. Lesser. 1995. Distribution of mycosporine-like amino acids in the tissues of Hawaiian Scleractinia: A depth profile. *En: Ultraviolet Radiation and Coral Reefs*. Gulko, D. y P. L. Jokiel (eds). Hawai'i Inst. Mar. Biol. Tech. Rep. 41. Univ. of Hawai'i, Honolulu. Pp 77-85.
- Kuffner, I. B. 2001a. Effects of ultraviolet (UV) radiation on larval settlement of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **217**:251-261.
- Kuffner, I. B. 2001b. Effects of ultraviolet radiation and water motion on the reef coral *Porites compressa* Dana: a flume experiment. *Mar. Biol.* **138**:467-476.
- Kühl, M., Y. Cohen, T. Dalsgaard, B. B. Jørgensen y N. P. Revsbech. 1995. Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied with microsensors for O₂, pH and light. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **117**:159-172.
- LaJeunesse, T. C. 2001. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: In search of a "species" level marker. *J. Phycol.* **37**(5):866-880.
- LaJeunesse, T. C. 2002. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Mar. Biol.* **141**:387-400.
- LaJeunesse, T. C., W. K. W. Loh, R. van Woesik, O. Hoegh-Guldberg, G. W. Schmidt y W. K. Fitt. 2003. Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those of the Caribbean. *Limnol. Oceanogr.* **48**(5):2046-2054.

- Lesser, M. P. 1996. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* **41**(2):271-283.
- Lesser, M. P. 2000. Depth-dependent photoacclimatization to solar ultraviolet radiation in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **192**: 137-151.
- Lesser, M. P. y M. Y. Gorbunov. 2001. Diurnal and bathymetric changes in chlorophyll fluorescence yields of reef corals measured *in situ* with a fast repetition rate fluorometer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **212**:69-77.
- Lesser, M. P. y S. Lewis. 1996. Action spectrum for the effects of UV radiation on photosynthesis in the hermatypic coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **134**: 171-177.
- Lesser, M. P. y J. M. Shick. 1989a. Effects of irradiance and ultraviolet radiation on photoadaptation in the zooxanthellae of *Aiptasia pallida*: primary production, photoinhibition, and enzymic defenses against oxygen toxicity. *Mar. Biol.* **102**:243-255.
- Lesser, M. P. y J. M. Shick. 1989b. Photoadaptation and defenses against oxygen toxicity in zooxanthellae from natural populations of symbiotic cnidarians. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **134**:129-141.
- Lesser, M. P. y J. M. Shick. 1990. Effects of visible and ultraviolet radiation on the ultrastructure of zooxanthellae (*Symbiodinium* sp.) in culture and in situ. *Cell Tissue Res.* **261**:501-508.
- Lesser, M. P., W. R. Stochaj, D. W. Tapley y J. M. Shick. 1990. Bleaching in coral reef anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs.* **8**:225-232.
- Lesser, M. P., C. Mazel, D. Phinney y C. S. Yentsch. 2000. Light absorption and utilization by colonies of the congeneric hermatypic corals *Montastraea faveolata* and *Montastraea cavernosa*. *Limnol. Oceanogr.* **45**(1):76-86.
- Litchman, E. P.J. Neale y A. T. Banaszak. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: Photoprotection and repair. *Limnol. Oceanogr.* **47**(1):86-94.
- Mason, D. S., F. Schafer, J. M. Shick y W. C. Dunlap. 1998. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (*Oryzias latipes*) but not by SKH-1 hairless mice. *Comp. Biochem. Physiol.* **120A**:587-598.

- Masuda, K., M. Goto, T. Maruyama y S. Miyachi. 1993. Adaptation of solitary corals and their zooxanthellae to low light and UV radiation. *Mar. Biol.* **117**:685-691.
- Maxwell, K. y G. N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**(345):659-668.
- Melis, A. 1999. Photosystem II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*. *Trends Plant Sci.* **4**(4):130-135.
- Michalek-Wagner, K. 2001. Seasonal and sex-specific variations in levels of photo-protecting mycosporine-like amino acids (MAAs) in soft corals. *Mar. Biol.* **139**:651-660.
- Muscatine, L. 1987. Bioenergetics of reef-building corals. In: *Biology of benthic marine organisms. Techniques and methods as applied to the Indian ocean.* Thompson, M. F. *et al.* (eds.). A. A. Balkema. India. 608pp.
- Muscatine, L., L. R. McCloskey y R. E. Marian. 1981. Estimating daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol. Oceanogr.* **26**:601-611.
- Muszynski, F. Z. A. Bruckner, R. A. Armstrong, J. M. Morell, y J. E. Corredor. 1998. Within-colony variations of UV absorption in a reef building coral. *Bull. Mar. Sci.* **63**(3):589-594.
- Neale, P., A. T. Banaszak, C. R. Jarriel. 1998. Ultraviolet sunscreens in *Gymnodinium sanguineum* (Dinophyceae): Mycosporine-like amino acids protect against inhibition of photosynthesis. *J. Phycol.* **34**:928-938.
- Newman, S. J., W. C. Dunlap, S. Nicol y D. Ritz. 2000. Antarctic krill (*Euphausia superba*) acquire a UV-absorbing mycosporine-like amino acid from dietary algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **255**:93-110.
- Nickelsen J. y J. D. Rochaix. 1994. Regulation of the synthesis of D1 and D2 proteins of photosystem II. In: *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field.* (Baker, N. R e I. R. Bowyer (eds). BIOS Scientific Publishers. Oxford, R. U. pp. 179-193.
- Niyogi, K. K. 1999. Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**:333-359.
- Niyogi, K. K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opinion Plant Biol.* **3**:455-460.
- Ohad, I., N. Keren, H. Zer, H. Gong, T. S. Mor, A. Gal, S. Tal y Y. Domovich. 1994. Light-induced degradation of the photosystem II reaction centre D1 protein *in*

- vivo*: an integrative approach. In: Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field. (Baker, N. R e I. R. Bowyer (eds). BIOS Scientific Publishers. Oxford, R. U. pp 161-177.
- Ralph, P. J., R. Gademann, A. W. D. Larkum y U. Schreiber. 1999. *In situ* underwater measurements of photosynthetic activity of coral zooxanthellae and other reef-dwelling dinoflagellate endosymbionts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **180**:139-147.
- Ralph, P. J., R. Gademann, A. W. D. Larkum y M. Kühl. 2002. Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues. *Mar. Biol.* **141**:639-646.
- Renger, G., Völker, M., Eckert, H. J., Fromme, R., Hohm-Veit, S. y P. Gräber. 1986a. On the mechanism of photosystem II deterioration by UV-B irradiation. *Photochem. Photobiol.* **49**:97-105.
- Renger, G., M. Voss, P. Gräber y A. Schulze. 1986b. Effect of UV irradiation on different partial reactions of the primary processes of photosynthesis. NATO ASI Series. Vol. G8. Stratospheric ozone reduction, solar ultraviolet radiation and plant life. R. C. Worrest y M. M. Caldwell (eds.) Springer-Verlag. Berlin. Pp.171-184.
- Rowan, R. 1998. Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J. Phycol.* **34**:407-417.
- Rowan, R. y D. A. Powers. 1991. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science* **251**:1348-1351.
- Rowan, R., N. Knowlton, A. Baker y J. Jara. 1997. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature* **388**:265-269.
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimization of UV-induced damage. In: The Effects of UV Radiation in the Marine Environment. De Mora, S., S. Demers y M. Vernet (eds). Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido. Pp. 177-205.
- Santos, S. R., D. J. Taylor, M. A. Coffroth. 2001. Genetic comparisons of freshly isolated versus cultured symbiotic dinoflagellates: Implications for extrapolating to the intact symbiosis. *J. Phycol.* **37**:900-912.
- Savage, A. M., M. S. Goodson, S. Visram, H. Trapido-Rosenthal, J. Wiedenmann y A. E. Douglas. 2002a. Molecular diversity of symbiotic algae at the latitudinal margins of their distribution: dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* in corals and sea anemones. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **244**:17-26.
- Savage, A. M., H. Trapido-Rosenthal y A. E. Douglas. 2002b. On the functional significance of molecular variation in *Symbiodinium*, the symbiotic algae of Cnidaria: photosynthetic response to irradiance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **244**:27-37

- Scelfo, G. 1985. The effects of visible and ultraviolet solar radiation on a UV-absorbing compound and chlorophyll *a* in a Hawaiian zoanthid. Proc. 5th Int. Coral Reef Cong. Tahiti. **6**:107-112.
- Schoenberg, D. A. y R. K. Trench. 1980. Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. III. Specificity and infectivity of *S. microadriaticum*. Proc. R. Soc. Lond. (B) **207**:445-460.
- Schreiber, U. y W. Bilger. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the last years in retrospect. Prog. Bot. **54**:151-173.
- Shibata, K. 1969. Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living on the Great Barrier Reef. Plant Cell Physiol. **10**:325-335.
- Shick, J. M. 1993. Solar UV and oxidative stress in algal-animal symbioses. In: Frontiers of Photobiology. A. Shima, M. Ichahashi, Y. Fujiwara y H. Takebe (eds.) Amsterdam, The Netherlands. Elsevier Science Publishers B. V. Pp. 561-564.
- Shick, J. M. 2004. The continuity and intensity of ultraviolet irradiation affect the kinetics of biosynthesis, accumulation, and conversion of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. Limnol. Oceanogr. **49**(2):442-458.
- Shick, J. M. y W. C. Dunlap. 2002. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. Annu. Rev. Physiol. **64**:223-262.
- Shick, J. M., M. P. Lesser y W. R. Stochaj. 1991. Ultraviolet radiation and photooxidative stress in zooxanthellate Anthozoa: The sea anemone *Phyllodiscus semoni* and the octocoral *Clavularia* sp. Symbiosis **10**:145-173.
- Shick, J. M., M. P. Lesser, W. C. Dunlap, W. R. Stochaj, B. E. Chalker y J. Wu Won. 1995. Depth-dependent responses to solar ultraviolet radiation and oxidative stress in the zooxanthellate coral *Acropora microphthalma*. Mar. Biol. **122**(1):41-51.
- Shick, J. M., M. P. Lesser y P. L. Jokiel. 1996. Effects of ultraviolet radiation on corals and other coral reef organisms. Global Change Biol. **2**:527-545.
- Shick, J. M., S. Romaine-Lioud, C. Ferrier-Pagès y J.-P. Gattuso. 1999. Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. Limnol. Oceanogr. **44**(7):1667-1682.

- Siebeck, O. 1981. Photoreactivation and depth-dependent UV tolerance in reef coral in the Great Barrier Reef/Australia. *Naturwissenschaften*. **68**:426-428.
- Siebeck, O. 1988. Experimental investigation of UV tolerance in hermatypic corals (Scleractinia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **43**:95-103.
- Stimson, J. 1997. The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **214**:35-48.
- Stochaj W. R. y A. R. Grossman. 1997. Differences in the protein profiles of cultured and endosymbiotic *Symbiodinium* sp. (Pyrrophyta) from the anemone *Aiptasia pallida* (Anthozoa). *J. Phycol.* **33**(1):44-53.
- Stochaj W. R., W. C. Dunlap y J. M. Shick. 1994. Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. *Mar. Biol.* **118**:149-156.
- Suh, H.-J., H.-W. Lee y J. Jung. 2003. Mycosporine glycine protects biological systems against photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency. *Photochem. Photobiol.* **78**(2):109-113.
- Sutton D. C. y O. Hoegh-Guldberg. 1990. Host-zooxanthella interactions in four temperate marine invertebrate symbioses: assessment of effect of host extracts on symbionts. *Biol. Bull.* **178**:175-186.
- Trench, R. K. 1979. The cell biology of plant-animal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**:485-531.
- Trench, R. K. 1997. Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.* **2**:1275-1286.
- Tyystjärvi, E. y E. M. Aro. 1996. The rate constant of photoinhibition measured in lincomycin-treated leaves, is directly proporcional to light intensity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**:2213-2218.
- Vass, I., D. Kirilovsky y A. L. Etienne. 1999. UV-B radiation induced donor- and acceptor-side modifications of photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *Biochemistry* **38**:12786-12794.
- Verde, E. A. y L. R. McCloskey. 1998. Production, respiration, and photophysiology of the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana* symbiotic with zooxanthellae: effect of jellyfish size and season. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **168**:147-162.

- Warner, M. E., W. K. Fitt y G. W. Schmidt. 1996. The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae *in hospite* from four different species of reef coral: a novel approach. *Plant Cell Environ.* **19**:291-299.
- Wellington, G. M. y W. K. Fitt. 2003. Influence of UV radiation on the survival of larvae from broadcast-spawning reef corals. *Mar. Biol.* **143**:1185-1192.
- Winters, G., Y. Loya, R. Röttgers y S. Beer. 2003. Photoinhibition in shallow-water colonies of the coral *Stylophora pistillata* as measured in situ. *Limnol. Oceanogr.* **48**(4):1388-1393.
- Xiong, F. 2001. Evidence that UV-B tolerance of the photosynthetic apparatus in microalgae is related to the D1-turnover mediated repair cycle *in vivo*. *J. Plant Physiol.* **158**:285-294.
- Yakovleva, I. y M. Hidaka. 2004. Diel fluctuations of mycosporine-like amino acids in shallow-water scleractinian corals. *Mar. Biol.* (In press) publicado online como DOI: 10.1007/s00227-004-1384-9

APENDICE

La señal de fluorescencia

La emisión de la fluorescencia de la clorofila *a* es un proceso competitivo de menor importancia de la desactivación de pigmentos excitados. La tasa de emisión de fluorescencia, F , es proporcional al flujo de luz absorbida, E_a , y al cociente de la tasa constante de fluorescencia, k_F , sobre la suma de las tasas constantes, $\sum k_i$, de todas las reacciones competitivas que resultan en el retorno de la molécula de clorofila al estado basal. Las reacciones más importantes son la reacción fotoquímica (k_P), la desactivación térmica (k_D), y la transferencia de energía de excitación a los pigmentos no fluorescentes (k_T), por ejemplo a la antena del FSI.

A partir de lo anterior, se obtiene la ecuación general para la cosecha de la fluorescencia:

$$F = \frac{E_a * k_F}{\sum k_i} \quad 8$$

$$\Phi F = \frac{F}{E_a} = \frac{k_F}{(k_F + k_D + k_T + k_P)} \quad 9$$

La cosecha de la fluorescencia es mínima (ΦF_0) cuando todos los centros están en activo, esto es, en estado “abierto”. La cosecha alta de fotones de la fotosíntesis observada experimentalmente, exige que $k_P \gg k_F + k_D + k_T$. Sin embargo, cuando Q_A esta reducida totalmente (por ejemplo cuando todos los centros de reacción están en el estado $Z P_{680} P_{heo} Q_A^-$), la excitación de P_{680} no puede resultar en una separación de carga estable ($k_P = 0$). Es entonces cuando se obtiene la cosecha máxima de la fluorescencia ΦF_M (Krause y Weis 1991).

De una forma similar, se obtiene la cosecha potencial de la reacción fotoquímica del FSII:

$$\Phi P_0 = \frac{k_P}{(k_F + k_D + k_T + k_P)} = \frac{(\Phi F_M - \Phi F_0)}{\Phi F_M} = \frac{F_V}{F_M} \quad 10$$

donde F_M es la fluorescencia total máxima y F_V la máxima emisión de la fluorescencia variable y describe el cambio en la emisión de fluorescencia entre dos estados definidos (de F_0 a F_M). Al cociente de F_V/F_M se le conoce como cosecha cuántica o eficiencia fotoquímica del FSII. La proporción F_V/F_M ha llegado a ser un parámetro importante y fácilmente evaluable del estado fisiológico del aparato fotosintético. Los estreses ambientales que afectan la eficiencia del FSII llevan a un decremento característico en F_V/F_M . Existe una relación inversa entre la tasa de emisión de la fluorescencia y la tasa de la reacción fotoquímica. En la curva de inducción de la fluorescencia, la elevación de la emisión de F_0 a F_M refleja la reducción de Q_A . Además, la emisión de la fluorescencia esta influenciada por varios mecanismos de desactivación no-fotoquímica.

En los análisis de fluorometría de pulsos modulados con el diving PAM (Walz, Alemania), la fluorescencia es excitada por pulsos cortos pero saturantes de 3 μ s de duración y con una frecuencia de 600 ó 20000 Hz, emitidos por diodos emisores de luz (LED). La luz de los LED pasa a través de un filtro de paso corto ($\lambda > 670$ nm) y el fotodetector es protegido por un filtro de paso largo ($\lambda > 700$ nm) y un filtro reflectante del calor. Un sistema amplificador de pulsos muy selectivo ignora todas las señales excepto las de la fluorescencia excitada durante los pulsos de 3 μ s (Manual del Diving PAM). El fotodetector es un fotodiodo que presenta una respuesta lineal a cambios de intensidad luminosa muy altos.