



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA MORFOLOGÍA FOLIAR SOBRE
LA EFICIENCIA DE ABSORCIÓN DE LUZ DE LAS HOJAS
DEL PASTO MARINO *Thalassia testudinum*.

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

LYZ LEGARIA MORENO

Directora de Tesis: Dra. Susana Enríquez Domínguez

Comité Tutorial: Dr. Roberto Iglesias-Prieto

Dr. Eugenio Méndez Méndez

Dra. Anastazia T. Banaszak

Dra. Judith Márquez Guzmán

México, D.F. 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Agradecimientos.

Quiero manifestar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Susana Enríquez por sus enseñanzas, particularmente en el aspecto académico y por el apoyo incondicional que me brindó.

A los integrantes del Comité Tutorial: Dr. Roberto Iglesias-Prieto, Dra. Anastazia Banaszak, Dr. Eugenio Méndez y Dra. Judith Márquez, quienes con singular paciencia compartieron sus conocimientos conmigo.

A los investigadores de la UAPM que me apoyaron y me brindaron su amistad durante la realización de esta investigación, particularmente a la Dra. Lourdes Segura (†), por permitirme el uso de los microscopios, a la Dra. Judith Sánchez por concederme el uso de la centrífuga, a la Dra. Patricia Thomé por su asesoría durante el aislamiento de los protoplastos de los pastos.

A mis compañeros del laboratorio de Fotobiología: Aimeé Rodríguez, Xavier Hernández, Napo, Irene y Pedro Ramírez, por el apoyo académico y moral.

A mis queridas amigas quienes hicieron más fácil mi transito en el bello Puerto Morelos, Heidi Monroy, Aimesita Rodríguez, Lulú Téllez y Eunice.

Al personal académico y administrativo de la UAPM. Particularmente a Francisco Ruiz, Fernando Negrete, Judith Vázquez, Marcy Duran y Rafael Álvarez.

A todos aquellos que compartieron conmigo este tiempo y espacio, por su cariño y comprensión.

A los que me impulsaron para iniciar esta etapa de mi vida.

A quienes me apoyaron para cerrar finalmente este ciclo que parecía interminable, particularmente al Dr. Heriberto Paniagua y a Ángel Montiel.

Al CONACYT por otorgarme la beca con número de registro 183079 para que realizara mis estudios de Maestría.

Dedico esta Tesis a:

Mi madre Rosa María Moreno por ser un ejemplo en mi vida

Mi padre Humberto Ismael Legaria por su cariño

Mi abue con todo mi amor

Mis hermanos Rubén David e Ismael por compartir la vida conmigo

Un gran hombre, Ángel Montiel

Índice

Símbolos y Abreviaciones.	v
Resumen.	vi
I. Introducción.	1
1.1 Luz y Fotosíntesis.	1
1.2 Absorción de luz.	3
1.3 Tamaño óptico efectivo de la estructura fotosintética.	4
1.4 Efecto paquete.	6
1.5 Dispersión múltiple.	8
1.6 Respuesta de los organismos a la variabilidad del campo lumínico.	10
1.7 Absorción de luz en hojas de fanerógamas marinas. Caso específico de la especie tropical <i>Thalassia testudinum</i> .	13
1.8 Variación natural del campo lumínico de las hojas de los pastos marinos.	16
II. Objetivos.	19
2.1 Objetivo general.	19
2.2 Objetivos particulares.	19
III. Área de estudio.	20
3.1 Descripción de la laguna arrecifal de Puerto Morelos.	20
3.2 Descripción del área de estudio.	23
IV. Materiales y Métodos.	27
4.1 Colecta de los haces foliares de <i>Thalassia testudinum</i> .	27
4.2 Determinación de los descriptores ópticos de las hojas.	27
4.2.1 Método espectrofotométrico.	28
4.2.2 Método alternativo, implementado con un sensor de luz acoplado a un fluorómetro.	30
4.2.2.1 Cálculo de la absorptancia de las hojas blanqueadas (sin pigmentos).	32
4.2.3 validación del método alternativo.	33
4.3 Determinación de los descriptores de pigmentos de las hojas.	34
4.4 Determinación de los descriptores morfológicos de las hojas.	35
V. CAPITULO 1. Análisis alométrico de la relación forma-función entre la morfología foliar y la variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de las hojas de <i>Thalassia testudinum</i>.	37
5.1 Material y Métodos.	38
5.1.1 Análisis estadístico	38
5.2 Resultados.	40
5.2.1 Descripción de la variabilidad de la base de datos.	40
5.2.2 Análisis del efecto de la variación del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la capacidad de absorción de luz.	42
5.2.3 Determinación de los efectos directos e indirectos de los pigmentos y la morfología foliar sobre la variación de la sección transversal de pigmentos y la	44

capacidad de absorción de luz.	
5.2.4 Análisis del efecto de la variación del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la eficiencia de absorción de luz.	48
5.2.5 Análisis del efecto de la morfología foliar de <i>T. testudinum</i> sobre la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos. Análisis de la variación del contenido de pigmentos por unidad de volumen.	49
5.2.6 Análisis del efecto de la morfología foliar de <i>T. testudinum</i> sobre la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos. Análisis de la variación del contenido de pigmentos por unidad de peso.	52
5.2.7 Comparación de la variabilidad de los pigmentos expresados por unidad de área, volumen y peso en función de la eficiencia de absorción de luz.	56
5.3 Discusión.	57
5.3.1 Descripción de la variabilidad de la base de datos analizada en relación a estudios previos.	57
5.3.2 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la capacidad de absorción de luz, absorptancia.	59
5.3.3 Tipos morfológicos de hojas en <i>T. testudinum</i> y sus propiedades ópticas.	65
5.3.4 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la eficiencia de absorción de luz.	66
5.3.5 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de volumen y la morfología foliar sobre la eficiencia de absorción de luz.	70
5.3.6 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de peso y la morfología foliar sobre la eficiencia de absorción de luz.	73
5.3.7 Comparación de la variabilidad de pigmentos expresados por unidad de área, volumen y peso, en función de la eficiencia de absorción de luz.	73
VI. CAPITULO 2. Análisis de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de <i>Thalassia testudinum</i>.	75
6.1 Materiales y Métodos.	76
6.1.1 Análisis estadístico.	77
6.2 Resultados.	78
6.2.1 Variación del campo lumínico de las hojas de <i>T. testudinum</i> en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).	78
6.2.2 Variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de los pigmentos de las hojas de <i>T. testudinum</i> en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).	79
6.2.3 Variación de la morfología foliar de <i>T. testudinum</i> en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).	86
6.2.4 Variación del contenido de pigmentos por unidad de volumen y de peso de las hojas de <i>T. testudinum</i> en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).	94
6.3 Discusión.	98
6.3.1 Variabilidad del campo lumínico entre praderas.	101
6.3.2 Respuestas fotoaclimatativas: variabilidad del contenido de pigmentos.	103

6.3.3 Respuestas fotoaclimatativas: variabilidad de la capacidad y eficiencia de absorción de luz.	107
6.3.4 Respuestas fotoaclimatativas: variabilidad morfológica.	110
6.3.5. Modelo de variación morfológica de la respuesta fotoaclimatativa de la hoja de <i>T. testudinum</i> .	117
VII. CAPITULO 3. Análisis del efecto de los cristales de oxalato de calcio en la regulación de las propiedades ópticas de las hojas.	119
7.1 Materiales y Métodos.	120
7.1.1 Aislamiento de células epidémicas sin pared celular (protoplastos) de las hojas de <i>Thalassia testudinum</i> y <i>Syringodium filiforme</i> .	120
7.1.2 Determinación de los descriptores ópticos de las suspensiones de protoplastos.	121
7.1.3 Determinación de la densidad de pigmentos de los protoplastos.	122
7.1.4 Determinación del tamaño de los protoplastos.	122
7.1.5 Análisis estadístico.	123
7.2 Resultados.	124
7.2.1 Variabilidad morfológica de los cristales.	124
7.2.2 Análisis del efecto de los cristales de oxalato de calcio sobre la eficiencia de absorción de luz en protoplastos de pastos marinos.	126
7.2.3 Comparación de la eficiencia de absorción de luz de los protoplastos <i>versus</i> el tejido foliar pluricelular de <i>T. testudinum</i> .	130
7.3 Discusión.	131
7.3.1 Cristales de oxalato de calcio en organismos foto-autótrofos.	131
7.3.2 Determinación de la eficiencia de absorción de luz.	136
VIII. Corolario.	139
IX. Conclusiones.	149
X. Referencias.	152
XI. Anexo.	164
11.1 Lista de Figuras.	164
11.2 Lista de Tablas.	169
11.3 Método de extracción de protoplastos (preparación de reactivos).	171

Símbolos y Abreviaciones

D	Absorbancia
A	Capacidad de absorción de luz, Absorptancia [%]
a^*	Eficiencia de absorción de luz [$m^2 mg^{-1}$]
R	Reflectancia [%]
T	Transmitancia [%]
T_o	Transmitancia de la hoja blanqueada [%]
E_s	Irradiancia relativa en la superficie del dosel [%]
E_o	Irradiancia relativa total [%]
E_T	Irradiancia relativa transmitida [%]
Kd	Atenuación de luz [m^{-1}]
ρ	Densidad de pigmentos por unidad de área [$mg m^{-2}$]
C_i	Concentración intracelular de pigmentos [$\mu g cm^{-3}$]
d	Diámetro celular equivalente [m]
RMA	Reduced major axis regression
FE_{RMA}	factor de escala del análisis RMA
FE_{LS}	Factor de escala de la regresión lineal simple
LMA	Peso específico [$g m^{-2}$]
SLA	Área específica [$m^2 g$]
LAI	Leaf area index
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
C.V.	Coefficiente de variación
D.E.	Desviación estándar
E.E.	Error estándar
n	Tamaño de muestra
p	Valor de probabilidad
r	Coefficiente del análisis de correlación de Pearson
R^2	Coefficiente del análisis de regresión
Log/log	Variables transformadas a escala logarítmica

Resumen.

En este estudio se examina por primera vez la relación forma y función entre diferentes descriptores morfológicos de la hoja del pasto marino *Thalassia testudinum* y descriptores de su capacidad y eficiencia de absorción de luz. Se examina también por primera vez si la presencia de cristales de oxalato de calcio en las células epidérmicas de esta especie, puede estar relacionada con cambios en la habilidad de las hojas para coleccionar luz. En la base de datos general que se obtuvo de la descripción de la variación natural de seis praderas de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, se pudo observar una gran variabilidad en la capacidad, A , pero sobre todo en la eficiencia de absorción de luz, a^* , de las hojas de *T. testudinum*, resultado de una variación de más de dos órdenes de magnitud en la sección transversal de pigmentos [densidad de clorofila ($a + b$), $mg\ m^{-2}$]. Este rango de variación es el mayor hasta ahora examinado en pastos marinos, gracias a la consideración de segmentos inmaduros poco pigmentados. La a^* de los pigmentos fotosintéticos mostró una variación de un orden de magnitud asociada a diferencias en el grosor de hoja, de epidermis, del sistema lacunar y del área específica. El análisis comparativo general permitió describir la magnitud del *efecto paquete*, determinando un factor de escala para la variación de la sección transversal [$mg\ m^{-2}$] similar a los encontrados para las asociaciones de a^* con la concentración [$\mu g\ cm^{-3}$] y el contenido [$mg\ gPS^{-1}$] de pigmentos. Los resultados indican que las hojas más pigmentadas son capaces de contrarrestar el efecto paquete, ya que sufren proporcionalmente un menor empaquetamiento. En función de la colinearidad entre el grosor de hoja, la densidad de hoja y el contenido de pigmentos [$mg\ gPS^{-1}$], y considerando su efecto sobre A y los pigmentos por sección transversal, se infiere que *T. testudinum* y probablemente los pastos marinos de anatomía foliar similar, pueden producir hojas más gruesas, con contenidos menores de pigmentos por sección transversal de hoja sin comprometer su capacidad de absorción de luz. En base a las variables grosor, densidad de hoja y contenido de pigmentos, se reconocieron tres tipos de segmentos de hoja asociados a su desarrollo ontogénico. Los cambios morfológicos asociados a estos segmentos permiten a la planta ajustar los valores de a^* , que a lo largo de la hoja y entre praderas son mínimos. El análisis de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *T. testudinum* confirma que el dosel de la pradera ejerce un fuerte control sobre el campo lumínico foliar. Las respuestas fotoaclimatativas a baja luz fueron producir segmentos de hoja más gruesos, de mayor grosor de epidermis y menor densidad de hoja, así como, una mayor densidad de

pigmentos [$mg\ m^{-2}$]. A alta luz, se presentaron las características inversas; pero para ambos tipos de segmento la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos, a^* , se mantuvo constante. El efecto más claro de la luz sobre la variación de la respuesta fotoaclimatativa de la hoja se observó dentro de cada pradera y sobre una misma hoja, en el patrón de reducción de la densidad de pigmentos y de la capacidad de absorción de luz hacia la zona apical que es la más iluminada del dosel. El grosor de epidermis es quizás el descriptor morfológico más fuertemente regulado por la luz. Por último, se determinó que la presencia de cristales de oxalato de calcio dentro de los protoplastos de *T. testudinum* mejoran a^* en comparación con los protoplastos de *Syringodium filiforme*. Este resultado permite concluir que una de las principales funciones de los cristales de oxalato de calcio es regular las propiedades ópticas de las hojas de *T. testudinum*. Este estudio presenta por primera vez evidencias que soportan la hipótesis de que los cristales de oxalato de calcio en el reino vegetal pueden tener una función clave en la determinación de las propiedades ópticas del tejido fotosintético. Los resultados obtenidos en este estudio confirman que las hojas de *T. testudinum* son capaces de ajustar su habilidad para coleccionar luz y optimizar la eficiencia de absorción de luz de sus pigmentos fotosintéticos, gracias a la variación de su morfología. La respuesta fotoaclimatativa de la hoja, por tanto, debe ser capaz de desplegar estrategias adecuadas de variación en el contenido de pigmentos y en su morfología para mantener la producción fotosintética, minimizar el fotodaño y optimizar a^* a lo largo de su desarrollo.

I. Introducción.

1.1 Luz y Fotosíntesis.

La luz es el factor principal que determina la distribución y abundancia de los organismos fotosintéticos tanto en ambientes terrestres como acuáticos, debido a que proporciona la energía necesaria para el crecimiento de los organismos, gracias al proceso fotosintético (**Boardman, 1977; Björkman, 1981**). En ambos ambientes la luz ejerce un fuerte control sobre los organismos debido a la gran variación espacio-temporal del campo lumínico al que están expuestos (**Kirk, 1994**). En los ambientes acuáticos existe un fuerte gradiente lumínico en la columna de agua, pero también (y de forma similar a ambientes terrestres) dentro del dosel de las comunidades de macrófitas bentónicas (**Enríquez *et al.*, 2002**).

La fotosíntesis es el proceso por el cual los organismos capturan energía solar en las membranas tilacoidales (dentro de los cloroplastos) y la transforman en energía química que posibilita la síntesis de moléculas orgánicas, libera oxígeno y soporta el desempeño del organismo, es decir, su crecimiento y adecuación (**Boardman, 1977; Björkman, 1981; Horton *et al.*, 1996; Falkowski & Raven, 1997; Blankenship, 2002**). Específicamente, las estructuras supramoleculares encargadas de capturar la luz disponible en el ambiente, son los sistemas colectores de luz o antenas formados por complejos pigmentos-proteínas, que conducen la energía de excitación al centro de reacción fotoquímico, estas estructuras y los centros de reacción forman los fotosistemas. Las antenas funcionan como un embudo, en donde los pigmentos colocados en la periferia de las antenas colectan fotones de alta energía y los del centro, fotones de baja energía. Así que, la energía de excitación se mueve de una zona de alta a baja energía por resonancia electromagnética, lo que permite la migración de los estados electrónicos excitados entre pigmentos, dirigiéndola hacia el centro de reacción de cada uno de los fotosistemas (**Blankenship, 2002**).

Los centros de reacción están formados por un tipo específico de clorofila *a*, que forma un dímero capaz de donar un electrón a un primer aceptor y llevar a cabo la primera separación de carga y la primera transformación de la

energía lumínica en química dentro de la membrana fotosintética. La clorofila *a* es el único pigmento universal presente en todos los organismos que utilizan fotosíntesis oxigénica y es fácilmente reconocida pues su pico de absorción en el rojo (675-680nm) tiene mínima interferencia con el resto de pigmentos accesorios. El centro de reacción está embebido en la membrana tilacoidal y transforma la energía solar colectada por las antenas en energía química utilizable en los distintos procesos metabólicos del organismo (**Falkowski & Raven, 1997; Blankenship, 2002**). El dímero de clorofila *a* del centro de reacción, es el primer donador de electrones de la cadena transportadora de electrones del tilacoide, ésta cadena está formada por diversas moléculas que actúan primero como aceptores y luego como donadores de electrones (secuencia de donadores/aceptores del fotosistema II: feofitina, plastoquinona_A, plastoquinona_B, citocromo_{b₆/f}, plastocianina). El número de centros de reacción es variable entre especies y respuestas fotoaclimatativas, pues varía en función de las características fotosintéticas de la especie y del campo lumínico al que está sometido un organismo a lo largo de su historia de vida, e incluso puede presentar variaciones diarias y/o estacionales en función de la irradiancia (**Sukenik et al., 1990**). También se ha señalado el potencial efecto de los recursos disponibles y necesarios para su fabricación sobre esta variación (**Iglesias-Prieto & Trench, 1994**).

Las antenas conducen la energía de excitación al centro de reacción más rápidamente que la tasa de salida de esta energía del fotosistema II a través de las distintas reacciones que relajan los estados excitados de la antena. Ésto conduce a una fuerte limitación de la tasa de conversión de la energía lumínica en química cuando aumenta fuertemente el flujo de fotones absorbidos en las antenas de las membranas fotosintéticas. En estas condiciones se activan mecanismos de disipación de la energía absorbida en exceso, fotoprotectores, para minimizar el daño que puede sufrir la membrana fotosintética al extenderse el tiempo de vida del estado excitado de los pigmentos, ya que en estas condiciones aumenta considerablemente la probabilidad de que la clorofila adquiera el estado triplete, que es una molécula fuertemente reactiva y oxidante que provoca daño celular y del aparato fotosintético.

Para que los organismos fotoautótrofos puedan regular sus procesos fisiológicos a través de la fotosíntesis, deben primero ajustar su capacidad y

eficiencia de absorción de luz, a la luz disponible en el ambiente y regularlo a su capacidad enzimática de fijación de carbono orgánico, éstas características ópticas del organismo dependen particularmente de la estructura fotosintética (i.e., célula, hoja, talo), asociadas a la distribución y contenido de pigmentos, así como, a la morfología y anatomía de la estructura.

1.2 Absorción de luz.

Desde el punto de vista físico, la absorción de luz es el proceso por el cual un electrón de la materia que lo absorberá es conducido a un estado excitado, debido a que la absorción de un fotón induce un cambio en el estado de la energía de sus átomos o moléculas (**Falkowski & Raven, 1997**). En los organismos fotótrofos, la cosecha o absorción de luz, *light harvesting*, se refiere a la capacidad de un sistema de complejos pigmentos-proteínas especializados en coleccionar luz y en transferir esta energía al centro de reacción fotosintético (**Horton et al., 1996**). Cada fotón de luz absorbido puede excitar únicamente a una molécula y sólo lo absorbe una porción de ésta, denominado cromóforo (i.e. con anillo tetrapirrólico abierto o cerrado, característico de las clorofilas y carotenoides, **Figura 1**) (**Falkowski & Raven, 1997**).

La cantidad de luz que potencialmente puede absorber o coleccionar la célula o estructura fotosintética depende del tamaño óptico efectivo de los sistemas colectores de luz o antenas. El tamaño óptico efectivo depende: *i*) del tamaño de la antena de cada centro de reacción; *ii*) del número y grado de conectividad de los centros de reacción, es decir, de la organización estructural de la membrana fotosintética; *iii*) de la distribución de pigmentos dentro de la estructura fotosintética; y *iv*) de la forma de la estructura fotosintética. Estas características ópticas son fundamentales para determinar no sólo la dosis de luz (fracción de luz absorbida por la estructura fotosintética foliar del total de luz disponible en un día en un segmento-área, expresado como mol cuanta m^{-2} día⁻¹) que un organismo es capaz de coleccionar, sino también la eficiencia cuántica del proceso fotosintético. La eficiencia cuántica de la fotosíntesis es la habilidad con la que el proceso fotosintético transforma la energía lumínica absorbida en energía química (i.e., moles de carbono fijado en moléculas orgánicas por mol de fotones absorbidos). Esta eficiencia también está influenciada por otros procesos fotosintéticos no ligados a la absorción de luz

sino: *i)* a la eficiencia fotoquímica de separación de carga en los centros de reacción; *ii)* al número de centros de reacción y su tasa de reapertura, $1/t$, así como, *iii)* a la capacidad de fijar carbono inorgánico en la fase enzimática de la fotosíntesis (Iglesias-Prieto & Trench, 1994, 1997a).

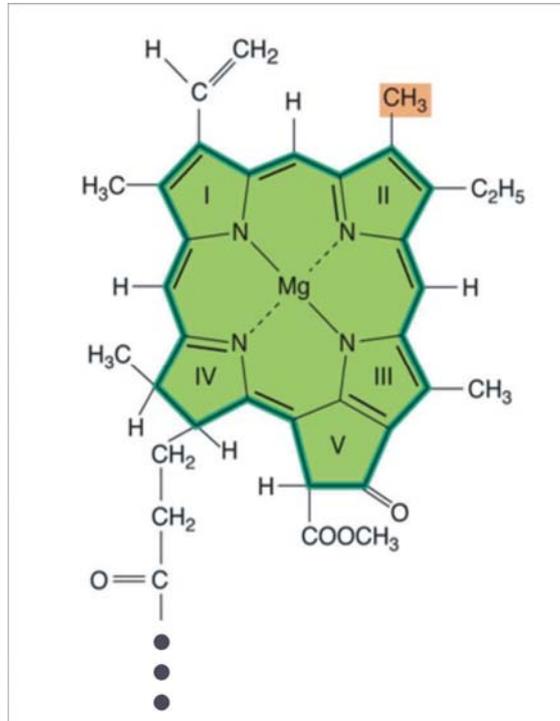


Figura 1. Estructura de la molécula de clorofila a, formada por un anillo tetrapirrólico cerrado y un segmento del grupo fitol. Tomada de http://www.peleteiro.es/departamentos/biologia/2_BAC_biologia/clorofila.gif y modificada para su presentación.

1.3 Tamaño óptico efectivo de la estructura fotosintética.

El tamaño óptico efectivo de los pigmentos fotosintéticos describe la probabilidad de interacción entre los fotones de una longitud de onda específica y la concentración de moléculas presentes en una sección transversal con capacidad de absorberlos (Falkowski & Raven, 1997). Está conformado por los sistemas colectores de luz o antenas y los centros de reacción del PSI y PSII, y se conoce también como *la sección óptica transversal de pigmentos*. En términos biológicos, la sección transversal óptica funcional proporciona una medida del tamaño o magnitud de la unidad funcional de pigmentos que abastece al centro de reacción durante el proceso fotoquímico primario de la fotosíntesis (Falkowski *et al.*, 1981; Falkowski & LaRoche, 1991; Falkowski & Raven, 1997), y que define a la unidad fotosintética (PSU, *sensu* Falkowski *et al.*, 1981).

En los organismos pluricelulares, la sección óptica transversal de pigmentos está conformada por la estructura fotosintética completa, las hojas de las plantas superiores y los talos de las macroalgas. Estas estructuras varían fuertemente en su anatomía interna y en la distribución de los pigmentos fotosintéticos dentro de ellas. Por ejemplo, en las hojas de *Mentha aquatica* una molécula de pigmento se puede encontrar en cualquiera de los dos tipos de mesófilo, parénquima de empalizada y/o mesófilo esponjoso (**Enríquez & Sand-Jensen, 2003**), pero en las hojas del pasto marino *Thalassia testudinum*, el volumen foliar que contiene pigmentos se limita solamente a las células epidérmicas (**Figura 2**).

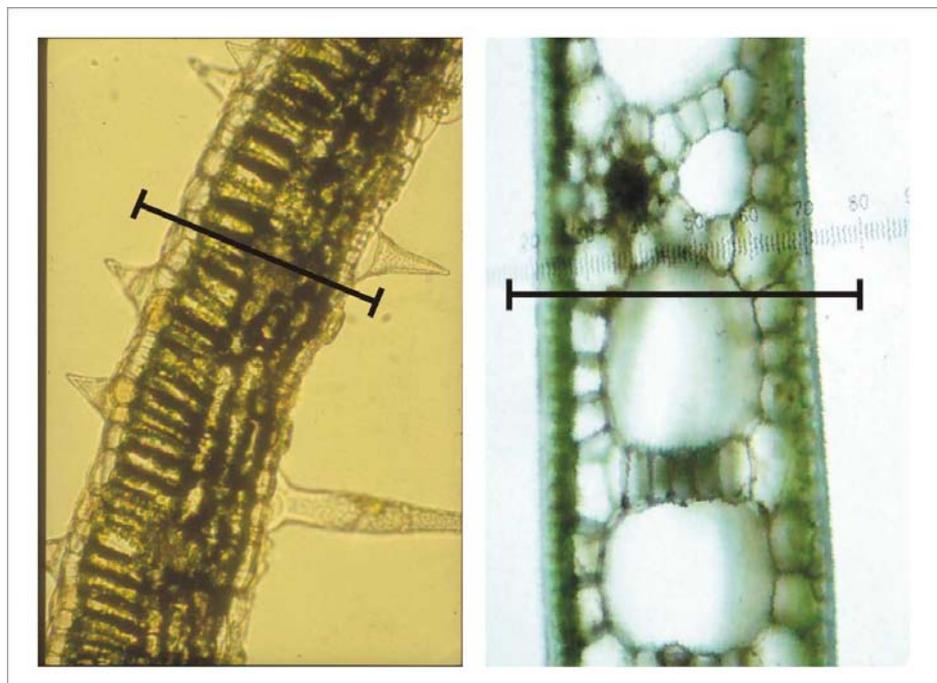


Figura 2. Sección transversal óptica de la hoja bifacial típica de plantas terrestres *Mentha aquatica* (foto S. Enríquez) (a) y de la hoja del pasto marino tropical *Thalassia testudinum* (foto L. Legaria-Moreno) (b).

Estas diferencias entre especies en su anatomía foliar y en la distribución de los pigmentos en el tejido, resultan en cambios muy significativos de sus características ópticas, y, por tanto, de la habilidad de los pigmentos para coleccionar la luz dentro del tejido. Así que, la sección óptica transversal de los pigmentos puede variar extraordinariamente entre especies dependiendo de las características ópticas de su tejido fotosintético.

La variabilidad de la sección óptica transversal de los pigmentos fotosintéticos, es también una importante respuesta fotoaclimatativa de los

organismos a las variaciones del campo lumínico al que están expuestos (**Falkowski & Raven, 1997**). Por ejemplo, los organismos incrementan la sección transversal a baja luz para facilitar eficientemente la absorción de energía lumínica y la transferencia de la excitación entre los pigmentos fotosintéticos, mientras que a alta luz, la reducen para disminuir la dosis efectiva y por tanto el fotodaño (**Blankenship, 2002**).

El aumento del contenido de pigmentos conduce a una fuerte disminución de su habilidad para coleccionar luz, al estar los pigmentos estructuralmente muy próximos, pero facilitando la transmisión de la excitación; esto trae como consecuencia un efecto de autosombra entre ellos. Este fenómeno que experimentan los organismos fotosintéticos *in vivo* se conoce como *efecto paquete*.

1.4 Efecto paquete.

El efecto paquete se presenta cuando los pigmentos se encuentran ordenados y empaquetados en estructuras vivas como complejos pigmentos-proteínas, apilados dentro de tilacoides, cloroplastos, células y/o tejidos (**Kirk, 1994**). Este fenómeno ha sido empíricamente y teóricamente estudiado en suspensiones *in vitro* de algas (**Duysens, 1956; Kirk, 1975, 1976, 1994**) y para poblaciones naturales de fitoplancton (**Morel & Bricaud, 1981**). La explicación de este fenómeno se encuentra en la misma organización de los sistemas colectores de luz o antenas, que han evolucionado como avenidas de transmisión de excitones hacia el centro de reacción para facilitar el proceso fotoquímico y permitir un flujo continuo de electrones, permitiendo una eficaz transferencia de la excitación entre pigmentos situados muy próximos el uno del otro, pero a costa de una reducción importante de su eficiencia de absorción de luz, debido al solapamiento y consecuente autoensombreamiento de los pigmentos en las membranas fotosintéticas.

Para cuantificar el efecto paquete se han utilizado tres metodologías distintas: *i*) comparando las diferencias entre los espectros de absorción *in vivo* de células intactas y células rotas (**Geider & Osborne, 1992; Kirk, 1994**) (**Figura 3**); *ii*) describiendo el patrón de reducción de la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos en función de la variación de los pigmentos por unidad de área proyectada (**Geider & Osborne, 1992; Enríquez & Sand-Jensen,**

2003); y *iii*) estimando un factor β , que resulta de comparar los valores de absorción de luz de los pigmentos en la estructura intacta y los valores de absorción de luz de una concentración similar de pigmentos extraídos en un solvente orgánico (Ruhle & Wild, 1979). Valores $\beta > 1$ describen el grado de intensificación de la absorción gracias a la habilidad del tejido para dispersar la luz, éste factor depende del índice refractivo de la muestra (hoja o talo), sus características ópticas y del contenido de pigmentos que es uno de los factores más importantes en la regulación de la amplificación del paso óptico, ya que conforme aumenta el contenido de pigmentos, el factor β disminuye (Ruhle & Wild, 1979).

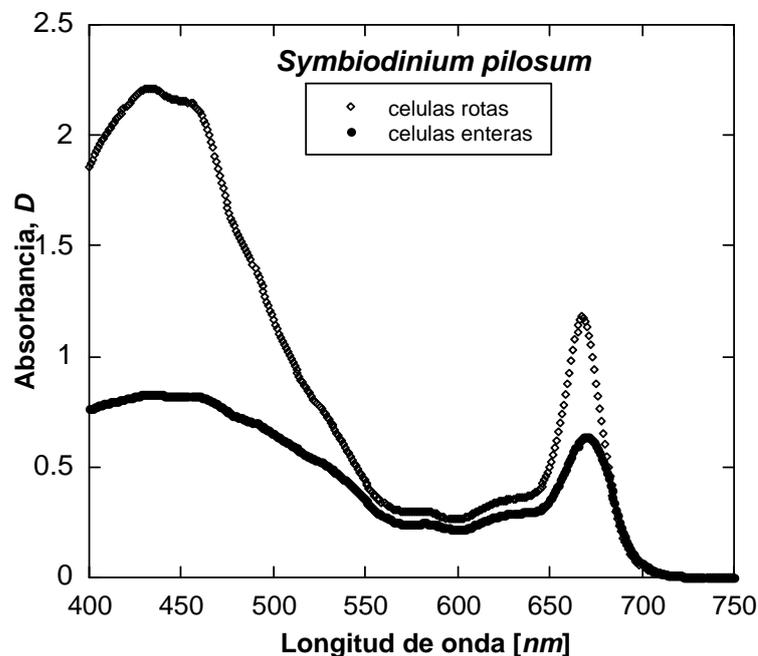


Figura 3. Comparación del empaquetamiento de los pigmentos, en función de la absorción de células enteras y rotas de dinoflagelados en cultivo, *Symbiodinium pilosum*. Tomada de Enríquez, 2005a.

La forma más común de expresar la magnitud del efecto paquete, misma que se utiliza en el presente estudio, es por medio del análisis de la variación del coeficiente específico de absorción [a^* , $m^2 mg^{-1}$] (Geider & Osborne, 1992; Kirk, 1994) en función de la variación del contenido de pigmentos por unidad de área proyectada. El coeficiente específico de absorción se calcula con la expresión (Enríquez et al., 2005) $a^*=(D/\rho) \ln 10$, donde, D es la absorbancia determinada con el espectrofotómetro, ρ , es el contenido en pigmentos por unidad de área proyectada, y el factor $\ln 10$ aparece al transformar logaritmos de base e en logaritmos de base 10.

En poblaciones de fitoplancton se ha determinado que el efecto paquete

es mayor en: *i*) los picos de máxima absorción de luz; *ii*) en células con mayores concentraciones intracelulares de pigmentos, *C_i*; y *iii*) en células de mayor tamaño (diámetro celular equivalente, *d*) (**Morel & Bricaud, 1981; Geider & Osborne, 1992; Kirk, 1994**).

La utilidad del coeficiente específico de absorción, se debe a que permite cuantificar el efecto paquete y comparar la magnitud del autoensombreamiento de los pigmentos entre diferentes estructuras fotosintéticas pertenecientes a distintos grupos taxonómicos de organismos fotosintéticos, con un descriptor universal. Esto se debe a que las comparaciones se realizan en base al grado de empaquetamiento del único pigmento común a todos ellos, la clorofila *a* en su pico de máxima absorción en el rojo (absorbancia a 680nm para plantas y a 675nm para células fitoplanctónicas), que es donde tiene mínima interferencia con los pigmentos accesorios. La clorofila *a* es un pigmento universal que se encuentra en todos los organismos fotoautótrofos y por eso el coeficiente específico de absorción referido a ella puede ser utilizado como un descriptor universal entre distintas estructuras fotosintéticas.

1.5 Dispersión múltiple.

El fenómeno que permite que estructuras dispersivas como las hojas puedan intensificar su capacidad de absorber la luz (factor $\beta > 1$, **Ruhle & Wild, 1979**) es la dispersión múltiple. **Enríquez & Sand-Jensen (2003)** examinaron hojas de *Mentha aquatica* crecidas bajo condiciones experimentales, estimando valores entre 0.617 y 1.273 para el factor β de **Ruhle & Wild (1979)**. Estos resultados confirmaron el efecto amplificador de la dispersión múltiple sobre la capacidad de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos en algunas de las hojas de esta especie anfibia (valores del factor $\beta > 1$), mientras que otras hojas presentaron valores que indicaban un mayor peso del efecto paquete (valores del factor $\beta < 1$). Ésto indica que a pesar del fuerte *efecto paquete* que sufren los pigmentos dentro de las estructuras fotosintéticas, los organismos han podido contrarrestarlo y mejorar la eficiencia de absorción de luz gracias a la aparición de estructuras y anatomías que favorecen la dispersión múltiple. Por medio de este fenómeno, se consigue alargar el paso óptico efectivo de la

luz al ingresar los fotones en un medio dispersivo, como el tejido pluricelular de las hojas (**Ruhle & Wild, 1979**) o una suspensión de células fitoplanctónicas (**Osborne & Geider, 1989**), lo que provoca el aumento de la probabilidad de que un fotón se absorba y, consecuentemente, que la eficiencia de absorción de luz por unidad de pigmento incremente.

Geider & Osborne (1992), encontraron que las células del fitoplancton pueden modificar el campo de luz en su entorno debido a la difracción de luz por el efecto de borde de las células, lo que incrementa la dispersión por reflexión múltiple interna. En macroalgas marinas, **Ramus (1978, 1990)** encontró que algunos tejidos pluricelulares como los de *Codium fragile* pueden actuar como guías ópticas, canalizando la absorción de luz. En hojas de plantas terrestres con baja densidad de pigmentos, **Ruhle & Wild (1979)** observaron que estas estructuras dispersivas intensifican hasta seis veces la absorbancia, debido al alargamiento del paso óptico efectivo de la luz, evaluado con el factor β . Otras evidencias del efecto de la dispersión múltiple en el interior de las hojas de plantas terrestres, muestran que la intensidad lumínica dentro de la hoja puede llegar a intensificarse entre dos y tres veces comparada con el campo lumínico externo (**Vogelmann & Bjorn, 1986**). **Terashima & Saeki (1983)** encontraron diferencias significativas en las propiedades ópticas del mesófilo de empalizada y del esponjoso de las hojas de *Camellia japonica* y *C. communis*. Estos autores encontraron que el tejido esponjoso presentó una mayor capacidad para reflejar la luz debido a la refracción celular y al aire intercelular, mientras que el parénquima de empalizada mostró una mayor habilidad para canalizarla hacia el interior de la hoja.

Un ejemplo de un extraordinario aumento de la capacidad de absorción de luz por medio del fenómeno de la dispersión múltiple ha sido reportado recientemente por **Enríquez et al. (2005)**, caracterizando la capacidad de absorción de luz de superficies de coral intactas. Éstos autores reportan que los dinoflagelados simbiotes dentro del coral *Porites branneri* absorben entre 2 y 5 veces más luz que una suspensión de células de la misma población de dinoflagelados simbiotes extraídos del esqueleto de coral. **Enríquez et al. (2005)** concluyen que el esqueleto de coral por medio de la dispersión múltiple y gracias a los cristales de aragonita, es el que le confiere a los simbiotes esta

extraordinaria habilidad para coleccionar luz. Los corales son capaces de coleccionar más del 95% de la radiación solar incidente, con una densidad de pigmentos casi diez veces inferior a las hojas de plantas terrestres.

En los casos anteriormente descritos se observa claramente que el fenómeno de la dispersión múltiple proporciona una solución evolutiva que contrarresta el empaquetamiento de los pigmentos, al incrementar la capacidad y/o eficiencia de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos.

1.6 Respuesta de los organismos a la variabilidad del campo lumínico.

Los organismos han sido capaces de modificar su desempeño fotosintético dependiendo de las condiciones ambientales, particularmente del campo lumínico al que están expuestos. Las respuestas a las condiciones ambientales son específicas y dependientes de las necesidades de los organismos ante los recursos disponibles, por lo que las características desplegadas varían entre genotipos, poblaciones y especies (**Huner et al., 1998; Sultan, 2000, 2004**). Ante la variabilidad ambiental, los organismos son capaces de desplegar cierta plasticidad fenotípica que se presenta cuando un genotipo es capaz de expresar diferentes fenotipos. La plasticidad fenotípica está influenciada por la trayectoria ontogénica del organismo, ya que en cada etapa del desarrollo se enfrenta a condiciones ambientales distintas (**Callahan & Pigliucci, 2002; Sultan, 2003, 2004**).

La amplia variabilidad de condiciones ambientales a las que se enfrentan los organismos, los induce a desplegar respuestas diferenciales dependientes de la frecuencia de la presión o de la frecuencia de la variación, ya que los organismos expresarán ciertas capacidades aclimatativas (en tiempo ecológico) dentro del rango de variación adaptativo desarrollado (en tiempo evolutivo) (**Huner et al., 1998**). La capacidad de aclimatarse permite a los individuos, dentro de los límites de tolerancia de su genotipo, la expresión de respuestas fisiológicas ante la variabilidad ambiental (**Iglesias-Prieto & Trench, 1997b**). La capacidad foto-aclimatativa se refiere particularmente a la expresión de respuestas fisiológicas frente a la variabilidad del campo lumínico. El proceso fotoaclimatativo es fisiológico y distinto de la adaptación (*sensu* **Björkman, 1981**) que implica un proceso evolutivo (**Falkowski & LaRoche, 1991**), con modificaciones en el organismo a nivel genético (**Huner et al.,**

1998). El proceso fotoaclimatativo comprende respuestas ontogénicas resultado de modificaciones fisiológicas así como bioquímicas a nivel individual (**Iglesias-Prieto & Trench, 1997b**), y ocurre en respuesta a los cambios del campo lumínico de intensidad y distribución espectral (**Falkowski & LaRoche, 1991**). Por otro lado, el proceso adaptativo se refiere a las modificaciones evolutivas de los límites de la capacidad de estas respuestas pero a nivel poblacional (**Iglesias-Prieto & Trench, 1997b**). La fotoaclimatación se realiza a distintos niveles: *i*) morfológico, como cambios en el volumen de la estructura fotosintética, el número y densidad de las membranas tilacoidales, etc.; *ii*) bioquímico, como cambios en el contenido y composición de pigmentos y lípidos; y *iii*) fisiológico, nivel en que los cambios se dan regularmente en los requerimientos mínimos cuánticos para la evolución del oxígeno fotosintético, así como, en la respiración y en la tasa de crecimiento (**Falkowski & LaRoche, 1991**). Las respuestas fotoaclimatativas combinan respuestas a distintos niveles de organización (antena, cloroplasto, tejido, organismo) (**Björkman, 1981; Raven, 1986**) de cualquiera de los componentes del proceso fotosintético como la colecta de luz, la fotoprotección, la separación de cargas, el transporte de electrones y la fijación de carbono (**Iglesias-Prieto & Trench, 1994, 1997a**).

Aunque las respuestas fotoaclimatativas de los organismos son diferenciales debido a la variabilidad del campo lumínico, existen patrones típicos ante la baja irradiancia como: *i*) aumentar la densidad de pigmentos (**Boardman, 1977; Björkman, 1981**), ya sea incrementando el número o tamaño de los PSU (**Falkowski & Dubinsky, 1981; Falkowski & LaRoche, 1991; Iglesias-Prieto & Trench, 1994, 1997ab**); *ii*) variando la distribución, tipo y grosor de los tejidos dentro de las hojas (**Terashima & Saeki, 1983**); *iii*) reduciendo la densidad de haces foliares, por ejemplo en pastos marinos (**Dalla-Via et al., 1998; Dawes, 1998; Olesen et al., 2002; Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005**); *iv*) aumentando la tasa fotosintética a luz subsaturante; *v*) reduciendo la tasa respiratoria para disminuir las pérdidas de carbono; *vi*) reduciendo los requerimientos mínimos cuánticos; e *vii*) incrementando el área foliar total de la planta (**Enríquez et al., 2002; Olesen et al., 2002**). Por lo tanto, a baja luz se realiza una mayor inversión en la estructura responsable de la fase lumínica-fotoquímica del proceso fotosintético, mientras que a alta luz

los cambios se centran en: *i*) mejorar los mecanismos de fotoprotección para favorecer la disipación del exceso de energía absorbida (**Iglesias-Prieto & Trench, 1997a**); *ii*) reducir la sección transversal de absorción; y *iii*) facilitar los procesos enzimáticos (**Knapp & Carter, 1998**) disminuyendo el fotodaño y la fotoinhibición, para mantener una alta tasa fotosintética gracias al mantenimiento operativo del ciclo de reparación del PSII (**Horton, et al., 1996**).

En resumen, la relación entre la respuesta fotoaclimatativa de la estructura fotosintética y la habilidad para capturar luz de los organismos es fuertemente dependiente de la variación en la forma de la hoja, lo que condiciona importantes cambios en la eficiencia para coleccionar luz, y puede también afectar la eficiencia de la asimilación de carbono fotosintético, con importantes consecuencias en el crecimiento y adecuación de la planta (**Ramus, 1990; Enríquez & Sand-Jensen, 2003**).

1.7 Absorción de luz en hojas de fanerógamas marinas. Caso específico de la especie tropical *Thalassia testudinum*.

Los pastos marinos son organismos bénticos, procedentes de ambientes terrestres, que recolonizaron el ambiente marino hace ~90-120 millones de años (**den Hartog, 1970**). Como consecuencia de su adaptación al ambiente marino, desarrollaron una especial anatomía de la estructura foliar. Las hojas de los pastos marinos, en su mayoría, permanecen sumergidas y bajo un régimen salino, por lo que han perdido los estomas y desplegado una cutícula delgada que facilita el intercambio gaseoso y de solutos con el microambiente (**Tomlinson, 1980**). Las hojas han desarrollado una epidermis pigmentada y han perdido el mesófilo especializado de las hojas bifaciales terrestres, al desarrollar un mesófilo no pigmentado, formado por células con grandes vacuolas que delimitan el sistema lacunar. Este nuevo tejido se conoce con el nombre de aerénquima (**Kuo & McComb, 1989**). El pequeño volumen que ocupa la única capa de células epidérmicas que contiene los pigmentos fotosintéticos, induce a pensar que éstos están fuertemente empaquetados, lo que podría implicar una pérdida importante de la eficiencia de absorción de luz de las hojas de los pastos marinos en su adaptación al ambiente marino.

Sobre las propiedades ópticas de las hojas de los pastos marinos existen pocos trabajos. Los primeros reportes fueron los de **Enríquez et al. (1992)** y **Enríquez et al. (1994)**. Estos autores recolectaron diversas especies

de pastos marinos y talos de un gran diversidad de macroalgas localizados en distintas partes del mundo, y realizaron un análisis comparativo de la variación de sus propiedades ópticas. Estos autores encontraron que la eficiencia de absorción de luz decrece conforme incrementa la densidad de pigmentos, es decir, determinaron que los pigmentos dentro de las hojas de pastos marinos están empaquetados y que considerando el mayor rango de variación morfológica de las macrófitas marinas, la variación de la capacidad de absorber luz está fuertemente afectada por el grosor de la estructura fotosintética. Sin embargo, en el trabajo de **Enríquez et al. (1992)** limitado a la comparación de las hojas de los pastos marinos, no encontraron ningún efecto del grosor de la hoja sobre la variación de las propiedades de absorción de luz de éstos.

En estudios más recientes, **Cummings & Zimmerman (2003)** analizaron la variación de la absorptancia P_{AR} y del coeficiente de absorción de pigmentos, en las hojas de los pastos *Thalassia testudinum* y *Zostera marina*. Estos autores encontraron una variación entre 48 y 56% de la absorptancia P_{AR} , y determinaron la existencia de un severo empaquetamiento debido a la estructura de la hoja que restringe los cloroplastos a una delgada epidermis (20% del volumen total, según **Tomlinson, 1980**). Sin embargo, estos autores no consideran que esta pérdida de eficiencia en la absorción de luz de las hojas de los pastos marinos tenga consecuencias en su capacidad de supervivencia y fotoaclimatación. **Enríquez (2005b)** confirmó en su estudio que, los pigmentos en las hojas de *T. testudinum* sufren un fuerte *efecto paquete*, y describe por primera vez la magnitud de este empaquetamiento (factor de escala corregido, *sensu* **Niklas, 1994**, -0.75). Señalando que el empaquetamiento disminuye al aumentar la densidad de pigmentos de un modo ligeramente inferior al que experimentan los pigmentos fotosintéticos en hojas que conservan la anatomía foliar bifacial típica de plantas terrestres, como son las hojas de la planta anfibia, *Mentha aquatica* cuyo factor de escala (factor de escala corregido, *sensu* **Niklas, 1994**), fue reportado de -0.85 a -0.90 (**Enríquez & Sand-Jensen, 2003**). Aunque esta caída de la eficiencia de absorción de los pigmentos en las hojas de *T. testudinum* es ligeramente inferior a la reportada para *M. aquatica* y aunque los valores del coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* reportados para las hojas poco pigmentadas de *T. testudinum* fueron mucho mayores que los valores más

altos determinados para *M. aquatica* por **Enríquez & Sand-Jensen (2003)**, **Enríquez (2005b)** encontró que las hojas de *T. testudinum* son menos eficientes para absorber luz, en promedio 38%, que las hojas de *M. aquatica*. Este resultado podría indicar que la nueva anatomía foliar desarrollada por los pastos marinos en su adaptación al medio marino ha supuesto una pérdida significativa de eficiencia en la capacidad de los pigmentos para absorber luz (**Enríquez, 2005b**). Sin embargo, al comparar en el mismo estudio la eficiencia de absorción de luz de las hojas de *M. aquatica* con la eficiencia de las hojas de 12 especies de pastos marinos, incluyendo a *T. testudinum*, esta autora encontró que los pastos marinos de zonas templadas presentan una mayor eficiencia para absorber luz (1.4 veces mayor), con similares densidades de pigmentos, que las hojas de *M. aquatica* (**Figura 4**), por lo que no se puede concluir que la anatomía foliar de los pastos marinos haya conducido necesariamente a un aumento del efecto paquete de sus pigmentos.

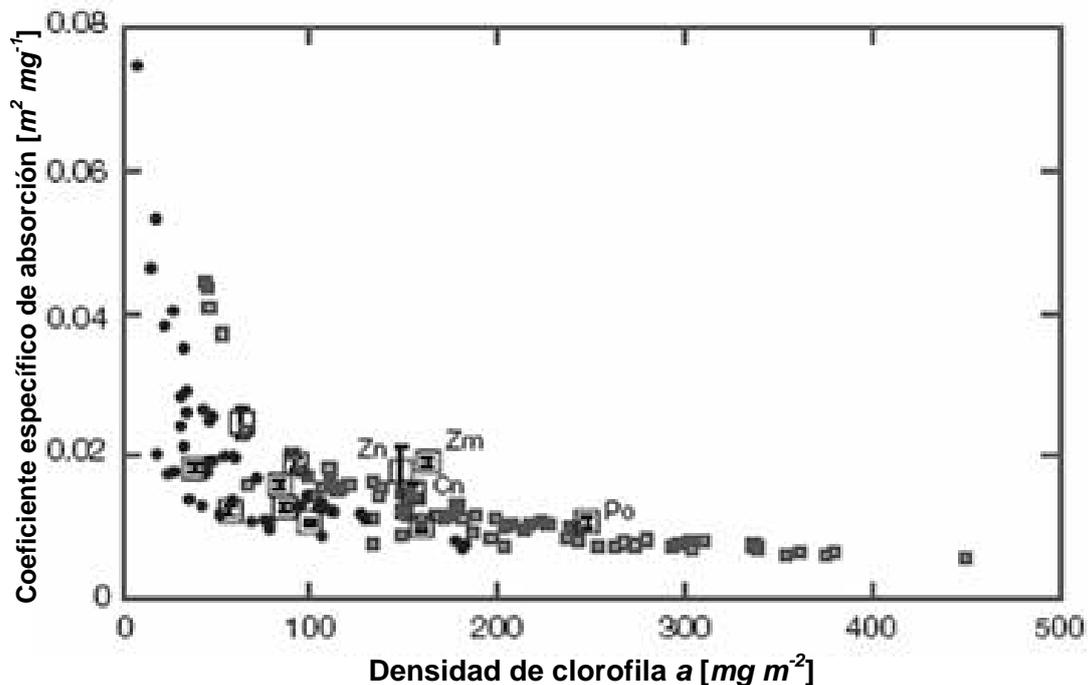


Figura 4. Variación del coeficiente específico de absorción, a^*_{680} , en función de la variación de la densidad de clorofila a, para hojas de *Thalassia testudinum* (círculos negros) y *Mentha aquatica* (cuadros blancos). Los cuadros grandes blancos y las barras verticales, media \pm D.E., son valores de a^*_{680} para 12 pastos marinos y para *Posidonia oceanica*, Po., *Cymodosea nodosa*, Cn., *Zostera marina*, Zm. y *Z. noltii*, Zn. Tomada de Enríquez, 2005b.

Los resultados sugirieron que la anatomía desarrollada por los pastos marinos es capaz de contrarrestar eficientemente el efecto paquete gracias al

esparcimiento múltiple en el interior del tejido, particularmente del sistema lacunar y, por tanto, podría contribuir significativamente a mejorar la capacidad y eficiencia de absorción de luz de los pigmentos. ¿Cómo consigue el tejido foliar de los pastos marinos mejorar su habilidad para absorber la luz de los pigmentos fotosintéticos? Esta es precisamente la pregunta planteada en el presente estudio y para contestarla se propone realizar un análisis comparativo de la variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de las hojas de *Thalassia testudinum*, en función de la variación de su morfología foliar y su densidad de pigmentos. Para ello fue necesario generar en primer lugar una base de datos suficientemente amplia, capaz de recoger la variabilidad natural que experimentan estas hojas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos a lo largo de un gradiente de profundidad. La descripción de la existencia de cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas de *T. testudinum* (Dobbs *et al.*, 2004) que se reportó durante el desarrollo inicial de la colecta de datos, obligó a incluir en este estudio el análisis de la posible contribución de estos cristales a mejorar la capacidad y eficiencia para absorber luz de los pigmentos fotosintéticos a través de la dispersión múltiple, como sugirió Enríquez (2005b) e indican Franceschi & Nakata (2005) como una de las posibles funciones de la presencia de los cristales de oxalato cálcico en las hojas de plantas terrestres.

1.8 Variación natural del campo lumínico de las hojas de los pastos marinos.

Las hojas de los pastos marinos están expuestas a un campo lumínico cambiante debido a la variación de la disponibilidad de luz a tres niveles: i) dentro de la columna de agua por los cambios de la irradiancia en profundidad; ii) dentro del dosel de cada pradera; y iii) por el efecto de los epífitos que incrementan su densidad hacia las zonas más viejas de la hoja (Dalla-Via *et al.*, 1998; Cebrián *et al.*, 1999; Enríquez *et al.* 2002, Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005, Enríquez, 2005b; Collier *et al.*, 2007).

Las primeras medidas directas de la variación que experimenta el campo lumínico en el interior del dosel de los pastos marinos la realizaron Enríquez *et al.* (2002) sobre una pradera somera dominada por *Thalassia testudinum* en una laguna arrecifal. En dicho estudio se encontró que el 80% de la luz

incidente se atenúa en los primeros cinco centímetros dentro del dosel de *T. testudinum*, por lo que solo el 1% de la irradiancia alcanza el sedimento. **Enríquez et al. (2002)** demostraron que la atenuación de luz dentro del dosel de las hojas de *T. testudinum* puede generar una variación en unos pocos centímetros (~20cm) de hasta tres ordenes de magnitud, lo que condiciona fuertemente la respuesta fotoaclimatativa a lo largo de la hoja. Así mismo, se estimó que un segmento de la base de la hoja, al crecer, experimenta un incremento del campo lumínico del 2%, considerando una tasa de elongación de 0.4cm día^{-1} (**Olivé et al., 2005**).

En función de la variabilidad del campo lumínico, los pastos marinos han desarrollado estrategias específicas para compensar los cambios tanto diurnos (**Enríquez et al., 2002**) como estacionales (**Alcoverro et al., 1995; Enríquez et al., 2004**). Las respuestas fotoaclimatativas de los pastos se pueden presentar a nivel de hoja (i.e., membrana fotosintética, tejidos), haz (organismo completo, i.e., número de hojas, altura del haz) y estructura poblacional (i.e., densidad de haces, biomasa) (**Olesen et al., 2002**). **Dalla-Via et al. (1998)** compararon la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *Posidonia oceanica* procedentes de dos praderas, situadas a diferentes profundidades (3 y 10m) y de segmentos de hojas situados a diferentes niveles dentro del dosel, encontrando que con una diferencia de profundidad de siete metros, se inducen respuestas similares a las que se encuentran en una variación de apenas unos centímetros dentro del dosel. Éstos autores explican estas similitudes como una respuesta estructural natural de las praderas de *P. oceanica* situadas a mayor profundidad y, por tanto, a baja luz, de reducir la densidad de haces y la longitud total de las hojas para compensar la atenuación de luz en la columna de agua y aumentar la intensidad lumínica foliar en el interior del dosel. La disminución de la densidad de haces con el aumento de la profundidad también se ha reportado para distintas praderas de pastos marinos (i.e, **Dawes, 1998; Olesen et al., 2002; Olivé et al., 2005; Collier et al., 2007**). **Olesen y colaboradores (2002)** sugirieron que en praderas de pastos marinos con alta densidad de biomasa foliar, la aclimatación en profundidad puede estar influenciada tanto por la atenuación de luz en la columna de agua, como por los cambios del campo lumínico dentro del dosel, determinando que tanto *Posidonia oceanica* como *Cymodocea nodosa* redujeron la densidad de haces

al incrementarse la profundidad. **Olesen et al. (2002)** sugirieron que esto puede explicar la ausencia de patrón en profundidad de la respuesta fisiológica de la hoja en especies de mayor tamaño como *P. oceanica*. **Olivé et al. (2005)** aportan por primera vez una descripción de la variación del campo lumínico en el interior del dosel asociada a la variación de la morfología de la pradera con la profundidad, indicando que la disminución exponencial de la densidad de haces con la profundidad es una respuesta fotoaclimatativa de la pradera para reducir la autosombra de las hojas y homogenizar el campo lumínico en el interior del dosel. Esta homogenización del campo lumínico sería la responsable de la falta de asociación entre la respuesta fisiológica de la hoja y la profundidad. Sin embargo, **Cayabyab & Enríquez (2007)** examinando en mesocosmos la plasticidad de la respuesta fisiológica de las hojas de *Thalassia testudinum*, concluyen que las hojas de esta especie presentan además una limitada habilidad fotoaclimatativa para ajustar su aparato fotosintético a condiciones lumínicas de alta irradiancia, comportándose como una planta con una fisiología *adaptada*, en sentido Darwiniano, a baja luz. Su gran éxito ecológico en ambientes someros y fuertemente iluminados como el Caribe, lo explican gracias a la habilidad del dosel de regular el campo lumínico en su interior, lo que permite disminuir el fotodaño y la sobre-exposición de gran parte de su superficie foliar y reducir los costos por fotodaño.

En resumen, en estos trabajos se ha concluido que las hojas de los pastos marinos sufren el efecto paquete, y que éste varía en función de la variabilidad de la densidad de pigmentos por unidad de área (**Enríquez et al., 1992, 1994; Cummings & Zimmerman, 2003; Enríquez, 2005b**). También se ha concluido que las respuestas fotoaclimatativas de las hojas están fuertemente reguladas no sólo por la atenuación de luz en la columna de agua sino por el efecto del dosel de los pastos marinos en la atenuación de luz que llega a la hoja (**Dalla-Via et al., 1998; Dawes, 1998; Enríquez et al., 2002; Olesen et al., 2002; Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005; Olivé et al., 2005**).

Atendiendo a esto, este estudio que pretende también describir el patrón morfológico de variación de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *Thalassia testudinum*, va a considerar dos gradientes de variación del campo lumínico, uno determinado por la columna de agua en un gradiente de profundidad y definido por el coeficiente de atenuación de luz de la columna de

agua, y otro determinado por el dosel de cada pradera y definido por el coeficiente de atenuación de luz dentro del dosel de la pradera (**Enríquez *et al.*, 2002; Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005**).

II. Objetivos.

2.1 Objetivo General:

Analizar el efecto de la morfología foliar sobre la capacidad y eficiencia de absorción de luz de los pigmentos en las hojas de *Thalassia testudinum*, así como, determinar la posible asociación de la presencia de los cristales de oxalato de calcio en las células epidérmicas de las hojas de esta especie, con las propiedades ópticas de sus hojas.

2.2 Objetivos Particulares:

1. Describir la variabilidad del contenido de pigmentos, la morfología foliar y la capacidad y eficiencia de absorción de luz de las hojas de *T. testudinum* en seis praderas de la laguna de Puerto Morelos, situadas a lo largo de un gradiente de luz en profundidad.
2. Examinar las asociaciones de variación y determinar patrones (relaciones alométricas) entre los descriptores morfológicos y los descriptores funcionales de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de las hojas de *T. testudinum*.
3. Describir la variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de segmentos de hojas maduras de *T. testudinum* en dos gradientes de luz, tanto en profundidad como dentro del dosel de la pradera.
4. Describir la variación de la morfología foliar de la hoja madura de *T. testudinum* a lo largo de dos gradientes de luz, tanto en profundidad como dentro del dosel de la pradera.
5. Analizar la plasticidad fotoaclimatativa de las hojas de *T. testudinum* y de su patrón de variación con los cambios observados en la disponibilidad de luz.
6. Determinar la capacidad de los cristales de oxalato de calcio de las células epidérmicas de *T. testudinum* para mejorar la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos.

III. Área de estudio.

El estudio comparativo general, así como, la determinación del papel de los cristales de oxalato cálcico sobre las propiedades ópticas de las hojas de *Thalassia testudinum*, no dependen de las condiciones ambientales de un determinado ecosistema, y por tanto, no requieren de la descripción de un área específica de estudio. Sin embargo, el análisis de la variación de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de esta especie si puede ser dependiente de las condiciones específicas de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, por lo que a continuación se describen las características de este ecosistema acuático costero.

3.1 Descripción de la laguna arrecifal de Puerto Morelos.

La laguna arrecifal de Puerto Morelos esta localizada en la costa noroeste de la Península de Yucatán (21°00'00" y 20°48'33" latitud N y 86°53'14.40" y 86°46'38.94" longitud O). La laguna está situada a ~25km de Cancún y limita hacia el este con la barrera arrecifal que es paralela a la costa y tiene ~4km de longitud. La anchura de la laguna fluctúa entre los 350 y 1600m, tiene una profundidad entre 3 y 4m, con un máximo de 8m en la zona sur (**Figura 5, Merino & Otero, 1991**).

El tipo de clima de la región es Ax' (w_o) iw'', cálido subhúmedo, con lluvias importantes entre verano e invierno. La temperatura promedio del aire es de 26.9°C (**García, 1973**), con un máximo de 33.5°C y mínimo de 12.7°C (**Ruíz-Rentería et al., 1998**). La precipitación anual es de 1,106.3mm (**García, 1973**), aunque varía ampliamente entre años (**Ruíz-Rentería et al., 1998**). La zona esta bajo la influencia de los vientos alisios durante el verano y recibe fuertes vientos del norte en el invierno (**Ruíz-Rentería et al., 1998**), además se encuentra bajo amenaza de afectación por huracanes durante los meses de julio a noviembre.

En la parte oceánica, la corriente de Yucatán circula paralelamente a la plataforma continental de Puerto Morelos, su velocidad presenta un ciclo anual, siendo mayor en primavera y menor en otoño (**Merino, 1992; Coronado et al., 2007**). El régimen de mareas corresponde al tipo mixto semidiurno, de baja amplitud (0.24m) (Instituto de Geofísica, 1992 en **Ruíz-Rentería et al., 1998**).

La circulación dentro de la laguna es principalmente paralela a la costa, sin embargo, la velocidad y dirección de las corrientes cambia durante las diferentes estaciones del año por la influencia de la corriente de Yucatán, así como, por el viento y oleaje que atraviesa la barrera arrecifal hacia el interior de la laguna (**Ruíz-Rentería *et al.*, 1998, Coronado *et al.* 2007**).

La plataforma de Yucatán corresponde a una llanura de relieve moderado, constituido por sedimentos carbonatados (**Carranza-Edwards *et al.*, 1975**) biogénicos, con un contenido cercano al 70% de carbonato de calcio, reflejo de la presencia de arrecifes de coral (**De la Lanza, 1991**). Estos biogénicos están constituidos principalmente por foraminíferos bentónicos y planctónicos, así como, por gasterópodos, pelecípodos, briozoarios, moluscos, corales, espinas de equinodermos y de esponjas, tubos de anélidos, ostrácodos y algas (**Nolasco-Montero & Carranza-Edwards, 1988**). La plataforma pertenece a la Unidad IV según la clasificación de **Carranza-Edwards *et al.* (1975)** y según Shepard (1973, en **Carranza-Edwards *et al.*, 1975**) a costas de tipo primario, por erosión terrestre, con topografía cárstica sumergida y costas secundarias. Éstas características geológicas de la Plataforma de Yucatán hacen que la precipitación se infiltre rápidamente a través del suelo y no se presenten ríos superficiales (**Carranza-Edwards *et al.*, 1975**).

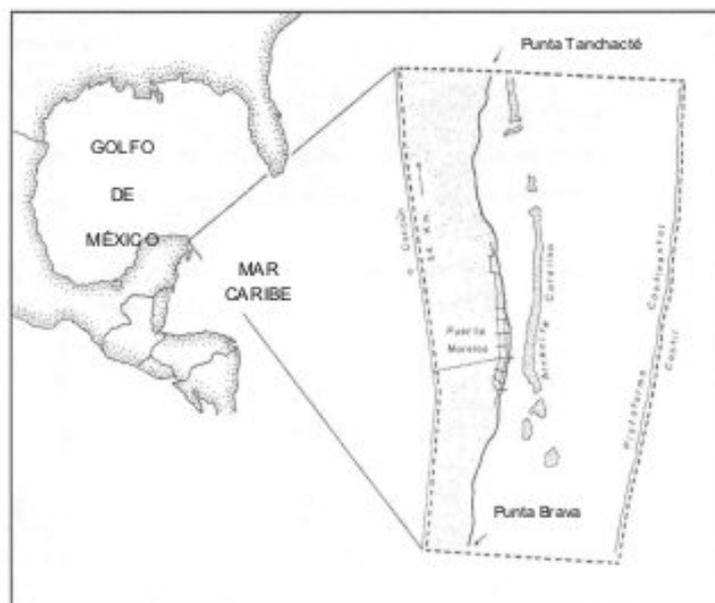


Figura 5. Ubicación de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Q. Roo. Tomada de Merino & Otero, 1983.

El fondo de la laguna arrecifal de Puerto Morelos esta formado por

sedimento calcáreo, el cual está estabilizado por la pradera de pastos marinos de *Thalassia testudinum*. En algunas zonas el fondo calcáreo está expuesto y se encuentran colonias de corales, mientras que en otras, está formado solamente por sedimento carbonatado no consolidado (**Ruíz-Rentería et al., 1998**).

Merino & Otero (1991) clasificaron a la laguna como oligotrófica, con bajos niveles de nitritos ($0.064 \mu\text{g-at L}^{-1}$), nitratos ($13.92 \mu\text{g-at L}^{-1}$), amonio ($0.088 \mu\text{g-at L}^{-1}$) y fosfatos ($0.46 \mu\text{g-at L}^{-1}$). Sin embargo el fuerte desarrollo turístico que ha experimentado esta zona ha provocado un fuerte enriquecimiento de nutrientes cerca de los núcleos urbanos y Resorts hoteleros, todavía sin determinar. La salinidad (34.34-36.83%) y temperatura del agua (24.75-32.85°C) son relativamente homogéneas dentro de la laguna y las variaciones más importantes que se registran están relacionadas con la transparencia dentro de la columna de agua (**Ruíz-Rentería et al., 1998**).

La resuspensión de sedimentos por acción del oleaje domina la variación espacial y temporal de la atenuación de luz en el agua [Kd m^{-1}] (**Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005**), ya que la carga orgánica disuelta del agua es muy baja y sólo en algunos momentos puntuales se ha podido detectar clorofila *a* en la columna de agua que no llega a mantenerse en el tiempo (**Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005**). Únicamente durante la época de lluvias se ha observado este incremento en la clorofila *a* en el agua, y localizado en las proximidades de descargas de agua hacia la laguna arrecifal desde el manglar, lo que indica que no se trataba de florecimientos locales de fitoplancton sino que era una comunidad fitoplanctónica procedente del manglar y con escasa viabilidad en la laguna arrecifal (**Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005**).

El tipo de vegetación que domina la laguna arrecifal son las praderas de pastos marinos, particularmente la presencia de la especie *Thalassia testudinum* y en menor proporción *Syringodium filiforme* y *Halodule wrightii*. También son importantes alrededor de 18 especies de algas pertenecientes a los géneros *Avrainvillea*, *Caulerpa*, *Dictyota*, *Halimeda*, *Laurencia*, *Lobophora*, *Penicillus*, *Rhipocephalus* y *Udotea* (**Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005**). Los corales representativos son *Acropora palmata*, *Millepora complanta*, *Montastraea annularis*, *Diploria strigosa*, *Montastraea cavernosa* y *Dichocoenia stokesii* (**Ruíz-Rentería et al., 1998**).

3.2 Descripción del área de estudio.

Para el análisis de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas del pasto marino *Thalassia testudinum* se eligió una zona que presentaba una pradera continua del litoral al centro de la laguna, y que se encuentra a 1.5km al sur de la Unidad Académica Puerto Morelos (UAPM-UNAM), cercana al antiguo muelle de la Ceiba. Se establecieron seis sitios de muestreo perpendiculares a la costa en función del gradiente de profundidad de la columna de agua, el sitio somero fue el A y el de mayor profundidad el F (**Tabla 1, Figura 6**). Las distancias entre los sitios no fueron proporcionales, ya que fueron elegidos para observar el patrón de variación de la respuesta fotoaclimatativa de toda la pradera, no sólo de la hoja, que sigue una función exponencial de atenuación de luz, y por tanto produce una variación mucho más rápida en los primeros metros de profundidad. De este modo, entre los seis sitios elegidos las primeras praderas estuvieron más cercanas entre ellas, que las que se encuentran a mayor profundidad.

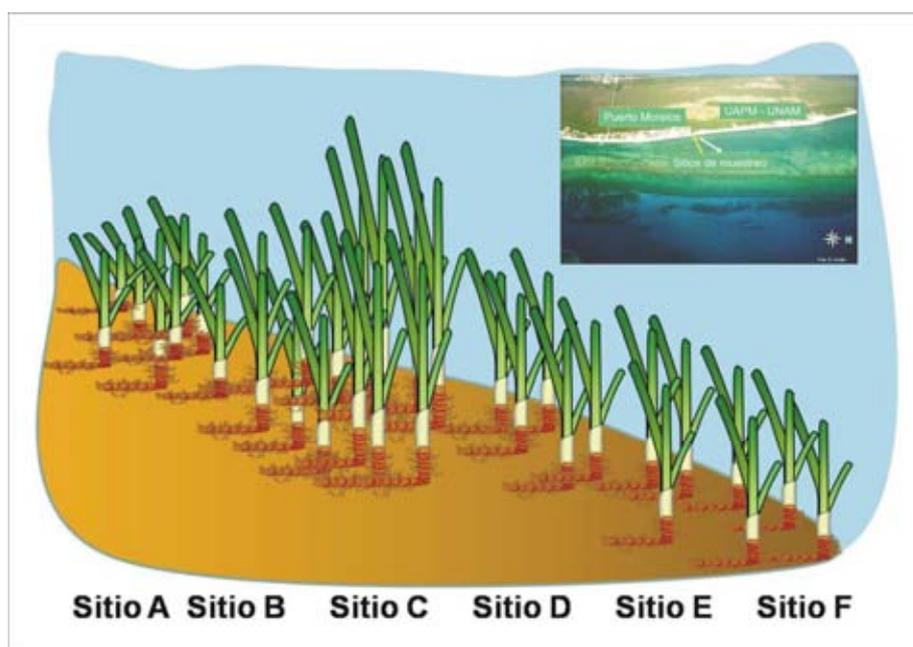


Figura 6. Ubicación de los sitios seleccionados en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Se muestra el poblado de Puerto Morelos y la Unidad Académica Puerto Morelos, UNAM.

Olivé y colaboradores (2005) simultáneamente con éste estudio, determinaron algunas variables morfométricas de las praderas seleccionadas en cada sitio, como la altura del dosel, la densidad de haces, el tamaño del haz, la variación de biomasa subterránea y su distribución en los distintos componentes de la planta, entre otros. Según esta descripción, se observó la mayor altura del dosel en la pradera C que fue 2.8 veces más alta que el valor

mínimo encontrado en la F (Tabla 1, Figura 7), y una disminución exponencial de la densidad de haces (Olivé *et al.*, 2005).

Tabla 1. Características morfológicas de las praderas seleccionadas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (Olivé *et al.*, 2005).

Pradera	Profundidad [m]	E_s superficie dosel [%]	Altura dosel [m]	K_d dosel [m^{-1}]
A	0.5	85.6	0.11	10.99
B	0.8	88.8	0.21	8.90
C	1.3	81.6	0.28	3.85
D	1.5	77.6	0.23	5.28
E	2.5	62.8	0.18	5.67
F	4.0	49.6	0.10	3.46

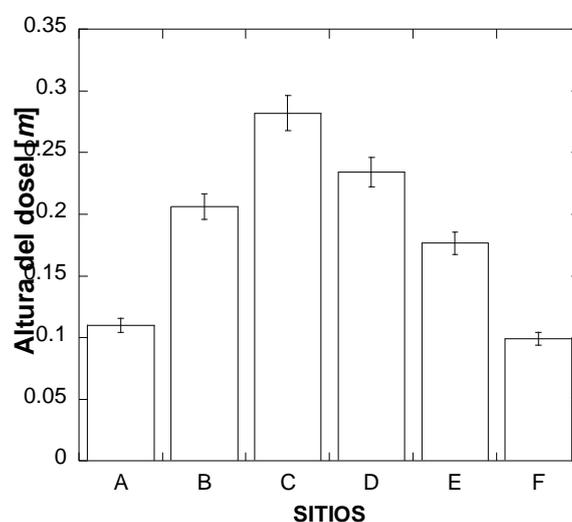


Figura 7. Variabilidad entre praderas de la altura del dosel (Olivé *et al.* 2005).

En el estudio de Olivé *et al.* (2005) también se determinó la irradiancia relativa en la superficie del dosel de cada pradera (% de Irradiancia en la superficie del dosel, E_s) en función de la atenuación de luz en la columna de agua [$k_{d_{agua}} m^{-1}$] y los coeficientes de atenuación del dosel de cada pradera [$k_{d_{dosel}} m^{-1}$], que variaron fuertemente en función de los cambios observados en la morfología de la pradera.

El $k_{d_{agua}}$ que se utilizó en este estudio ($k_{d_{agua}} = 0.20 \pm 0.04 m^{-1}$) correspondió al valor mínimo cuando el oleaje no es perceptible, la resuspensión de sedimentos es mínima y las condiciones lumínicas son estables. Bajo estas mismas condiciones Olivé *et al.* (2005) determinaron los coeficientes de atenuación de luz del dosel siguiendo la metodología desarrollada por Enríquez y Pantoja-Reyes (2005), lo que permite estimar

condiciones de máxima penetración de luz y hacer comparables las medidas de luz entre praderas, pues este parámetro es extraordinariamente variable en zonas someras (**Enríquez y Pantoja-Reyes, 2005**).

La irradiancia relativa en la superficie del dosel de las praderas muestreadas varió de 85.6% en el sitio A, a 49.6% en el F (**Tabla 1, Figura 8ab**).

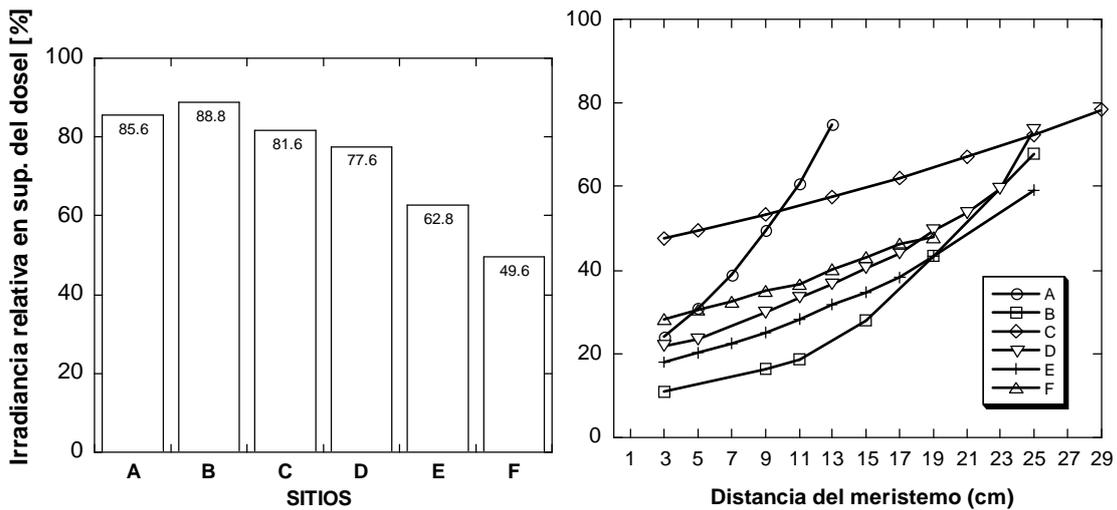


Figura 8. Variabilidad de la irradiancia relativa a) en la superficie del dosel, y b) dentro del dosel de cada pradera.

Enríquez & Pantoja-Reyes (2005) determinaron la dependencia de la magnitud del gradiente lumínico dentro del dosel de *T. testudinum* de descriptores de la morfología de la pradera como la densidad de biomasa foliar, el Leaf Area Index (LAI) o la densidad de haces foliares. La atenuación de luz medida como $K_{d_{dosel}} [m^{-1}]$ describe el campo de luz dentro del dosel y es un buen descriptor de la magnitud del autoensombreamiento de las hojas dentro del dosel de los pastos marinos, aunque no describe propiamente el campo lumínico foliar de las hojas. El estudio de **Olivé et al. (2005)** confirmó la relación entre la atenuación de luz dentro del dosel y la variación de la densidad de haces, y describe una asociación positiva y significativa entre ellas ($r=0.92, p<0.01$) (**Figura 9**).

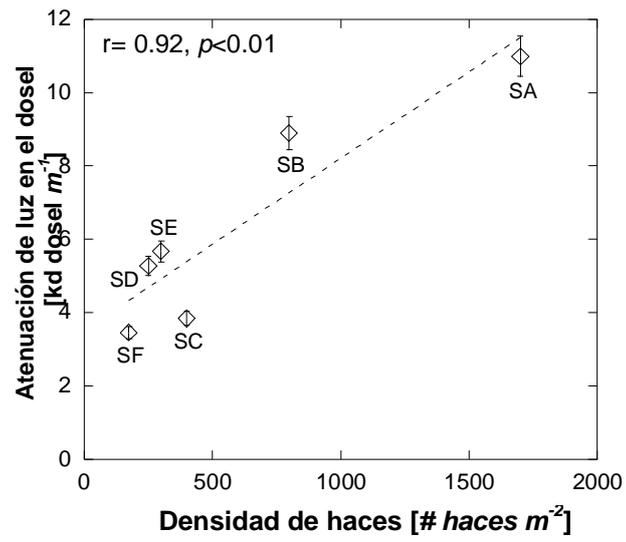


Figura 9. Variabilidad de la atenuación de luz dentro del dosel *versus* la densidad de haces.

IV. Materiales y Métodos.

4.1 Colecta de los haces foliares de *Thalassia testudinum*.

Los haces foliares de *Thalassia testudinum* se colectaron con un nucleador de acero de 50cm de diámetro, para obtener las hojas y raíces completas. A los haces se les retiró el exceso de sedimento *in situ*, lavándolos cuidadosamente con agua de mar. Posteriormente se colocaron en bolsas de plástico negras, para evitar la sobreexposición a la luz. Las muestras se introdujeron en hieleras para transportarlas al laboratorio, en donde se mantuvieron con una cantidad suficiente de agua de mar con bombeo de aire, así como, a temperatura ambiente y cubiertas del exceso de luz. El material biológico se utilizó en la determinación de los descriptores ópticos y algunos descriptores morfológicos hasta cuatro días posteriores a la colecta. Para el resto de los análisis las muestras fueron conservadas en refrigeración, a -70°C para la extracción de pigmentos y a 4°C para el análisis morfológico.

De cada haz foliar se seleccionó la hoja dos, que corresponde a una hoja madura que no presenta casi lesiones o cobertura por epífitas. Aunque la cobertura de epífitas fue mínima, para evitar interferencias en las determinaciones ópticas y del contenido de pigmentos, las hojas se rasparon cuidadosamente con ayuda de una navaja de rasurar. Cada hoja, independientemente de su longitud total, se dividió en segmentos de dos centímetros.

4.2 Determinación de los descriptores ópticos de las hojas.

En este estudio se utilizaron dos metodologías para determinar la absorción de luz de los segmentos de hoja. Las dos metodologías están basadas en determinaciones de luz transmitida, T . La primera, la metodología más sólida, requiere del uso de un espectrofotómetro equipado con un difusor de luz u *opal-glass* (Shibata, 1959), y permite obtener un espectro de absorción de luz, con una resolución espectral de un nanómetro a lo largo del rango del espectro visible (380–725nm), de segmentos de hojas intactas. Esta metodología ya ha sido utilizada con anterioridad en numerosas ocasiones para examinar las propiedades ópticas de las hojas de los pastos marinos (Enríquez *et al.*, 1992; Enríquez *et al.*, 1994; Enríquez *et al.*, 2002; Enríquez, 2005b; Cayabyab &

Enríquez, 2007), macrófitas acuáticas (Enríquez *et al.*, 1994; Enríquez & Sand-Jensen, 2003, Colombo-Pallota *et al.*, 2006) e incluso superficies intactas de coral (Enríquez *et al.*, 2005). La segunda aproximación no ofrece resolución espectral sino un valor promedio en el rango del PAR (400-700nm), pero permitió implementar un nuevo método de determinación de la absorptancia promedio en el PAR, muy útil y accesible para determinaciones en el campo, así como, para laboratorios que no están equipados con un espectrofotómetro capaz de hacer determinaciones de muestras altamente dispersivas. En este estudio se comparan ambos métodos y se ofrece por primera vez un método alternativo para las determinaciones de absorptancia y su validación con respecto a la aproximación de Shibata (1956).

4.2.1 Método espectrofotométrico.

Las medidas de absorción de luz o absorbancia, D (en este estudio el término absorbancia se utiliza como sinónimo de *atenuancia*, el cual describe la cantidad de energía absorbida por un medio no-homogéneo que produce esparcimiento), se obtuvieron de los segmentos de hoja de dos centímetros de longitud. Los segmentos se colocaron en celdas de plástico (3ml) para espectrofotómetro (paso óptico=1cm) y se fijaron en la pared de la celda con un soporte plástico. Las celdas se rellenaron con agua de mar filtrada. Como blanco de referencia y para corregir la absorción de la hoja sin pigmentos, se utilizaron segmentos de hojas blanqueadas (sin pigmentos), colectadas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos durante el verano. Las hojas blanqueadas se mantuvieron en el laboratorio hidratadas con agua destilada.

La absorción de luz se determinó con la técnica del opal-glass desarrollada para hojas intactas de plantas por Shibata (1956). Ésta técnica consiste en colocar un difusor de luz entre las celdas (blanco de referencia y muestra) y el fotomultiplicador. La absorción de luz se determinó en intervalos de un nanómetro entre los 350 y 750nm en un espectrofotómetro Aminco, DW2 (USA), controlado por un sistema colector de datos (OLIS, USA) (Figura 10).

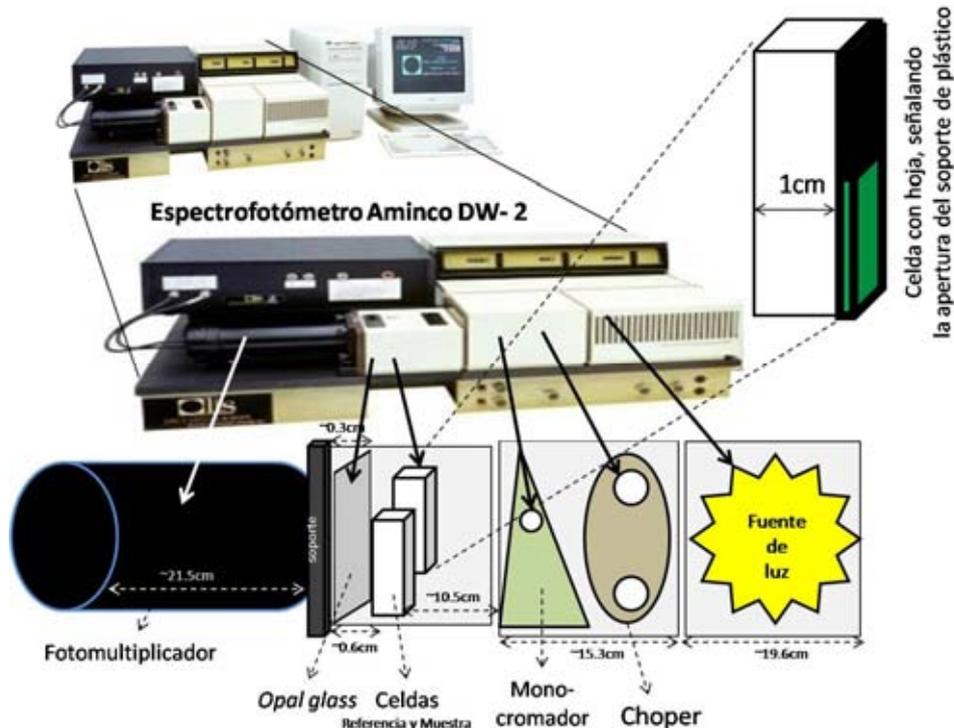


Figura 10. Arreglo óptico del espectrofotómetro Aminco (DW-2) controlado por el sistema colector de datos Olis, mostrando la posición de la hoja (muestra) en la celda.

Se utilizaron dos descriptores de la absorbancia: *i*) el promedio de la absorción de luz para el rango entre 400 y 700nm (PAR, luz fotosintéticamente activa) y *ii*) el valor a 680nm, que corresponde al pico de absorción en el rojo para la clorofila *a*, donde la interferencia con los pigmentos accesorios es mínima.

Se calculó la capacidad de absorción de luz a partir de los datos de absorbancia, *D*, utilizando la expresión:

$$A = 1 - R - 10^{-D}, \quad (1)$$

donde *A* es la absorptancia (fracción de luz incidente que es absorbida) y *R* es la reflectancia difusa (fracción de luz incidente que es reflejada). En nuestros cálculos utilizamos valores porcentuales de *R* de 5.5% en el intervalo del PAR y de 4.9% para una longitud de onda de 680nm (Enríquez, 2005b).

Conociendo la cantidad de pigmentos en las hojas, se calculó el coeficiente específico de absorción referido a pigmentos (Morel & Bricaud, 1981) a^* [cm^2/g], según la ecuación (Enríquez *et al.*, 2005):

$$a * \frac{D \ln 10}{\rho},$$

(2)

donde ρ [g/cm^2] es la densidad de pigmentos por área proyectada y el factor de $\ln 10$ aparece al transformar logaritmos de base e en logaritmos de base 10.

4.2.2 Método alternativo, implementado con un sensor de luz acoplado a un fluorómetro.

Estas medidas de transmisión de luz, también se realizaron sobre segmentos de hojas de dos centímetros, utilizando el sensor de luz plano corregido por coseno de 3mm de diámetro, del fluorómetro Diving-PAM (Walz, Alemania). El arreglo óptico o geométrico consistió de una base en donde se fijó el sensor de luz, sobre la base del sensor de luz se puso una pinza de plástico que mantuvo la muestra inmóvil, mientras se realizaban las determinaciones de transmitancia, T , y permitió mantener una distancia fija entre la muestra, la fuente de luz y el sensor de luz. Como fuente de luz se utilizó una lámpara fluorescente a una distancia también fija de la muestra y del sensor de luz (**Figura 11**). Es importante señalar que las distancias entre estos tres elementos, sensor de luz, muestra (hoja) y lámpara se mantuvieron constantes, pues pequeñas variaciones pueden alterar la cantidad de luz que incide sobre el sensor (i.e, pérdidas de luz) y, consecuentemente, las medidas de T .

Con este arreglo óptico, se determinó el flujo total de la irradiancia [E_0], cuando el sensor registraba el total de luz recibida (sin hoja), así como, del flujo transmitido [E_T], cuando el sensor registraba el flujo que se transmitía a través del segmento de hoja colocado sobre el sensor (**Figura 11**).

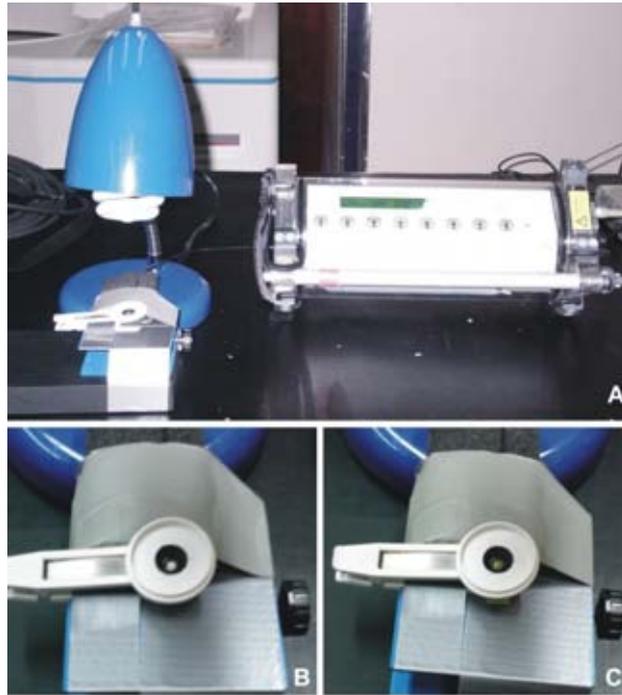


Figura 11. a) Arreglo óptico del sensor de luz plano corregido por coseno, se presenta la muestra (hoja) y la lámpara, midiendo b) la luz transmitida sin hoja, E_0 , y c) con hoja, E_T (Fotos L. Legaria-Moreno).

Se calculó la absorptancia, A , a partir de los valores de transmitancia, T , de la hoja pigmentada:

$$T = \frac{E_T}{E_0}, \quad (3)$$

donde E_0 representa la irradiancia total (sin hoja) y E_T es la irradiancia transmitida a través de la hoja pigmentada (con hoja).

La absorptancia, A , se estimó a partir de este valor como:

$$A = 1 - \frac{E_T}{E_0}. \quad (4)$$

Asumiendo que la R es insignificante y que la T medida de esta forma es una buena aproximación al valor de la luz transmitida por la hoja. Sin embargo, ninguno de los dos supuestos es cierto, pues este sistema de medición tiene un importante componente de esparcimiento que reduce el flujo de luz transmitida que llega al pequeño sensor de luz, y no considerarlo conllevaría a una sobrevaloración de la absorptancia, A , de la hoja. Por ello, a los valores de A , así estimados, se les restó la fracción de luz transmitida, T_0 , por la hoja

blanqueada (sin pigmentos), como un descriptor de este componente de esparcimiento, que incluía las pérdidas por reflectancia, y que asumimos tenía un valor constante. Este valor fue en promedio porcentual $13.9\% \pm 0.01\%$ ($n=9$; 0.139 en valores de transmitancia).

$$A = 1 - \frac{E_T}{E_0} - T_0,$$

(5)

donde T_0 es la transmitancia de la hoja blanqueada.

El coeficiente específico de absorción referido a pigmentos, a^* , se calculó según la ecuación 2, a partir de las estimas de absorbancia, D , obtenidas de los valores de absorptancia, A , según la ecuación:

$$D = -\log_{10}(1 - A).$$

(6)

4.2.2.1 Cálculo de la absorptancia de las hojas blanqueadas (sin pigmentos).

Los valores de absorptancia, A , de las hojas blanqueadas se obtuvieron haciendo mediciones de transmitancia, T , a segmentos de hojas con distintos grosores y características (presencia significativa de un refuerzo estructural en forma de fibra que se observa en la hoja blanca como puntos negros). Los valores de estas medidas se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de las hojas blanqueadas y su valor de absorptancia.

	Hojas sin pigmentos	Absorptancia [%]
1	Sin puntos y Gruesa	15.60
2	Sin puntos y Gruesa	17.20
3	Sin puntos y Gruesa	17.60
4	Sin puntos y Gruesa	15.94
5	Sin puntos y Delgada	8.76
6	Sin puntos y Delgada	12.45
7	Con puntos negros y Gruesa	14.51
8	Con puntos negros y Gruesa	14.17
9	Con puntos negros y Delgada	9.20

El valor promedio obtenido de este componente de esparcimiento fue de $13.94\% \pm 1.07\%$ (D.E.). Se observaron en esta primera aproximación diferencias asociadas al grosor de la hoja, pero estas diferencias no parecían estar relacionadas con la presencia o no del refuerzo estructural. En el modelo

más simple se asumió como constante este componente de esparcimiento, y el promedio estimado se restó a todas las estimaciones de la absorptancia realizadas con el sensor de luz plano corregido por coseno.

4.2.3 Validación del método alternativo.

Para validar la utilidad de este método en las determinaciones de absorptancia, A de segmentos de hojas de pastos marinos, se realizó la comparación de las dos determinaciones de A , con cada uno de los métodos empleados (espectrofotómetro y sensor de luz). Para esto, se tomaron 46 segmentos de hoja de dos centímetros de longitud y un rango amplio de variación en su contenido de pigmentos. Se registró inicialmente la absorbancia, D , en el espectrofotómetro y, posteriormente, la transmitancia, T , con el sensor de luz. Con los datos obtenidos de ambos métodos y aplicando las consideraciones descritas anteriormente, se calcularon los valores de A promedio en el PAR.

Para explorar la asociación entre los dos grupos de datos se aplicó un análisis de regresión lineal simple. Los resultados del análisis mostraron una fuerte asociación entre ellos ($R^2=0.94$), con un valor de la pendiente de 1.07 ± 0.04 (t-student, $p < 0.001$) que indica que los cambios determinados con el espectrofotómetro están asociados aproximadamente con cambios proporcionales a los valores del sensor de luz (unidad de cambio = 1); y con un valor del intercepto indistinguible estadísticamente de cero (-0.78 ± 1.7 , t-student, $p > 0.05$), lo que indica que no hay sobre-valoración en la estimación de los datos del sensor de luz respecto del espectrofotómetro (**Figura 12**).

En conclusión, este procedimiento alternativo al espectrofotométrico parece ser un método confiable a pesar de que asume un valor constante de esparcimiento, pero, sobre todo, es muy útil como aproximación al valor de absorptancia en mediciones en el campo, y/o en laboratorios que no cuenten con un espectrofotómetro capaz de aplicar la técnica de **Shibata (1956)**, pero que sí cuenten con un sensor de luz plano corregido por coseno y suficientemente pequeño para que una hoja de pasto marino pueda cubrirlo por completo. En este caso, el sensor de luz que incorpora el fluorómetro sumergible del Diving-PAM (Walz, Alemania) es adecuado para realizar estas determinaciones, en donde solo se debe ser riguroso con el arreglo geométrico utilizado. Esta técnica puede ser mejorada si se considera el efecto del grosor

de la hoja sobre la variación del componente de esparcimiento.

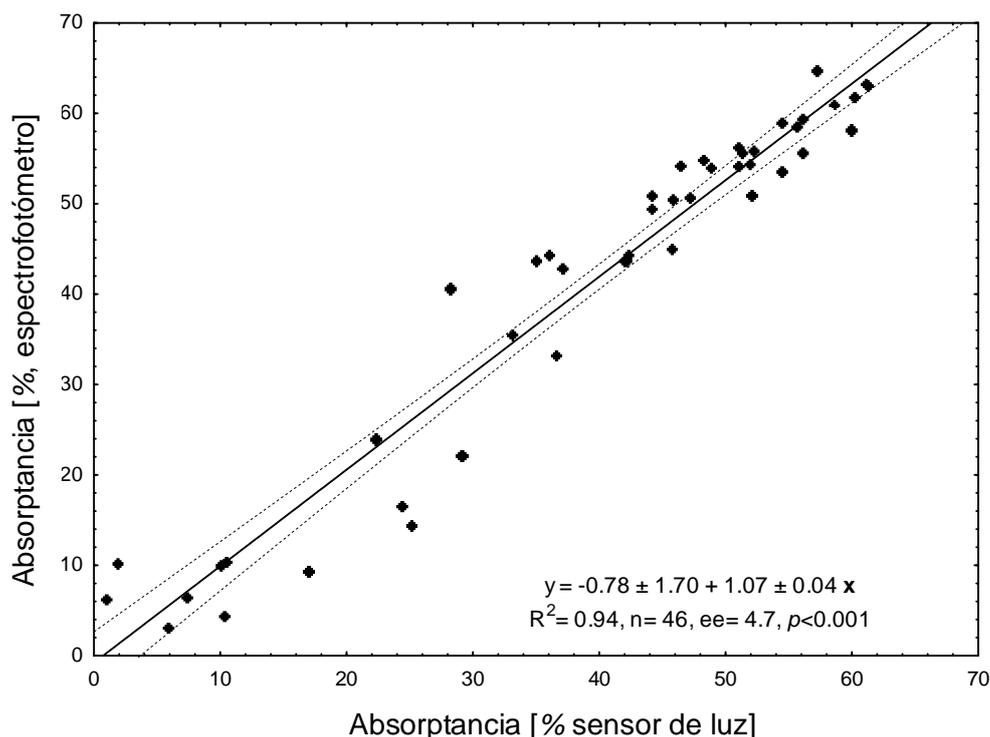


Figura 12. Validación del método alternativo (sensor de luz), comparándolo con determinaciones en el espectrofotómetro (intervalo de confianza= 0.95%).

4.3 Determinación de los descriptores de pigmentos de las hojas.

Con una sección del segmento de dos centímetros, se realizó la extracción de los pigmentos (clorofila *a*+ *b*+ carotenoides-xantofilas). El fragmento de hoja se colocó en un mortero con nitrógeno líquido, para congelarlo y facilitar la homogenización del tejido y de las células. Inmediatamente después de que se congelara la muestra, ésta se introdujo en un macerador de tejidos (Pirex 7 ml), previamente enfriado y se adicionó acetona fría (~0.5 ml) al 80% (80:20, v:v) (Dennison, 1990) saturada con carbonato de magnesio, lo que previene y minimiza la degradación de los pigmentos. En algunos casos también se utilizó cristal pulverizado con los segmentos de hoja para facilitar su extracción en la maceración. El cristal es un material inerte que no afecta la extracción de los pigmentos y se puede separar fácilmente de las muestras al centrifugarlas. Los pigmentos extraídos fueron vertidos en tubos de ensayo y estos se mantuvieron protegidos de la luz con papel aluminio y en refrigeración (4°C, 24h±2h). Después de éste periodo, las muestras se centrifugaron (centrifuga Eppendorf, 5810R) a 4°C durante 20 minutos a 4000rpm, para separar el sobrenadante que contiene los pigmentos disueltos del pelet que consiste de

residuos de tejido y cristal pulverizado.

Las lecturas de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos se realizaron en un espectrofotómetro (Elyptica-2000-Instrumentación Electro-Óptica, Ensenada, México- con doble haz de luz), a tres longitudes de onda: 663, 646 y 470nm que corresponden a la absorción de la clorofila *a*, *b* y carotenoides-xantofilas, así como, a 725nm cuyo valor de absorbancia se resta a los demás valores, para eliminar la dispersión residual. Como blanco de referencia se utilizó acetona al 80%. El contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides-xantofilas se calculó de acuerdo con las formulas de **Lichtenthaler & Wellburn (1983)**:

$$[\text{clorofila } a \mu/m] = 12.21 [A663-A725] - 2.81 [A646-A725]$$

$$[\text{clorofila } b \mu/m] = 20.13 [A646-A725] - 5.03 [A663-A725]$$

$$[\text{carotenóides-xantofilas } \mu/m] = \frac{1000 [A470-A725] - 3.27 [\text{concen. clor } a] - 104 [\text{concen. clor } b]}{}$$

229

La cantidad de pigmentos (total de clorofila *a*, *b* y carotenoides-xantofilas) se expresó por unidad de área proyectada o sección transversal de pigmentos como densidad de pigmentos [$mg m^{-2}$], por unidad de volumen como concentración de pigmentos [$\mu g cm^{-3}$], que está referida únicamente al grosor de la epidermis (considerando dos epidermis por hoja y/o segmento) y por unidad de peso en seco como contenido de pigmentos [$mg gPS^{-1}$].

4.4 Determinación de los descriptores morfológicos de las hojas.

A cada segmento de hoja de dos centímetros se le determinó el área (longitud y anchura). El grosor de hoja, de epidermis y del sistema lacunar se midió con un microscopio óptico compuesto (Olympus CH-2), a partir de cortes transversales (<1mm de ancho) realizados a cada segmento con una navaja de rasurar. Los cortes fueron colocados en portaobjetos y se mantuvieron protegidos de la luz y a baja temperatura (~15°C) en una hielera, hasta su análisis en el microscopio.

Al dividir el segmento de dos centímetros en dos secciones, la segunda

sección se utilizó para determinar el peso en seco [g] del área previamente determinada. Para esto, las muestras se secaron en una estufa (Riossa, rango de temperatura 0-120°C) a 60°C durante 24h. Las muestras se colocaron en un desecador mientras se realizaban las lecturas del peso en seco con una balanza analítica (OHAUS \pm 0.0001g). Con los datos de cada segmento se determinó el peso específico [LMA, $gPScm^{-2}$] y el área específica [SLA, cm^2gPS^{-1}] que es el valor inverso del LMA [SLA= 1/LMA]. El LMA se obtuvo dividiendo el peso de la muestra [g] entre su área [m^2] y el SLA, dividiendo el área de la muestra [m^2] sobre su peso [g] (**Enríquez & Sand-Jensen, 2003**). El LMA describe el grado de empaquetamiento de la biomasa de la hoja (cantidad de biomasa de la hoja desplegada por unidad de área proyectada), y resulta de la variación independiente del grosor de la hoja y de su densidad (biomasa por unidad de volumen). La densidad de hoja (o contenido de peso por unidad de volumen de hoja) [$mg\ cm^{-3}$] expresa la cantidad de biomasa que la hoja asigna por unidad de volumen.

V. CAPITULO 1

ANÁLISIS ALOMÉTRICO DE LA RELACIÓN FORMA-FUNCIÓN
ENTRE LA MORFOLOGÍA FOLIAR Y LA VARIACIÓN DE LA
CAPACIDAD Y EFICIENCIA DE ABSORCIÓN DE LUZ DE LAS
HOJAS DE *THALASSIA TESTUDINUM*.

5.1 Materiales y Métodos.

5.1.1 Análisis estadístico.

En este primer capítulo se realiza un análisis comparativo alométrico de la relación forma-función entre los cambios morfológicos observados de los segmentos de hoja y los cambios asociados en la capacidad y eficiencia de absorción de luz. Este tipo de aproximación pretende definir asociaciones de variación, es decir, no determina necesariamente relaciones causa-efecto sino que permiten establecer hipótesis de trabajo, tanto de las diferencias que los cambios morfológicos generan sobre la sección transversal y distribución de los pigmentos dentro de las hojas, como sobre las consecuencias que pueden tener en el grado de *empaquetamiento* de los pigmentos y, por tanto, en la pérdida o mejora de la capacidad o eficiencia de absorción de luz de las hojas del pasto marino *Thalassia testudinum*.

Para éste análisis se utilizaron todos los datos de los segmentos maduros e inmaduros, pero transformados logarítmicamente. Se describió la variabilidad de cada parámetro por medio de gráficos de Box y se exploraron las asociaciones de variación entre parámetros con el coeficiente de correlación de Pearson, r (que determina la intensidad de la asociación entre dos variables) (**Sokal & Rohlf, 1981**). Se utilizaron modelos lineales simples y múltiples (análisis de regresión simple y múltiple) (**Sokal & Rohlf, 1981**) para determinar el efecto sobre la eficiencia de absorción de luz, de los distintos descriptores morfológicos utilizados. Finalmente, se separaron los efectos directos e indirectos de las variables descriptivas empleando análisis de rutas (**Williams et al., 1990**).

En los gráficos de Box, las cajas expresan el 25% y 75% de la variación, la línea central que divide a la caja es la mediana. Las líneas que se extienden hacia arriba y hacia abajo de cada caja representan los valores mínimos y máximos de cada conjunto de datos que cae dentro de un límite de confianza del 95%. Los valores que están fuera de este rango ó *outliers* se representan con círculos.

En los modelos lineales simples log/log (análisis de regresión simple de variables transformadas logarítmicamente) se obtienen los factores de escala

de las relaciones alométricas $Y = X^b$, en donde b es el factor de escala. El factor de escala obtenido a través de un análisis de regresión simple se corrigió de acuerdo a **Niklas (1994)**, para determinar este valor según un análisis de RMA (reduced major axis regression). Este análisis considera los errores de medición de las dos variables (Y_1 y Y_2 , Modelo II) y no sólo los de la variable independiente (Y_1) como ocurre en el análisis de regresión lineal simple (Modelo I). En este análisis comparativo, para la determinación de los factores de escala entre variables que mantienen un error independiente de determinación y variación, consideramos más acertado el análisis de RMA. Siguiendo las indicaciones de **Niklas (1994)**, el factor de escala puede ser recalculado a partir de los resultados del análisis de regresión simple, para obtener la corrección con el RMA análisis con la fórmula:

$$FE_{RMA} = FE_{LS} / \sqrt{R^2},$$

(7)

donde FE_{RMA} es el factor de escala del análisis RMA, FE_{LS} es el factor de escala de la regresión lineal simple y el R^2 el coeficiente del análisis de regresión.

El factor de escala puede adquirir diversos valores, cuando FE es 1, Y_1 es directamente proporcional a Y_2 (relación isométrica). Cuando $FE > 1$, Y_1 incrementa proporcionalmente más rápido que Y_2 , dado que el cociente de Y_1 a Y_2 incrementa con valores altos de Y_2 . Cuando el $FE < 1$, Y_2 incrementa proporcionalmente más rápido que Y_1 y el cociente de Y_1 a Y_2 decrece con valores altos de Y_2 .

El análisis de rutas se aplicó debido a la colinearidad entre las variables morfológicas y de pigmentos que se utilizaron para explicar la variabilidad de los descriptores ópticos. La correlación entre variables supuestamente *independientes* (X_s) que están describiendo una variable dependiente (Y) se conoce como multicolinealidad, y precisamente indica la falta de independencia. Ésta se presenta cuando dos o más variables X tienen una fuerte y significativa relación entre ellas. La multicolinealidad entre variables dificulta la separación del efecto individual de cada variable X sobre la variable Y . En estos casos se requiere el uso de los análisis de rutas, pues separan los efectos individuales directos e indirectos significativos de cada variable X que describe a la variable Y (**Williams, et al., 1990**).

5.2 Resultados.

5.2.1 Descripción de la variabilidad de la base de datos.

En las gráficas de Box se muestra la variabilidad de la base de datos examinada, tanto para los descriptores ópticos (absorptancia y coeficiente específico de absorción), como para los descriptores de pigmentos (por unidad de área, volumen y peso seco) y para los descriptores morfológicos de la hoja [grosor de hoja, epidermis y sistema lacunar, así como, el contenido de peso por unidad de volumen de hoja (densidad de hoja) y el peso específico (LMA=1/SLA)]. El rango de variación examinado para el sistema lacunar fue menor comparado con las otras variables.

Las hojas de *Thalassia testudinum* variaron moderadamente en su capacidad para absorber luz (C.V. absorptancia=39%) y fuertemente en la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos (C.V. coeficiente específico de absorción=79%) (**Figura 13a, b**). La composición de pigmentos también varió de forma importante tanto por unidad de área (C.V.=69%), como por unidad de volumen (C.V.=70%) y peso (C.V.=70%) (**Figura 13c, d, e**). Esta variación fue, sin embargo, debida a cambios estructurales relativamente pequeños de la morfología foliar, siendo el grosor del sistema lacunar el descriptor morfológico más variable (C.V. = 41%, **Figura 13j**) seguido del grosor de la hoja (C.V.=25%, **Figura 13f**). El contenido de peso por unidad de volumen de hoja (densidad de hoja, C.V.=22%, **Figura 13g**) y el peso específico (LMA, C.V.=21%, **Figura 13h**) presentaron una variación muy similar y menor a la del grosor de hoja y del sistema lacunar, mientras que, el descriptor morfológico que mostró la menor variación fue el grosor de la epidermis (C.V.=16%) (**Figura 13i**).

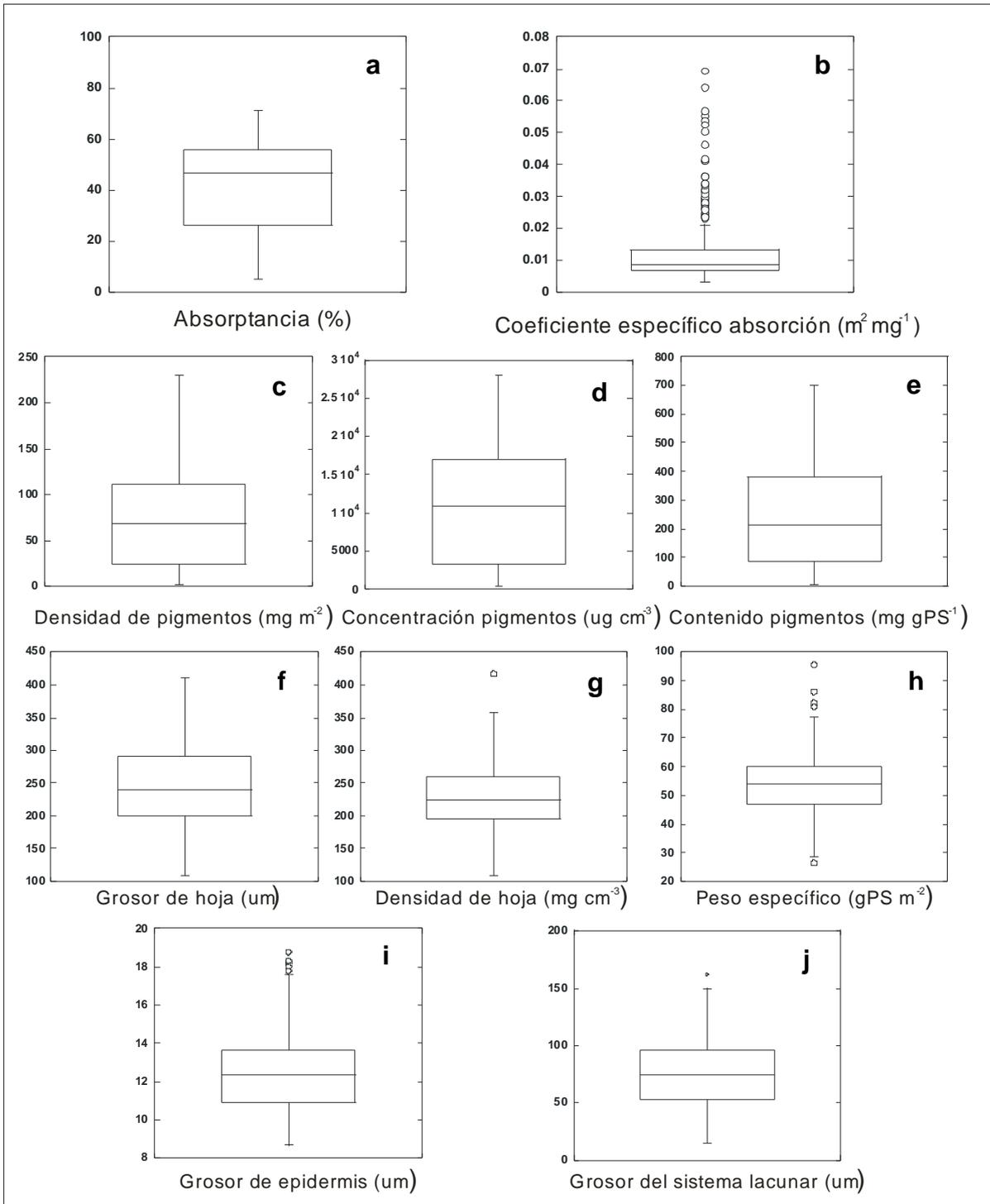


Figura 13. Variabilidad de la a) absorptancia, b) coeficiente específico de absorción, c) densidad de pigmentos, d) concentración de pigmentos, e) contenido de pigmentos, f) grosor de hoja, g) densidad de hoja, h) peso específico, i) grosor de epidermis, y j) grosor del sistema lacunar.

5.2.2 Análisis del efecto de la variación del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la capacidad de absorción de luz.

El análisis de la variabilidad de la capacidad de absorción de luz o absorptancia, A , de las hojas de *T. testudinum*, en función de los cambios observados en las hojas en el contenido de pigmentos por unidad de área mostró una variabilidad de la densidad de clorofila ($a + b$) por unidad de área de más de dos órdenes de magnitud ($1.2\text{-}208.7 \text{ mg m}^{-2}$), frente a una variación de sólo un orden de magnitud en la capacidad de absorción de luz (A_{PAR} , 5.4-71.0%), lo que representó una variación de hasta 13 veces (**Figura 14**). Se observó también que la absorptancia incrementa conforme aumenta la densidad de pigmentos hasta un máximo alrededor del 60% ($61.3\% \pm 0.41\%$, $n=45$, mínimo=58.7%, máximo=71.0%) que se alcanza a valores de densidades de pigmentos por encima de los 142 mg m^{-2} (**Figura 14**).

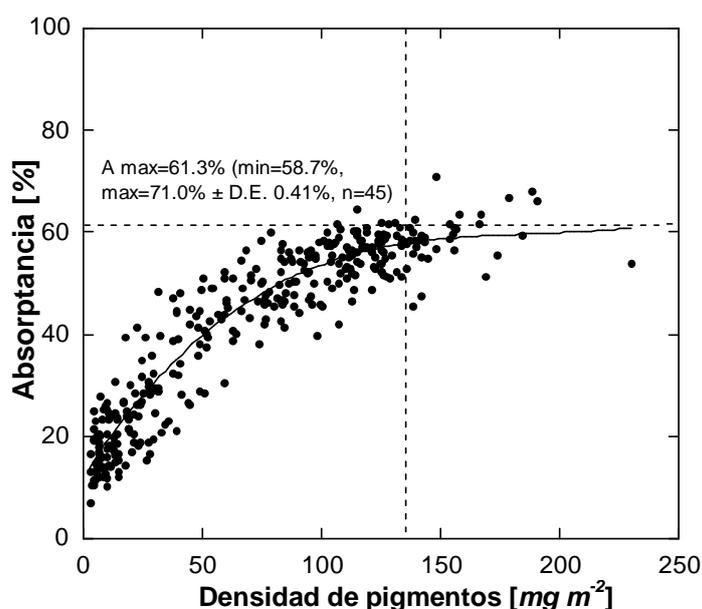


Figura 14. Variabilidad de la absorptancia en función de la densidad de pigmentos.

A partir de este valor, incrementos en la densidad de pigmentos, no suponen una mejora significativa de la capacidad de absorción de luz, A . Esta relación se describe con el siguiente modelo:

$$A_{\text{PAR}} = 10^{0.86 \pm 0.02} \times \text{pigmentos por área}^{0.43 \pm 0.01},$$

(Log/log, $R^2=0.85$, $n=345$, E.E.=0.09, $p<0.001$).

Esta asociación no lineal entre la densidad de pigmentos y la capacidad de absorber luz, es debida al efecto de autosombra que experimentan los pigmentos dentro de estructuras vivas como membranas fotosintéticas,

cloroplastos, células, tejidos, entre otros (Kirk, 1994). Este fenómeno se conoce con el nombre de *efecto paquete* y resulta en una pérdida significativa de la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos.

Aunque el modelo encontrado es capaz de describir el 85% de la variación, esta relación, sin embargo, muestra una fuerte dispersión (**Figura 14**), con un promedio de incertidumbre de alrededor del 17%, es decir, para similares densidades de pigmentos, por ejemplo de 100 mg m^{-2} , unos segmentos de hojas de *Thalassia testudinum* no llegan a absorber el 40% de la luz incidente, mientras que otros absorben por encima del 60% (**Figura 14**). Para entender mejor el origen de esta incertidumbre se analizará en primer lugar el papel de la morfología foliar en la regulación de la variabilidad de la densidad de clorofila ($a + b$) por unidad de área, para después analizar el posible efecto diferencial de la morfología foliar sobre la variación de la absorptancia.

Relación entre la variación de la densidad de pigmentos y la morfología foliar.

Para examinar cómo los descriptores morfológicos pueden afectar la variación de la densidad de pigmentos, se consideró, siguiendo el mismo análisis realizado por **Enríquez y Sand-Jensen (2003)**, que la variación de la densidad de pigmentos por unidad de área [mg m^{-2}] resulta de cambios en el contenido de pigmentos por unidad de peso [$\text{mg g}^{-1}\text{PS}$] y/o de cambios en el peso específico de la hoja [LMA, gPS m^{-2}], es decir, en el contenido de peso por unidad de área foliar [LMA, gPS m^{-2}]. La variación de LMA resulta a su vez de la variación independiente del grosor de la hoja y de su densidad [LMA (mg cm^{-2}) = grosor (cm) x densidad (mg cm^{-3})]. Estas tres variables, pigmentos por peso, grosor y densidad de hoja, podrían estar diferencialmente correlacionadas con la variación de la densidad de pigmentos por unidad de área, también denominada, sección transversal de pigmentos (**Tabla 3**), y posiblemente también con la variación de la absorptancia o capacidad de absorción de luz (**Tabla 4**).

Colinealidad entre variables.

Las variables grosor de hoja, densidad de hoja y pigmentos por unidad de peso, mostraron en la base de datos analizada (que incluye los segmentos maduros e inmaduros), una colinealidad significativa (**Tabla 3**). Lo que indica

que las hojas más gruesas de *Thalassia testudinum* tienden a ser más huecas (espacios lacunares más amplios) y menos densas, pero también que tienden a ser poco pigmentadas, es decir a contener menos pigmentos por unidad de peso. Por otro lado, las hojas delgadas son más densas (contenido de peso por unidad de volumen de hoja) y contienen más pigmentos por unidad de peso. Esta fuerte colinearidad requirió del análisis de rutas para separar los efectos directos e indirectos de cada descriptor con la variación de la densidad de pigmentos y de la absorptancia.

Tabla 3. Valores de correlación de Pearson en función de la sección transversal de pigmentos (pigmentos por unidad de área).

r Pearson (n= 256)	Sección transversal de pigmentos (pigmentos área)	Pigmentos por unidad de peso	Grosor de hoja
Sección transversal de pigmentos	1 p--		
Pigmentos por unidad de peso	0.96 p<0.001	1 p--	
Grosor de hoja	-0.18 p<0.05	-0.31 p<0.001	1 p--
Densidad de hoja	0.36 p<0.001	0.37 p<0.001	-0.68 p<0.001

5.2.3 Determinación de los efectos directos e indirectos de los pigmentos y la morfología foliar sobre la variación de la sección transversal de pigmentos y la capacidad de absorción de luz.

Análisis de rutas de la variación de la sección transversal de pigmentos.

Se corroboró la existencia de una asociación significativa y directa de las tres variables, contenido de pigmentos por unidad de peso, grosor de hoja y densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen de hoja) con la densidad de pigmentos por unidad de área o sección transversal de pigmentos (**Tabla 3**). Es decir, a pesar de su colinearidad, las tres variables tienen un efecto independiente sobre la variación de la sección transversal de pigmentos. El modelo múltiple explicativo que se obtuvo es el siguiente:

$$\text{Pigmentos por área} = 10^{-4.13 \pm 0.38} \times \text{pigmentos por peso}^{\underline{1.02} \pm 0.02} \times \text{grosor de hoja}^{\underline{0.83} \pm 0.08} \times \text{densidad de hoja}^{\underline{0.64} \pm 0.09},$$

(Log/log, $R^2=0.94$, $n=256$, E.E.=0.11, $p<0.001$),

(Prueba de t para cada uno de los tres factores de escala $p<0.001$).

Según este modelo el descriptor que contribuye a aumentar la sección transversal de pigmentos en mayor grado es el contenido de pigmentos por unidad de peso, seguido por el grosor de hoja. Los cambios en la densidad foliar (contenido de peso por unidad de volumen) son los que resultan en un menor aumento del contenido de pigmentos por área proyectada.

El análisis de rutas mostró además que, la variación de los pigmentos por unidad de peso es la que ejerce un mayor efecto directo (88.6%), sobre la variación de la sección transversal de los pigmentos. Los cambios del grosor de hoja (efecto directo 35.3%) y de la densidad (peso foliar por unidad de volumen, efecto directo 22.8%) aunque tienen también un efecto directo significativo, es mayor el efecto indirecto que ejerce su colinearidad con la variación del contenido de pigmentos (**Figura 15**). Es decir, un aumento en el grosor de la hoja o en su densidad conducirían a un aumento de la sección transversal de pigmentos si no fuera porque las hojas más gruesas y menos densas tienden a mantener menos pigmentos (**Figura 15**).

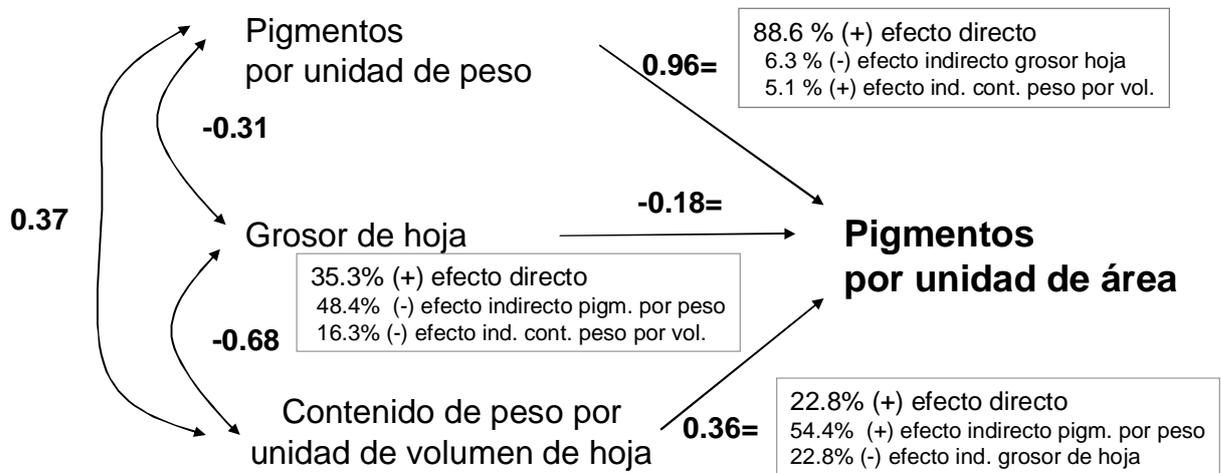


Figura 15. Diagrama de rutas que describe la relación entre la sección transversal de pigmentos o pigmentos por unidad de área con los pigmentos por unidad de peso, grosor de hoja y contenido de peso por unidad de volumen (densidad de hoja). Los números al costado de las flechas indican los valores de correlación de Pearson. Estos valores se separaron en efectos directos e indirectos, señalados dentro de los rectángulos.

Análisis de rutas sobre la capacidad de absorción de luz.

Se siguió el mismo procedimiento anterior para determinar el efecto y separar las contribuciones directas e indirectas de los pigmentos por unidad de peso, grosor y densidad de hoja sobre la capacidad de absorción de luz o

absorptancia. Se encontró que existe una asociación positiva y significativa entre las variables, excepto entre la absorptancia y el grosor de hoja (r de Pearson, $p > 0.05$, **Tabla 4**).

Tabla 4. Valores de correlación de Pearson en función de la capacidad de absorción de luz o absorptancia.

r Pearson (n= 240)	Capacidad de absorción (absorptancia)	Pigmentos por unidad de peso	Grosor de hoja
Capacidad de absorción	1 p--		
Pigmentos por unidad de peso	0.84 $p < 0.001$	1 p--	
Grosor de hoja	-0.10 $p > 0.05$	-0.33 $p < 0.001$	1 p--
Densidad de hoja	0.32 $p < 0.001$	0.39 $p < 0.001$	-0.66 $p < 0.001$

Sin embargo, el análisis de regresión múltiple arrojó contribuciones significativas de las tres variables para explicar la variación de la absorptancia

A. El modelo múltiple explicativo fue el siguiente:

$$A_{PAR} = 10^{-1.51 \pm 0.37} \times \text{pigmentos por peso } \underline{0.42 \pm 0.02} \times \text{grosor de hoja } \underline{0.55 \pm 0.08} \\ \times \text{densidad de la hoja } \underline{0.36 \pm 0.09},$$

$$(\text{Log/log}, R^2 = 0.75, n = 240, \text{E.E.} = 0.10, p < 0.001),$$

(Prueba de t para cada uno de los tres factores de escala $p < 0.001$).

El modelo indica que el factor que más afecta la variación de la capacidad de absorción de luz, absorptancia, es en este caso el grosor de la hoja (factor de escala 0.55 ± 0.08) seguido del contenido de pigmentos (0.42 ± 0.02) y de la densidad de hoja (0.36 ± 0.09). De nuevo, la contribución directa a esta variación de los pigmentos por unidad de peso sigue siendo la mayor (efecto directo 84.1%), seguida del grosor de hoja (efecto directo 42.7%) y por último, de la densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen, efecto directo 24.3%, **Figura 16**).

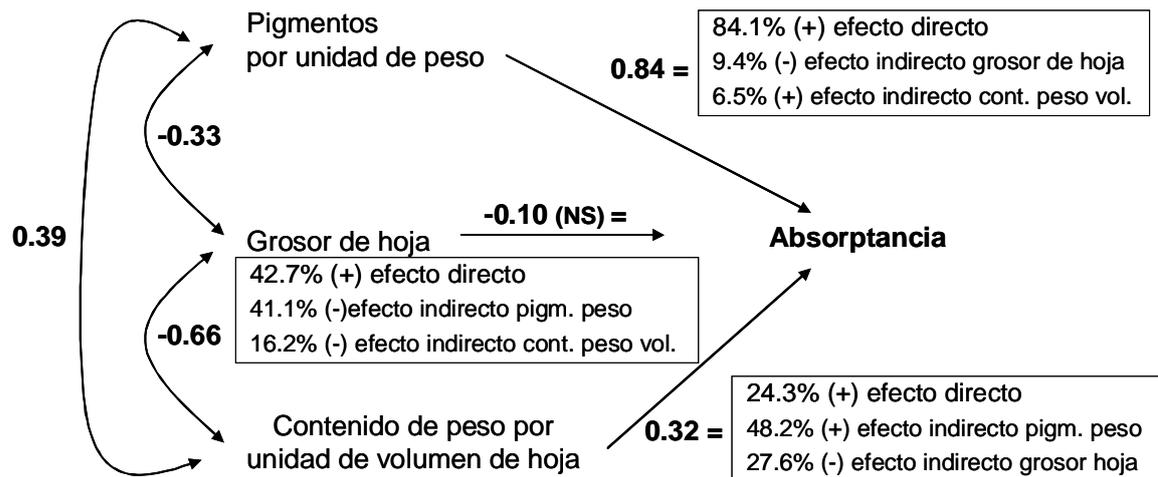


Figura 16. Diagrama de rutas que describe la relación entre la capacidad de absorción de luz o absorptancia, A_{PAR} , con los pigmentos por unidad de peso, grosor de hoja y contenido de peso por unidad de volumen (densidad de hoja). Los números al costado de las flechas indican los valores de correlación de Pearson. Estos valores se separaron en efectos directos e indirectos, señalados dentro de los rectángulos.

La falta de asociación (según la correlación de Pearson, $p > 0.05$) entre el grosor de hoja y la absorptancia es explicable por los sentidos opuestos de sus efectos directos (positivo) e indirectos (negativo, por su covariación con la variación del contenido de pigmentos por peso). Es decir, las hojas más gruesas presentarían valores mayores de la absorptancia si no fuera porque tienden a presentar contenidos de pigmentos menores, lo que va a reducir su capacidad de absorción de luz. Es interesante señalar la implicación forma-función que sugiere este modelo pues considerando dos hojas con el mismo contenido en pigmentos por peso, el modelo sugiere que la más gruesa va a ser capaz de coleccionar más luz que la más delgada, y la más densa también lo hará, si no disminuye mucho su grosor (**Figura 16**).

Estos resultados ponen en evidencia la importancia del componente morfológico, que permite explicar una parte significativa de la variabilidad observada en la absorptancia (17% en promedio), y sugiere que las hojas de *T. testudinum* al aumentar el grosor de hoja podrían también contribuir a mejorar la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos, permitiendo una disminución del empaquetamiento de los mismos.

5.2.4 Análisis del efecto de la variación del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la eficiencia de absorción de luz.

La relación entre la eficiencia de absorción de luz referida a pigmentos [coeficiente específico de absorción, a^* , $m^2 mg^{-1}$ pigmento] y la densidad de pigmentos por unidad de área fue aún más fuerte y significativa que la asociación anteriormente descrita con la absorptancia. Esta relación la describe el siguiente modelo:

$$a^*_{PAR} = 10^{-1.20 \pm 0.02} \times \text{pigmentos por área}^{-0.47 \pm 0.01},$$

(Log/log, $R^2=0.82$, $n=345$, E.E.=0.10, $p<0.001$).

Estos resultados indican que la eficiencia para absorber luz de los pigmentos fotosintéticos en las hojas de *Thalassia testudinum* decrece no-linealmente (factor de escala= -0.52, corregido con el análisis RMA, **Niklas, 1994**), conforme aumenta la densidad de pigmentos. El factor de escala de esta relación alométrica refleja la magnitud del efecto paquete que sufren los pigmentos dentro de las células epidérmicas de las hojas de *Thalassia testudinum*. Un factor de escala de -0.52, >-1 , indica que las hojas más pigmentadas son capaces de contrarrestar el efecto paquete, pues sufren proporcionalmente menor empaquetamiento (**Figura 17**).

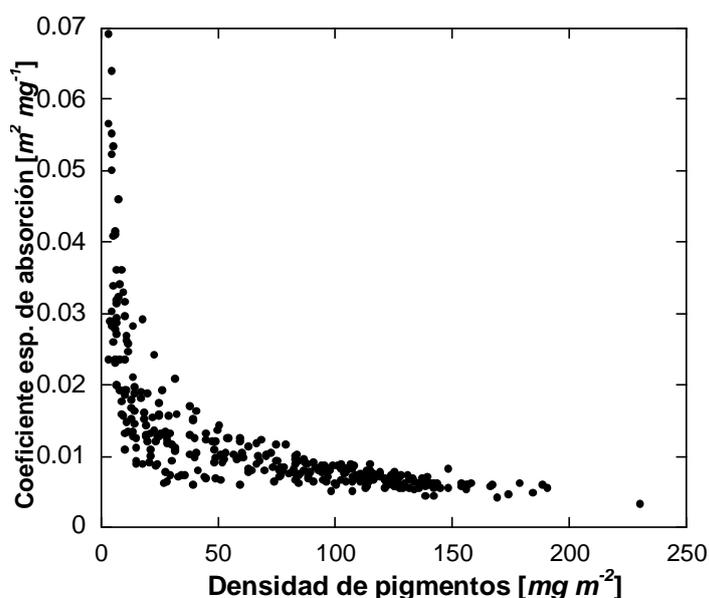


Figura 17. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función de la densidad de pigmentos.

5.2.5 Análisis del efecto de la morfología foliar de *Thalassia testudinum* sobre la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos. Análisis de la variación del contenido de pigmentos por unidad de volumen.

Los pigmentos por unidad de área [$mg\ m^{-2}$] son el producto de la variación de la concentración de pigmentos por unidad de volumen [$\mu g\ cm^{-3}$] y de la variación del volumen de la sección de la hoja [μm] ocupada por éstos, ya sea el grosor de la hoja completa o el grosor de la parte pigmentada del mesófilo. En los pastos marinos la epidermis es el único tejido pigmentado y sólo representa un pequeño volumen de la sección transversal de la hoja (alrededor del 20% del volumen total de la hoja según **Tomilson, 1980**). Por tanto, la concentración de pigmentos por unidad de volumen debe estar referida únicamente al volumen de las dos capas de la epidermis, superior e inferior o abaxial y adaxial. En el presente estudio, se ha examinado la variación del grosor de la epidermis, y para cuantificar la concentración de pigmentos por unidad de volumen se determinó el volumen ocupado por las dos capas epidérmicas (abaxial y adaxial) dentro de la hoja. Atendiendo a este criterio, la variación de los pigmentos por unidad de área [$\mu g\ cm^{-2}$] son el resultado de la variación de los pigmentos por unidad de volumen [$\mu g\ cm^{-3}$] y de la variación del grosor de la epidermis [μm].

La variación del grosor de la epidermis presentó la menor variabilidad de todos los descriptores morfológicos considerados (C.V.=16%), pero esta pequeña variación, sin embargo, esconde una mayor variabilidad en el volumen total de la hoja que es ocupado por los pigmentos (C.V.=27.9%). Este nuevo descriptor morfológico definido como el porcentaje del volumen total pigmentado de la hoja tiene un valor promedio en la base de datos del $10.88\% \pm 2.95$ (media \pm D.E., $n=324$) del volumen foliar total de las hojas de *T. testudinum* analizadas, con un rango de variación desde un mínimo de 5.88% del volumen foliar total a un máximo del 22.1%.

Efecto de la variación de la concentración de pigmentos por unidad de volumen y del grosor de la epidermis sobre la eficiencia de absorción de luz.

Se examinaron las asociaciones individuales entre la eficiencia de absorción de luz referida a pigmentos (coeficiente específico de absorción, a^*) y la variación de la concentración de pigmentos por unidad de volumen y del grosor de

epidermis. La primera relación fue negativa y significativa (Log/log, $r=-0.89$, $n=306$, $p<0.001$), y se describe con el siguiente modelo:

$$a^*_{\text{PAR}} = 10^{-0.26 \pm 0.05} \times \text{pigmentos por volumen}^{-0.45 \pm 0.01},$$

(Log/log, $R^2=0.79$, $n=306$, E.E.=0.11, $p<0.001$).

Este resultado indica que la eficiencia para absorber luz de los pigmentos decrece también no-linealmente (factor de escala= -0.50, corregido con el análisis RMA, **Niklas, 1994**) conforme aumenta la concentración de pigmentos por unidad de volumen (**Figura 18a**), y con un *empaquetamiento* de una magnitud similar al descrito para los pigmentos por unidad de área.

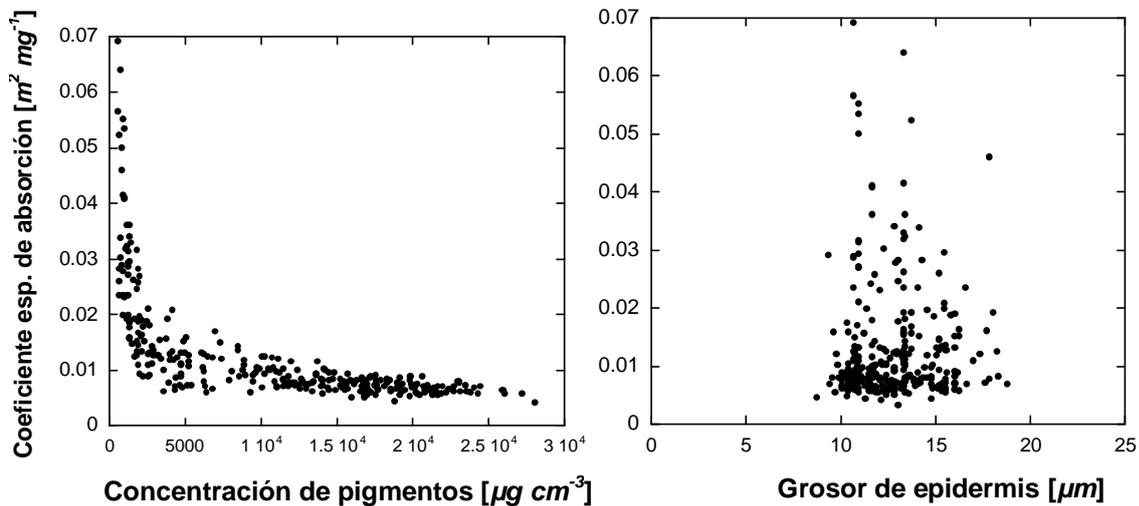


Figura 18. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función de la a) concentración de pigmentos por unidad de volumen y del b) grosor de la epidermis.

La segunda relación no fue significativa (Log/log, $r=0.06$, $n=340$, $p>0.05$), sugiriendo que la variación de la epidermis no tiene ningún efecto sobre el empaquetamiento de los pigmentos (**Figura 18b**). Sin embargo, sí se encontró una correlación negativa, aunque débil, entre la fracción del volumen de hoja total pigmentado y el coeficiente específico de absorción de luz (Log/log, $r= -0.24$, $n=289$, $p<0.001$).

Efecto combinado de ambos parámetros sobre la eficiencia de absorción de luz.

Al analizar conjuntamente la asociación entre la eficiencia de absorción de luz *versus* los pigmentos por unidad de volumen y el grosor de epidermis, se encontró que, ambas variables sí tienen conjuntamente un efecto negativo significativo sobre la variación de la eficiencia de absorción (t-test, $p < 0.001$). Este modelo se describe con la siguiente ecuación:

$$a^*_{PAR} = 10^{0.59 \pm 0.12} \times \text{pigmentos por volumen}^{-0.47 \pm 0.01} \times \text{grosor de epidermis}^{-0.70 \pm 0.09}$$

(Log/log, $R^2 = 0.82$, $n = 302$, E.E. = 0.10, $p < 0.001$),
 (Prueba de t para los dos factores de escala, $p < 0.001$).

Este resultado indica que ambos parámetros, la concentración de pigmentos por unidad de volumen y el grosor de epidermis, están contribuyendo significativamente al empaquetamiento de los pigmentos y por tanto, a su pérdida de eficiencia de absorción de luz, a^* . Una significativa y negativa correlación entre la concentración de pigmentos y el grosor de la epidermis (log/log, $r = -0.49$, $p < 0.001$) es la responsable de que el grosor de la epidermis no aparente estar correlacionado con la variación del coeficiente específico de absorción. Esta colinearidad que indica que las hojas de *T. testudinum* con mayores grosores de epidermis tienden a presentar menores concentraciones de pigmentos por unidad de volumen, esconde el efecto directo significativo y negativo que se encontró en el modelo múltiple. Los factores de escala determinados en el modelo anterior indican también que el aumento del grosor de la epidermis tiene un mayor efecto sobre la disminución de a^* (-0.70), que el aumento de la concentración de pigmentos (-0.47), para hojas con concentraciones similares de pigmentos por unidad de volumen. Sin embargo, un aumento del grosor de la epidermis puede también contribuir significativamente a reducir el empaquetamiento de los pigmentos, al permitir reducir la concentración de pigmentos por unidad de volumen. Esa es precisamente la tendencia encontrada en esta base de datos para las hojas de *Thalassia testudinum* de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, como lo muestra la correlación significativa y negativa encontrada entre el grosor de la epidermis

y la concentración de pigmentos por unidad de volumen (log/log, $r = -0.49$, $p < 0.001$), y la razón de que no se encontrara una asociación significativa entre el grosor de la epidermis y a^* .

5.2.6 Análisis del efecto de la morfología foliar de *Thalassia testudinum* sobre la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos. Análisis de la variación del contenido de pigmentos por unidad de peso.

La concentración de pigmentos por unidad de volumen no es un descriptor normalmente utilizado en fotobiología para describir el contenido de pigmentos de estructuras pluricelulares. Los descriptores más comunes son el contenido de pigmentos por unidad de área y el contenido de pigmentos por unidad de peso (peso fresco o peso seco foliar). La asociación entre estos dos parámetros depende de la variación del área específica [SLA, $cm^2 g^{-1}PS$] o del peso específico foliar [LMA=1/SLA, $mgPS cm^{-2}$]. Para examinar la contribución de los descriptores morfológicos sobre la variación del empaquetamiento de los pigmentos, se consideró de nuevo que la variación de la densidad de pigmentos por unidad de área [$mg m^{-2}$] puede resultar de cambios en el contenido de pigmentos por unidad de peso [$mg g^{-1}PS$] y/o de cambios en el peso específico [LMA, $gPS m^{-2}$]. También se analizó mediante un modelo multivariante, el efecto sobre la eficiencia de absorción de luz, de la variación independiente de dos descriptores morfológicos que regulan la variación del peso específico foliar, LMA [$gPS m^{-2}$]: la variación del grosor de hoja [m] y la variación de la biomasa foliar por unidad de volumen [densidad de hoja, $g cm^{-3}$].

Efecto de la variación del contenido de pigmentos por unidad de peso y LMA sobre la variación de la eficiencia de absorción de luz.

Se examinó la magnitud de las asociaciones y se encontró que ambas variables tienen una asociación negativa y significativa, aunque débil para LMA, con la eficiencia de absorción de luz, (coeficiente específico de absorción, a^*) (Log/log, contenido de pigmentos: $r = -0.90$, $n = 280$, $p < 0.001$; Log/log, LMA: $r = -0.23$, $n = 335$, $p < 0.001$, **Figura 19ab**).

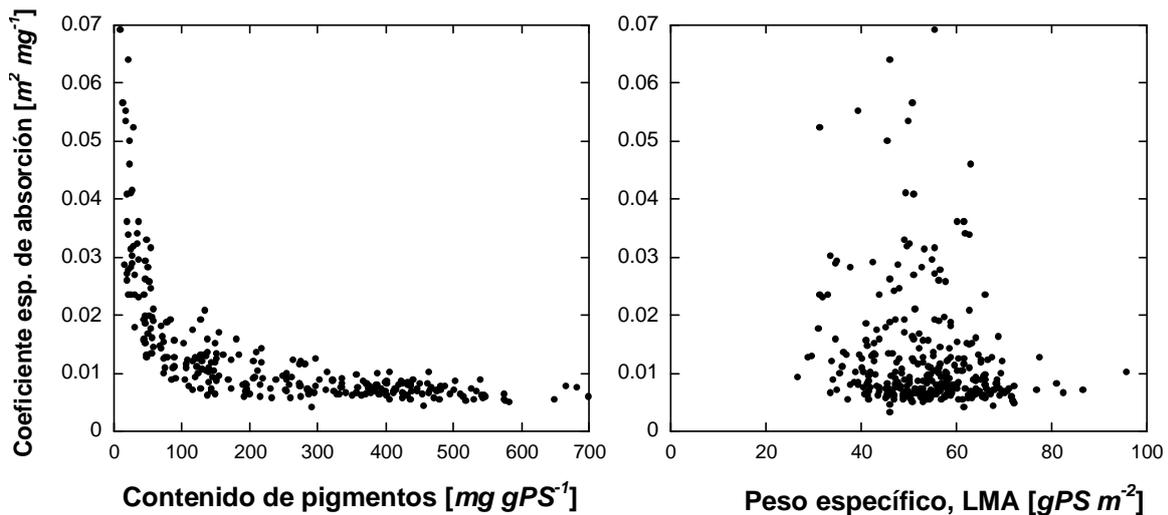


Figura 19. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función del a) contenido de pigmentos por unidad de peso y del b) peso específico, LMA.

La variación del contenido de pigmentos por unidad de peso fue capaz de explicar en exclusividad el 81 % de la variación considerada en el coeficiente específico de absorción, de acuerdo al siguiente modelo:

$$a^*_{PAR} = 10^{-0.86 \pm 0.03} \times \text{pigmentos por peso}^{-0.50 \pm 0.02},$$

(Log/log, $R^2=0.81$, $n=280$, E.E.=0.11, $p<0.001$).

Estos resultados indican que el contenido en pigmentos por unidad de peso es capaz de explicar casi tanta variación de la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos como la variación de la sección transversal de pigmentos (pigmentos por unidad de área). Un aumento del contenido en pigmentos por unidad de peso contribuye a reducir no-linealmente la eficiencia de absorción de luz de éstos, siguiendo un patrón similar, aunque ligeramente superior, al encontrado para los otros dos descriptores del contenido de pigmentos (factor de escala= -0.55, corregido con el análisis RMA, **Niklas, 1994**).

Efecto combinado de la variación del contenido de pigmentos por unidad de peso y LMA sobre la eficiencia de absorción de luz.

Al analizar conjuntamente la asociación entre estas dos variables y la eficiencia de absorción de luz, a^* , se encontró que, el LMA no presenta ningún efecto significativo directo sobre la variación de a^* de las hojas de *T. testudinum* (prueba de t-student para la pendiente log/log del LMA $p>0.05$), y por tanto, no

contribuye en un modelo multivariante a mejorar la descripción de la variación de a^* que hace por sí solo el contenido en pigmentos por unidad de peso.

Efecto de la variación del grosor de hoja y densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen) sobre la eficiencia de absorción de luz.

Al evaluar la asociación de los componentes morfológicos: grosor de hoja [μm] y contenido de peso por unidad de volumen de hoja [densidad de hoja, mg cm^{-3}], con la variación del coeficiente específico de absorción de luz, a^* , se observó una asociación positiva y significativa de a^* con el grosor de hoja (Log/log, grosor de hoja: $r= 0.27$, $n=292$, $p<0.001$, **Figura 20a**), mientras que el contenido de peso por unidad de volumen foliar (densidad de hoja) presentó una asociación también significativa pero negativa (Log/log, densidad de hoja: $r= -0.33$, $n=292$, $p<0.001$, **Figura 20b**).

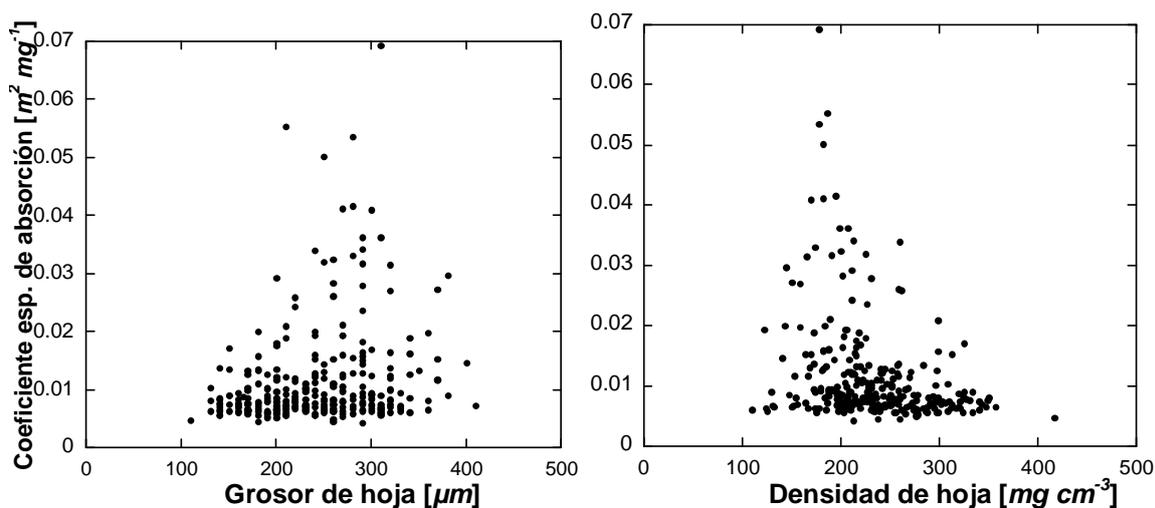


Figura 20. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función del a) grosor de hoja y la b) densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen).

Estos resultados sugieren que un aumento del grosor de la hoja contribuye a reducir el empaquetamiento de los pigmentos mejorando su eficiencia de absorción de luz, a^* , mientras que un aumento de la densidad (contenido de peso por unidad de volumen de hoja) resulta en un efecto inverso. Para examinar su efecto directo sobre a^* , se utilizó un modelo multivariante junto con la variación del contenido en pigmentos por unidad de peso. Este modelo determinó que no había un efecto directo significativo ni de

la densidad de la hoja [$mg\ cm^{-3}$] ni del grosor de hoja [μm] sobre la variación de a^* (prueba de t-student para las pendientes de estos factores, $p>0.05$).

Colinealidad entre variables.

El tipo de covariación observada entre el grosor de hoja, la densidad de hoja y los pigmentos por unidad de peso (**Tabla 3**) y la fuerte asociación entre el contenido de pigmentos por peso y el coeficiente específico de absorción de luz, a^* (**Figura 19a**), pueden explicar las correlaciones *indirectas* encontradas entre el grosor de la hoja y su densidad con la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos. Es decir, la reducción del contenido de pigmentos por unidad de peso que muestran las hojas más gordas explicaría la asociación positiva indirecta entre la eficiencia de absorción de luz, a^* y el grosor de hoja. Del mismo modo, el hecho de que las hojas más delgadas y más pigmentadas son también más densas, explicaría la asociación negativa indirecta entre a^* y la densidad de la hoja. La falta de asociación directa entre la densidad de hoja y el grosor de hoja con a^* en el modelo multivariante, indica que, el efecto que estos dos parámetros morfológicos ejercen sobre la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos se pueden relacionar con los cambios que experimenta el contenido en pigmentos por unidad de peso, sin que exista ningún otro efecto independiente.

5.2.7 Comparación de la variabilidad de los pigmentos expresados por unidad de área, volumen y peso en función de la eficiencia de absorción de luz.

Para las tres expresiones de pigmentos se observó que un aumento en la cantidad de pigmentos, ya sea por unidad de área, volumen o peso, disminuye la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos, a^* y que esta caída sigue un patrón no lineal similar en los tres descriptores (**Figuras 17, 18a, 19a**).

Se compararon los factores de escala de los tres modelos simples de regresión log/log (después de ser corregidos con el análisis RMA, **Niklas, 1994**), entre a^* y los pigmentos por unidad de área, volumen y peso. El factor de escala de la densidad de pigmentos por unidad de área fue -0.52, el de la concentración de pigmentos por unidad de volumen fue -0.50 y el del contenido de pigmentos por unidad de peso fue -0.55. Éstos resultados indican que la

disminución de a^* , es muy similar al aumentar el contenido de pigmentos, no importa si se expresa como cambios en la sección transversal (contenido por área proyecta), por volumen foliar (concentración) o por peso, aunque éstos últimos son los que causan un mayor efecto, es decir, las hojas de *Thalassia testudinum* sufren un ligero mayor *empaquetamiento* de los pigmentos al aumentar los pigmentos por unidad de peso.

5.3 Discusión.

El análisis alométrico generó modelos explicativos sobre qué características morfológicas de las hojas de *Thalassia testudinum* están más relacionadas con la gran dispersión encontrada en la capacidad de absorción de luz que varía en promedio 17%, pero sobre todo, con la gran variabilidad de la eficiencia de absorción de luz, a^* (C.V.= 79%). Como algunos descriptores ópticos se pueden descomponer en función de algunos descriptores de la morfología foliar (i.e., la variación de la sección transversal de pigmentos resulta de la variación del grosor de la epidermis y de la variación de los pigmentos por unidad de volumen), se utilizaron modelos múltiples para determinar las posibles diferencias entre segmentos de hoja en su capacidad o eficiencia de absorción de luz, debidas a esta variación independiente.

5.3.1 Descripción de la variabilidad de la base de datos analizada en relación a estudios previos.

La variabilidad de la densidad de clorofila ($a + b$) por unidad de área de las hojas de *T. testudinum* que se examinó en el presente estudio fue de más de dos órdenes de magnitud (1.2-208.7 $mg\ m^{-2}$). Este rango de variación es el mayor hasta ahora examinado en pastos marinos, pues en los escasos estudios realizados hasta la fecha de las propiedades ópticas de sus hojas (Enríquez *et al.*, 1992, 1994; Major & Dunton 2000, 2002; Cummings & Zimmerman, 2003; Runcie & Durako, 2004; Enríquez, 2005b; Thorhaug *et al.*, 2006; Durako, 2007; Cayabyab & Enríquez, 2007), la mayor variabilidad analizada había sido de un orden de magnitud en el contenido de clorofila ($a + b$) por unidad de área de segmentos de hojas de esta misma especie (Enríquez, 2005b). Estudios anteriores sólo habían examinado una variación de hasta 6 veces en el contenido de clorofila a por unidad de área en *Posidonia oceanica* (Enríquez *et al.*, 1992) y de 5 veces el contenido de pigmentos (clorofila $a + b$) por unidad de peso fresco en *T. testudinum* y *Zostera marina* (Cummings & Zimmerman, 2003), cuya variación por unidad de área es todavía menor (cf. Enríquez *et al.*, 1992).

La mayor parte del aumento del rango examinado en el presente estudio con respecto al de **Enríquez (2005b)** fue debida a segmentos inmaduros, poco pigmentados, con valores de densidad de pigmentos por debajo de 20 mg (clorofila $a + b$) m^{-2} . En este rango de variación, la magnitud del *paso óptico efectivo* de la luz o la habilidad máxima de estas hojas de amplificar la capacidad de absorción de luz, puede observarse mejor (**Figura 21**). La base de datos general de este estudio incluye segmentos de hoja inmadura que no han desarrollado todavía toda su pigmentación y que han sido excluidos del análisis de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *T. testudinum* (capítulo 2), pero también segmentos de hoja estructuralmente inmadura, es decir, que tampoco se ha desarrollado completamente desde el punto de vista morfológico. Los valores más altos de clorofila ($a + b$) por unidad de área, obtenidos en este estudio no sobrepasaron los reportados por **Enríquez (2005b)** para esta especie y zona de estudio, que llegó a medir un máximo de 267.7 mg m^{-2} .

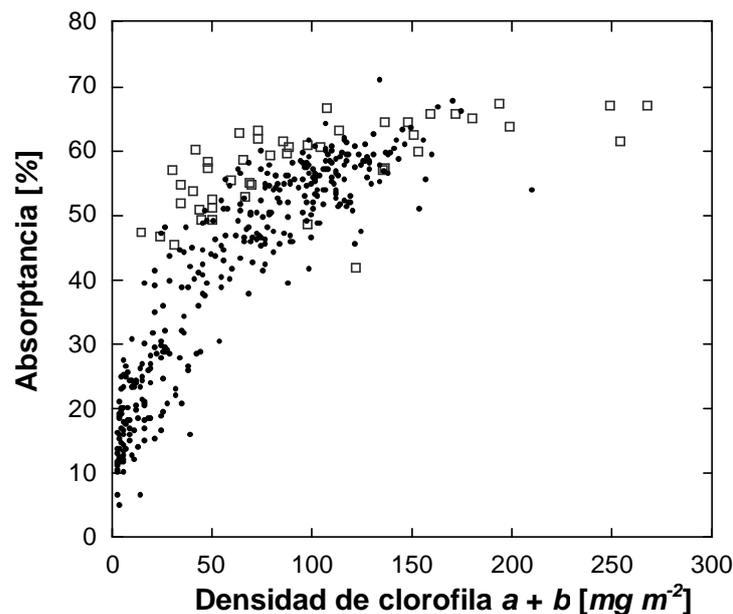


Figura 21. Comparación de la variabilidad de la capacidad de absorción de luz (absorbancia) versus densidad de clorofila $a + b$ de los datos de este estudio (rombos negros) con los reportados por Enríquez, 2005b (cuadros grises).

Este resultado confirma que las hojas de *T. testudinum* siguen presentando valores de densidad de clorofila inferiores a los reportados para los pastos marinos de ecosistemas templados, que presentan promedios entre 200 y 440 mg clorofila m^{-2} (Enríquez *et al.*, 1992; Enríquez *et al.*, 2004;

Enríquez, 2005b), cinco y doce años después que los reportados por los estudios de **Enríquez (2005b)** y **Enríquez et al. (1992)** para las mismas praderas, localizadas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Quintana Roo.

5.3.2 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la capacidad de absorción de luz, absorptancia.

La amplia variabilidad examinada de la densidad de clorofila se reflejó en una variación de sólo un orden de magnitud en la capacidad de absorción de luz (PAR , 5.4-71.0%), lo que representó una variación de hasta 13 veces, de nuevo la mayor analizada hasta la fecha en pastos marinos (**Figura 21**).

De las escasas comparaciones interespecíficas de la absorptancia que se han realizado, destaca el trabajo de **Enríquez et al. (1992)** que reportan los valores más bajos de absorptancia en las hojas de los pastos marinos tropicales de pequeño porte del Caribe como *Halodule wrightii* (<50%) y *Halophila ovalis* (<51%). Especies templadas de porte similar al *H. wrightii* como *Ruppia maritima* y *Ruppia cirrhosa* muestran valores mayores, al igual que su equivalente en el Indo-Pacífico, *Halodule uninervis* (>67%). **Durako (2007)** determinó que la absorptancia promedio de las especies de gran porte como *Posidonia australis*, *P. sinuosa*, *P. coriacea*, *P. angustifolia*, *Amphibolis antarctica*, *A. griffithii*, *Zostera tasmanica*, *Z. capricorni* y la de pequeño porte, *Halophila ovalis*, fue de $57 \pm 6\%$, presentándose solamente un 10% en promedio de variación de la capacidad de absorber luz entre las nueve especies, recolectadas en distintos sitios de las costas australianas. La máxima capacidad para absorber luz de las hojas de *Thalassia testudinum* registrada en el presente estudio fue de 71% de la luz incidente en promedio en el rango del PAR. Sin embargo, los valores promedios de este estudio para hojas maduras (excluyendo los valores de los segmentos inmaduros) fueron similares a los promedios reportados por **Enríquez (2005b)** y **Enríquez et al. (1992)**, con valores cercanos al 60% de la luz incidente del PAR, absorbida por la hoja.

La capacidad para absorber luz, absorptancia, depende de la sección transversal de pigmentos, es decir, de la densidad de pigmentos por unidad de área (clorofila *a*, *b* + carotenoides-xantofilas) presentes dentro de las estructuras fotosintéticas, en este caso del tejido foliar. Estas variables, absorptancia *versus* densidad de pigmentos mostraron una asociación

significativa y positiva, aunque no lineal (Log-log, $r = 0.92$, $p < 0.0001$, $n = 345$). La menor variabilidad presentada por la capacidad de absorción de luz, comparada con la densidad de pigmentos por unidad de área, se debe a que la absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos se va aproximando asintóticamente a un valor máximo conforme incrementa la densidad de pigmentos, ya que éstos se auto-somborean cada vez más y limitan fuertemente su capacidad de absorción de luz. Este valor máximo en las hojas de *T. testudinum* de la laguna arrecifal de Puerto Morelos es de $61.3 \pm 0.41\%$ ($n = 45$) y se alcanza a valores de densidades de pigmentos por encima de los 142 mg m^{-2} . El 17% de variabilidad, en promedio, encontrado en la absorptancia para densidades similares de pigmentos (para 100 mg m^{-2}), permite suponer que las variaciones de la anatomía de las hojas de *T. testudinum*, asociadas a cambios no tanto en la distribución de pigmentos sino en el volumen de hoja que ocupan (grosor de la epidermis), en el volumen total de la hoja (grosor total) y en el volumen de los *lacunae* (densidad de hoja), además del desarrollo de cristales de oxalato cálcico dentro de las células epidérmicas, podrían ser los responsables de explicar esta variación en la capacidad de absorción de luz. Las variaciones observadas en este estudio de la morfología de la hoja apoyan esta conclusión, pues se encontraron diferencias importantes tanto en el grosor de la hoja ($110\text{-}410 \mu\text{m}$), de la epidermis ($8.7\text{-}18.8 \mu\text{m}$), y del sistema lacunar ($15.3\text{-}162.0 \mu\text{m}$), así como en el área específica ($104.7\text{-}378.0 \text{ cm}^2 \text{ gPS}^{-1}$).

La complejidad de la interpretación biológica de modelos multivariantes que además están constituidos por parámetros no independientes, es decir, que covarían entre ellos, es muy alta. Para ello y con el fin de determinar la magnitud de la contribución individual de cada parámetro para explicar la variabilidad observada en la absorptancia, se simuló la variabilidad de la absorptancia vs. la variación del contenido de pigmentos por unidad de peso [mg gPS^{-1}], a partir del modelo matemático obtenido. Según esto, se simuló el efecto sobre la relación de la absorptancia vs. el contenido de pigmentos, de la variación del grosor de la hoja manteniendo fijo en su valor promedio de la base de datos, la densidad de hoja (**Figura 22a**). Así como el caso inverso, manteniendo fijo en su valor promedio el grosor de la hoja (**Figura 22b**), se simuló el efecto de la densidad sobre la asociación de la absorptancia vs. el contenido de pigmentos. La variación utilizada en la simulación se mantuvo

siempre dentro del rango de variación natural observado en la base de datos. Los resultados obtenidos de esta simulación se ilustran en los siguientes gráficos:

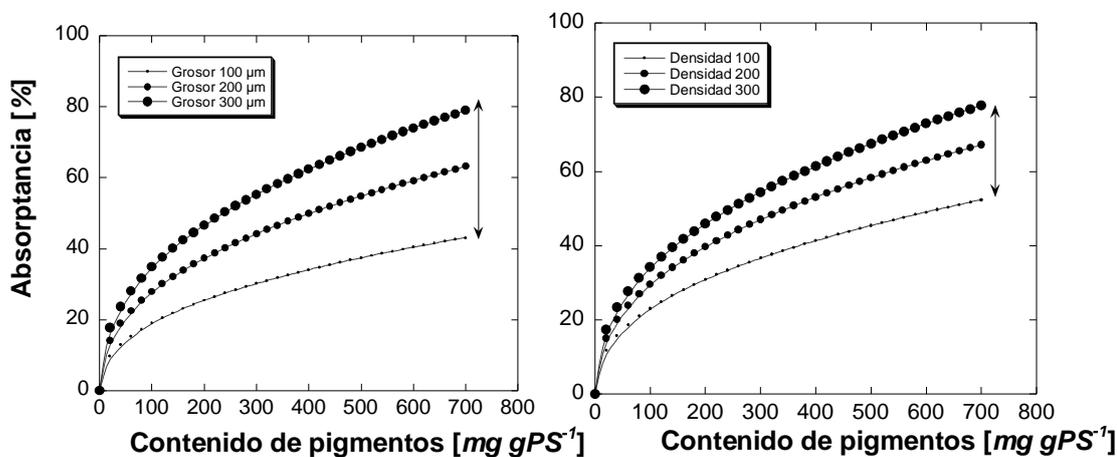


Figura 22. Comparación del efecto de la variabilidad del grosor de hoja (a) y la densidad de hoja (b) sobre la relación absorbancia vs. los pigmentos por unidad de peso.

Esta simulación permitió observar que la variabilidad del grosor de la hoja afecta a la asociación entre la absorbancia y la variación del contenido de pigmentos, en mayor grado (~40%) que la variabilidad de la densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen, ~30%). Las implicaciones biológicas de estos resultados son muy importantes pues significa que si un aumento del grosor de la hoja permite alargar el paso óptico efectivo de la luz y mejorar la capacidad de absorción de luz, estas hojas podrían reducir significativamente los costos de inversión en pigmentos, y hacer hojas menos costosas para la planta en términos de nitrógeno y proteínas. Es decir, *Thalassia testudinum* y probablemente todos los pastos marinos de anatomía foliar similar a ella, pueden producir hojas más gruesas, con contenidos menores de pigmentos por sección transversal de hoja, sin comprometer su capacidad de absorción de luz. El aumento del grosor de hoja implica también un incremento del tamaño de los lacunae (sistema lacunar) y por tanto, no necesariamente requiere de una mayor inversión estructural en carbono. Esta interpretación del papel del grosor de la hoja en la respuesta fotoaclimatativa de los pastos marinos contrasta fuertemente con las explicaciones tradicionales que se han reportado en el ámbito de la ecología terrestre (Björkman, 1981; Terashima & Saeki, 1983; Vogelmann, 1993; Vogelmann & Martin, 1993), en dónde un aumento del grosor de la hoja está asociado siempre a mayores

requerimientos de luz, como consecuencia del fuerte gradiente interno de luz que se forma en el interior del tejido (**Terashima & Saeki, 1983; Vogelmann, 1993; Vogelmann & Martin, 1993**). La contribución de estos descriptores morfológicos de la hoja (grosor y densidad) a sus propiedades ópticas con independencia de su contenido en pigmentos, podría explicar el 17% en promedio de incertidumbre estimado en este estudio comparativo para la relación: absorptancia vs. densidad de pigmentos por unidad de área (**Figura 14**). Otra importante conclusión de esta simulación, es que las hojas de *T. testudinum* al aumentar el grosor y/o la densidad de la hoja, mejorarán significativamente la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos, lo que permitirá una disminución de su empaquetamiento o aumento de su eficiencia de absorción de luz.

La importancia del grosor de la hoja en la determinación de las propiedades ópticas de los talos de macroalgas, ha sido previamente considerada en los estudios de **Ramus (1978, 1990)** y **Enríquez et al. (1994)**. El primer autor comparando la capacidad de absorción de luz de talos de *Ulva* sp. y *Codium* sp., encontró que la variación del grosor del talo tenía un significativo efecto sobre la absorptancia, es decir, talos delgados de *Ulva* sp. absorbían alrededor de un 15% de la luz incidente, mientras que talos gruesos de *Codium* sp. conseguían absorber más de un 90%. Comparaciones alométricas sobre un amplio rango de macrófitos marinos han proporcionado ya una primera evaluación de la importancia relativa del contenido de pigmentos frente al grosor del talo (**Enríquez et al. 1994**). Sin embargo, estos autores no habían encontrado el mismo efecto del grosor para el grupo de los pastos marinos (**Enríquez et al., 1992, 1994**). **Durako (2007)** recientemente determinó que las hojas de pastos marinos de pequeño porte como *Halophila ovalis*, tienen una menor absorptancia promedio (53.5%), comparada con las especies de mayor porte como *Posidonia australis*, *P. sinuosa* y *Zostera tasmanica* (rango 56.5-63.5%), pero no aporta evidencias de que el tamaño de la planta se corresponda con cambios similares paralelos en el grosor de la hoja.

Se han documentado ejemplos en ambientes acuáticos que señalan que el aumento del grosor de las estructuras fotosintéticas (células fitoplanctónicas y talos de macroalgas), mejora la capacidad de absorber luz (**Ramus, 1978; Morel & Bricaud, 1981; Ramus, 1990**). En estudios sobre las propiedades

ópticas de hojas de plantas terrestres se observó que el grosor de la hoja está significativamente correlacionado con la capacidad para transmitir y reflejar la luz incidente (**Knapp & Carter, 1998**) y con la capacidad de alargar el paso óptico efectivo de la luz (**Rühle & Wild, 1979**). En el estudio de **Knapp & Carter (1998)** se examinaron hojas de 26 especies terrestres, concluyendo que existe una mayor relación entre el grosor de la hoja y la capacidad de absorción de luz, que con la variación del peso específico de la hoja (SLM ó LMA= 1/SLA). Mientras que, en el estudio intraespecífico de **Enríquez & Sand-Jensen (2003)** se concluyó que es la densidad del tejido (volumen de los espacios aéreos en el mesófilo) y no el grosor de la hoja, el descriptor morfológico que mejor explica la variabilidad encontrada en la capacidad y eficiencia de absorción de luz de las hojas de la planta anfibia *Mentha aquatica*.

Es importante también señalar que por encima de un valor máximo de la absorptancia, que en plantas terrestres es del 83% y en *Thalassia testudinum* se ha estimado en este estudio del 61%, incrementos en el contenido de pigmentos o en el grosor de la hoja, no se van a reflejar en una mejora significativa de la absorptancia, aunque sí pueden tener consecuencias muy distintas sobre la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos. Es decir, mientras que un aumento del grosor de la hoja puede contribuir significativamente a aumentar esta eficiencia, una mayor inversión en pigmentos puede contribuir significativamente a reducirla.

Otros estudios han documentado que la importancia del grosor de la hoja sobre las propiedades de absorción de luz, puede pasar inadvertida cuando se comparan pequeños rangos de variación en especies poco plásticas para este parámetro, y en donde los cambios en la densidad de hoja pueden ser mucho más importantes. Comparaciones amplias en un grupo taxonómico muy variable en cuanto a su morfología como las macroalgas (**Ramus, 1978, 1990**) y/o el fitoplancton (**Morel & Bricaud, 1981; Agustí, 1991a**), han llegado a considerar variaciones en el grosor de hasta en 100 veces. En otras especies o en comparaciones interespecíficas en la habilidad competitiva de la obtención de recursos como la luz, diferencias en el grosor de la estructura fotosintética (talo u hoja) podría mejorar sustancialmente la capacidad o eficiencia de absorción de luz, más que el propio aumento del contenido de pigmentos, lo

que supondría un ahorro en la construcción del aparato colector de luz de la membrana fotosintética.

Las variaciones encontradas entre especies en la anatomía del tejido, asociadas a la diversidad y complejidad de opciones evolutivas de la estructura fotosintética, han desarrollado una amplia gama de posibilidades en la organización y distribución de los pigmentos, así como, en la presencia de estructuras dispersivas como espacios aéreos, cristales u otros cuerpos intra o intercelulares que pueden facilitar el aumento del paso óptico efectivo de la luz (**Ramus, 1978; Rühle & Wild, 1979; Ramus, 1990; Vogelmann, 1993; Vogelmann & Martin, 1993; Vogelmann et al., 1996; Enríquez et al., 2005**). En este sentido, los organismos han evolucionado por un lado, para tratar de maximizar la absorción de luz en condiciones favorables para la fotosíntesis, pero también, para tratar de maximizar la eficiencia del uso de los recursos disponibles en coleccionar luz (**Enríquez & Sand-Jensen, 2003; Enríquez, 2005b**). Un tejido más grueso puede reducir la inversión en complejos pigmentos-proteínas, si es capaz de desempaquetar los pigmentos, pues los vuelve más eficientes para coleccionar luz. Con el aumento del grosor se podría favorecer la dispersión múltiple de la luz interna, lo que permitiría incrementar la probabilidad de que un fotón sea absorbido al alargar su paso óptico efectivo (**Rühle & Wild, 1979; Enríquez et al., 2005**) y reducir el empaquetamiento. Por otro lado, se debe considerar que aumentar el grosor de hoja tiene también un límite, pues la planta no puede comprometer en exceso la producción fotosintética como consecuencia del *efecto paquete* o autosombra de los pigmentos dentro del tejido, ya que el aumento del grosor de la estructura fotosintética ejerce una mayor limitación sobre el metabolismo fotosintético que sobre el respiratorio (**Enríquez et al., 1996**). En las hojas aquí examinadas de *Thalassia testudinum*, un aumento del grosor de hoja puede favorecer el aumento del paso óptico efectivo de la luz, debido a la presencia de estructuras refractivas como el sistema lacunar, las grandes vacuolas, las paredes de las células y los cristales de oxalato de calcio dentro de la epidermis, sin comprometer en exceso la fotosíntesis pues el tejido que regula el aumento del grosor, el aerénquima, no está pigmentado y la actividad fotosintética está reducida a la epidermis.

5.3.3 Tipos morfológicos de hojas en *Thalassia testudinum* y sus propiedades ópticas.

Este estudio encontró que las variables grosor de hoja, densidad de hoja y pigmentos por unidad de peso, están inter-correlacionadas. El análisis de rutas mostró que las tres variables afectan directa y positivamente la variación de la sección transversal de pigmentos, así como la variación de la capacidad de absorción de luz (**Figuras 15, 16**). Considerando esta colinearidad observada en la base de datos general se infiere que durante el crecimiento o trayectoria ontogénica de las hojas, se presentan dos tipos fundamentales de segmentos a lo largo de la misma hoja (**Figura 23**). El Tipo I corresponde a un segmento de hoja inmaduro (parte más basal de la hoja), con menor contenido de pigmentos por unidad de peso, mayor grosor de hoja y por tanto, menor densidad. Este tipo de segmento significó en la base de datos general un 31% del total de muestras analizadas en la base de datos, lo que permitió aumentar significativamente el rango de variación considerado en este estudio comparativo. El segmento de hoja Tipo II, corresponde, por el contrario, a un segmento de hoja maduro (cercano o no al ápice), generalmente más delgado, que presenta mayor contenido de pigmentos y densidad de hoja.

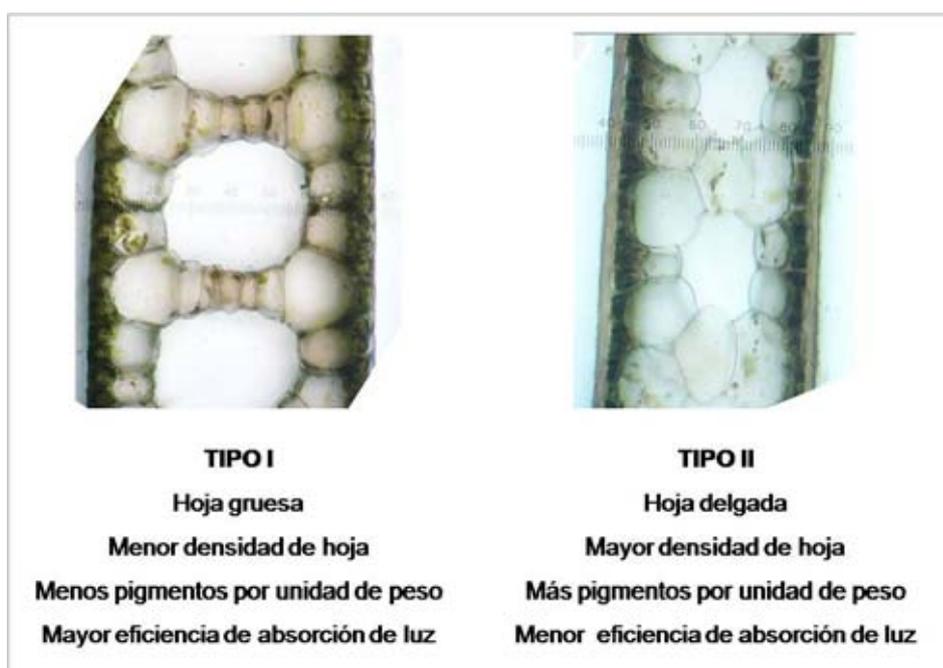


Figura 23. Tipos de segmentos de hojas presentes durante el crecimiento o trayectoria ontogénica de las hojas del pasto marino *Thalassia testudinum*.

El tipo de covariación encontrada entre las tres variables y la fuerte asociación entre el contenido de pigmentos por unidad de peso y la eficiencia de absorción de luz, a^* , explican las correlaciones encontradas entre el grosor de hoja y la densidad con a^* , positiva para el grosor y negativa para la densidad. Es decir, el menor contenido de pigmentos por unidad de peso que muestran las hojas inmaduras, que son además más gruesas, explicaría la asociación positiva encontrada entre a^* y el grosor de hoja. Del mismo modo, el hecho de que estas hojas son además menos densas explicaría la asociación negativa de a^* y la densidad de hoja.

5.3.4 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de área sobre la eficiencia de absorción de luz.

La pérdida de eficiencia de los pigmentos fotosintéticos en absorber luz cuando están organizados *in vivo* dentro de estructuras fotosintéticas se denomina *efecto paquete*. Este fenómeno se ha observado y descrito para organismos unicelulares (Duysens, 1956; Kirk, 1975, 1976, 1994; Morel & Bricaud, 1981) y también se ha comprobado que afecta a estructuras dispersivas multicelulares (Enríquez & Sand-Jensen, 2003; Enríquez, 2005b; Enríquez *et al.*, 2005). La caída de la eficiencia de absorción de luz al aumentar la densidad de pigmentos por unidad de área no es lineal, y su magnitud varía entre diferentes estructuras fotosintéticas según el grado de empaquetamiento de sus pigmentos (i.e., Geider & Osborne, 1992; Enríquez & Sand-Jensen, 2003; Enríquez, 2005b). El fenómeno que compensa el efecto paquete en estructuras dispersivas, es la *dispersión múltiple*, la cual permite incrementar la eficiencia de absorción de luz al incrementar el paso óptico efectivo de la luz y por tanto, la probabilidad de que un fotón sea absorbido por molécula de pigmento (Ramus, 1978; Rühle & Wild, 1979; Ramus, 1990; Vogelmann & Martín, 1993; Enríquez *et al.*, 2005) y generar diferencias significativas entre especies en el patrón de empaquetamiento.

La eficiencia de absorción de luz (coeficiente específico de absorción, a^*) de los pigmentos fotosintéticos mostró una variación de un orden de magnitud (0.0034-0.0693 $m^2 mg^{-1}$), lo que al igual que la absorptancia puede estar asociado además de a la variabilidad de la densidad de pigmentos, a los cambios estructurales de la morfología foliar. El análisis de la asociación entre

a^* y la densidad de pigmentos por unidad de área, permitió obtener un factor de escala, que al corregirse (Niklas, 1994) mostró un valor cercano a $-1/2$ (-0.52), lo que significa que la eficiencia de absorción de luz decae no linealmente al aumentar la sección transversal de pigmentos. Éstos resultados vuelven a confirmar que las hojas de *Thalassia testudinum* sufren el efecto paquete y que este empaquetamiento es menor a bajas densidades de pigmentos.

El valor de la pendiente log/log o factor de escala, también indica que la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos no decae tan rápidamente al aumentar la densidad de pigmentos como el patrón descrito para las hojas de la planta anfibia *Mentha aquatica* (Enríquez & Sand-Jensen, 2003) y como predecía el modelo reportado por Enríquez (2005b) para hojas del pasto marino *T. testudinum*. Al comparar los valores determinados en el presente estudio para *T. testudinum* (factor de escala = $-0.52 \pm \text{E.E.} = 0.10$), con los proporcionados por Enríquez (2005b) para la misma especie (factor de escala = $-0.84 \pm \text{E.E.} = 0.03$), se observó que los valores de ambas bases de datos coinciden a altas densidades de pigmentos, pero que los valores de a^* , determinados en hojas poco pigmentadas por Enríquez (2005b) predicen valores 1.3 veces mayores que los valores determinados en este estudio (Figura 24). La mayor parte de los segmentos de hojas poco pigmentados que se han examinado en este estudio corresponden a segmentos de hojas inmaduras que todavía no han desarrollado la respuesta fotoaclimatativa completa, sin embargo el estudio de Enríquez (2005b) se basa exclusivamente en segmentos maduros. En base a estas diferencias se puede concluir que, el grado de empaquetamiento de los pigmentos en segmentos inmaduros de la hoja parece ser menor al predecible a partir de una comparación de segmentos maduros.

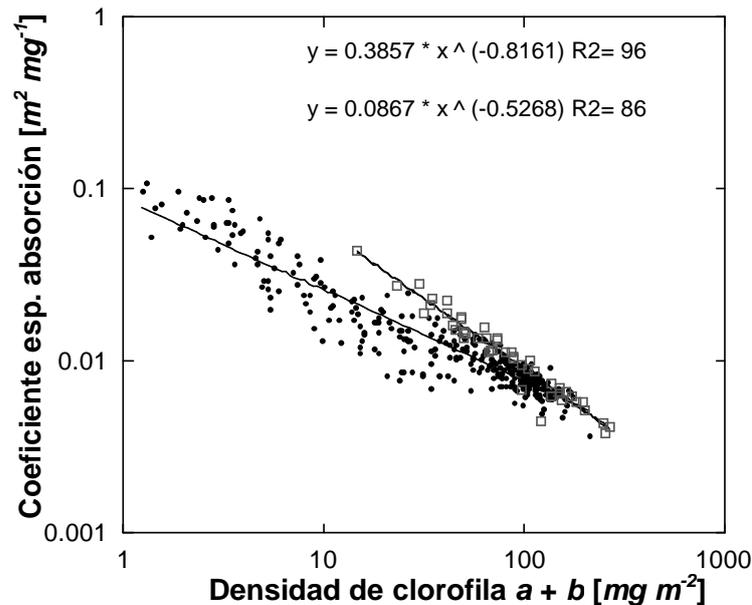


Figura 24. Comparación de la variabilidad de la eficiencia de absorción de luz (coeficiente específico de absorción) versus densidad de clorofila *a* + *b* de los datos de este estudio (rombos negros) con los reportados por Enríquez, 2005b (cuadros grises).

La morfología foliar *inmadura* de los pastos marinos podría explicar la significativa reducción encontrada en la eficiencia de absorción de luz de las hojas poco pigmentadas. La parte de la hoja que no ha completado su desarrollo estructural, es más delgada, pero además no ha desarrollado todavía los cristales de oxalato de calcio dentro de sus células epidérmicas, que son imperceptibles o muy pequeños como se observó en este estudio y se describe en el capítulo 3.

Al examinar la variabilidad de la eficiencia de absorción de luz de los segmentos inmaduros (**Figura 25**), se encontró que los segmentos inmaduros se comportaban de forma distinta atendiendo al tipo de *inmadurez*. Los segmentos inmaduros desde la perspectiva de pigmentos pero maduros desde el punto de vista estructural (cuadros rojos), tienen mayores eficiencias de absorción de luz que los segmentos inmaduros estructuralmente (triángulos verdes). Esto sugiere que los cambios en la morfología asociados a la maduración de la hoja (aumento del grosor de la hoja y de la epidermis) que ocurren antes de la maduración pigmentaria, contribuyen a mejorar la eficiencia de absorción de los pigmentos. Sin embargo, esta mejora no permite alcanzar los valores que predice el modelo comparativo reportado por **Enríquez (2005b)**, que serían en promedio 1.3 veces mayores que los determinados en

este estudio. La diferencia más importante entre las dos bases de datos es el tipo de segmento examinado, ya que las hojas poco pigmentadas utilizadas por **Enríquez (2005b)** son segmentos próximos al ápice de la hoja.

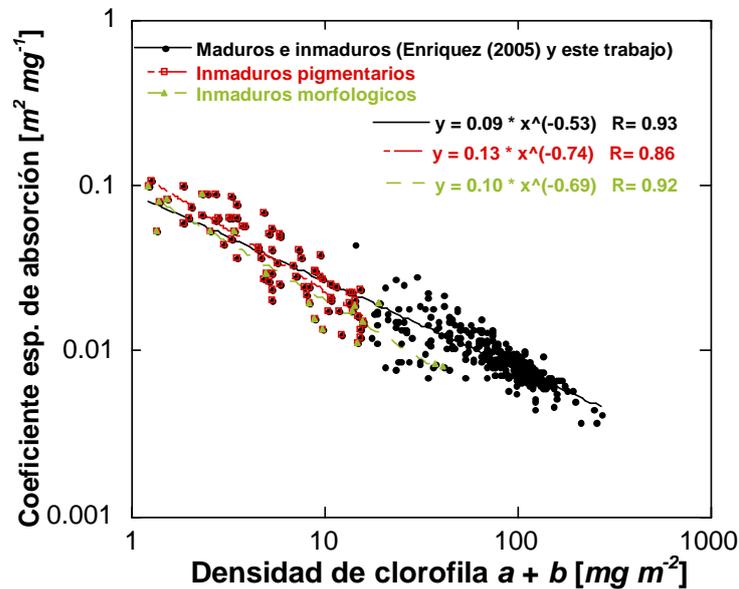


Figura 25. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función de la densidad de clorofila $a + b$, separando los segmentos inmaduros de los maduros.

5.3.5 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de volumen y la morfología foliar sobre la eficiencia de absorción de luz.

El análisis de regresión simple entre la eficiencia de absorción de los pigmentos fotosintéticos *versus* los pigmentos por unidad de volumen mostró un factor de escala corregido de -0.50, similar al encontrado para la variación de la sección transversal o pigmentos por unidad de área, de -0.52. Este resultado, al igual que el obtenido para los pigmentos por unidad de área, sugieren la necesidad de explorar las características morfológicas internas de las hojas de *Thalassia testudinum*, pues éstas podrían ser las responsables de que no se observe una fuerte disminución del coeficiente específico de absorción, a^* , a pesar del fuerte empaquetamiento que sufren los pigmentos dentro del pequeño volumen de la epidermis.

Al comparar el contenido de pigmentos por unidad de volumen de las hojas del pasto marino *T. testudinum* con los pigmentos de la planta anfibia *M. aquatica*, se observó que la concentración de pigmentos en las hojas del pasto marino variaron entre 0.47 y 28.0 $mg m^{-3}$ (promedio 10.7 $mg m^{-3}$), mientras que en las hojas de la planta anfibia variaron entre 0.28 y 4.56 $mg m^{-3}$ (promedio

1.91 $mg\ m^{-3}$, **Enríquez & Sand-Jensen, 2003**). Esto muestra que las hojas del pasto marino *T. testudinum* tienen valores alrededor de un orden de magnitud mayores que la planta anfibia, aunque a bajas concentraciones de pigmentos los valores son similares. Sin embargo, el análisis comparativo de la asociación entre el coeficiente específico de absorción, a^* , y la densidad de pigmentos por unidad de área de las hojas de *T. testudinum* y *M. aquatica* (**Enríquez, 2005b**) ha documentando que la eficiencia para absorber luz de *T. testudinum* es inferior en casi todo el rango examinado en sólo un 38% en promedio, lo que parece poco considerando las enormes diferencias en concentración de pigmentos por unidad de volumen. Este resultado sugiere que deben existir otras propiedades ópticas que están favoreciendo que los pigmentos en las hojas de *T. testudinum* no sufran un dramático aumento del efecto paquete con respecto a otras morfologías foliares cuyo mesófilo no se encuentra tan *empaquetado* como las hojas de plantas terrestres.

El mesófilo bifacial de las plantas terrestres consiste en un parénquima de empalizada, que permite dirigir la luz hacia el interior de la hoja (**Vogelmann, 1993; Vogelmann & Martin, 1993**), y un mesófilo esponjoso (**Tomlinson, 1980**), que por medio de los amplios espacios aéreos pueden incrementar el paso óptico efectivo de la luz (**Rühle & Wild, 1979; Vogelmann & Martin, 1993; Vogelmann et al., 1996**). La adaptación morfológica de los pastos marinos al medio marino podría haber resultado en una significativa reducción de su habilidad para coleccionar la luz. Sin embargo, **Enríquez et al. (1992)** y **Enríquez (2005b)** ofrecen evidencias de la alta eficiencia para absorber luz de los pastos marinos de zonas templadas, que poseen anatomías foliares similares a la de *Thalassia testudinum*. Al comparar la eficiencia de absorción de luz de las hojas de los pastos marinos templados con las hojas de *Mentha aquatica*, **Enríquez (2005b)** encuentra que los primeros presentaron incluso una mayor eficiencia para absorber luz, para valores similares de clorofila *a* por unidad de área, que esta especie anfibia de zonas húmedas, templadas y frías del norte de Europa (**Enríquez & Sand-Jensen, 2003; Enríquez, 2005b**). Estos resultados sugieren que la menor habilidad para coleccionar luz reportada para las hojas de *T. testudinum*, no sería una limitación de la morfología general de las hojas de los pastos marinos como grupo, sino que podría ser una especial característica adaptativa de esta

especie tropical que suele habitar aguas muy iluminadas. Las hojas de las especies templadas de pastos marinos parece que han desarrollado eficaces mecanismos para contrarrestar el fuerte empaquetamiento de sus pigmentos y no afectarse drásticamente por el efecto de auto-sombra o efecto paquete. La observación de que los pastos marinos templados mantienen un coeficiente específico de absorción, a^* , que es 1.4 veces mayor que el determinado para las hojas de *M. aquatica*, para una misma densidad de pigmentos por unidad de área, implica que algunas especies han conseguido contrarrestar la aparente subóptima distribución de pigmentos, sin sufrir una fuerte reducción de su eficiencia de absorción de luz (**Enríquez, 2005b**). No se conoce lo suficiente acerca de los mecanismos estructurales responsables de esto, pero podrían estar relacionados tanto con la morfología foliar, como con la misma estructura de la membrana fotosintética (i.e., mayores antenas).

Por otro lado, no se encontró una correlación significativa entre a^* , y el grosor de epidermis. Sin embargo, al examinar el efecto combinado de los pigmentos por unidad de volumen y el grosor de epidermis sobre la variación de a^* , se observó que sí existe un efecto directo significativo y negativo del grosor de la epidermis sobre a^* . El modelo múltiple obtenido indica que el grosor de la epidermis tiene incluso un mayor efecto de auto-sombra de los pigmentos, que la propia variación de la concentración de pigmentos por unidad de volumen. Este resultado sugiere que para valores similares del contenido de pigmentos por unidad de volumen, un aumento del grosor de la epidermis resulta en un mayor empaquetamiento de los pigmentos, mientras que menores grosores pueden favorecer una mejora de su eficiencia de absorción de luz. No obstante, un aumento del grosor de la epidermis también permite reducir fuertemente la concentración de pigmentos por unidad de volumen y mejorar su eficiencia de absorción de luz, por lo que aumentar el grosor de epidermis también puede contribuir indirectamente al desempaquetamiento de los pigmentos. En este sentido, nuestros resultados apoyan la interpretación de **Agustí (1991a, b)** que señala que las estrategias de las células fitoplanctónicas para reducir el efecto paquete, es regular convenientemente la concentración intracelular de pigmentos, C_i , y/o el diámetro celular equivalente, d . Lo que sugiere que una especie de mayor tamaño (> diámetro celular equivalente), que sufre un mayor empaquetamiento

de los pigmentos que una célula pequeña, para evitar el auto-sombreado, reduce su concentración intracelular de pigmentos. Esto, trasladado a especies multicelulares podría sugerir una capacidad de asignar un tamaño conveniente del receptáculo de pigmentos ante la variabilidad del campo lumínico, en función de los recursos disponibles.

5.3.6 Análisis del efecto del contenido de pigmentos por unidad de peso y la morfología foliar sobre la eficiencia de absorción de luz.

Considerando que los cambios morfológicos de la hoja no sólo involucran cambios en el volumen foliar (grosor de epidermis), sino también cambios en la densidad de hoja (peso por unidad de volumen de hoja), se exploró la variación del coeficiente específico de absorción, a^* , en función de los cambios en el contenido de pigmentos por unidad de peso. Este análisis mostró una asociación negativa y significativa, con un factor de escala corregido de -0.55, similar al determinado para los otros descriptores de pigmentos, expresados por unidad de área, -0.52, y volumen, -0.50. El contenido de pigmentos por unidad de peso examinado varió de 8.2 a 698.1 $mg\ gPS^{-1}$, representando una variación en dos órdenes de magnitud.

En el modelo de regresión múltiple realizado con los pigmentos por unidad de peso y el peso específico, LMA, no se determinó ningún efecto significativo del LMA sobre la eficiencia de absorción de luz, a^* . Lo que sugiere que todo el posible efecto de los cambios en el peso específico de la hoja, LMA, sobre la eficiencia de los pigmentos en absorber luz, podrían estar asociados a los cambios en el contenido de pigmentos por unidad de peso, pues no existe un efecto independiente del LMA. Estos resultados apoyan los reportados por **Knapp & Carter (1998)** que encontraron un efecto significativo del grosor de la hoja sobre la reflectancia, pero no sobre el peso específico, en su análisis comparativo entre 26 especies terrestres.

5.3.7 Comparación de la variabilidad de pigmentos expresados por unidad de área, volumen y peso, en función de la eficiencia de absorción de luz.

Para las tres expresiones de pigmentos, por unidad de área, volumen y peso, se observó que un aumento en la cantidad de pigmentos, disminuye la eficiencia de absorción de luz, y que esta caída sigue un patrón no lineal en los

tres descriptores (**Figuras 16, 17a, 18a**). El factor de escala de la densidad de pigmentos por unidad de área fue -0.52, el de la concentración de pigmentos por unidad de volumen fue -0.50, y el del contenido de pigmentos por unidad de peso fue -0.55. Éstos resultados indican que la disminución de a^* es similar al aumentar el contenido de pigmentos, sin importar si se expresa como cambios en la sección transversal (contenido por área proyecta), por volumen foliar (concentración) o por peso seco, aunque éstos últimos son los que causan un mayor efecto sobre a^* . Es decir, las hojas de *Thalassia testudinum* sufren un ligero mayor *empaquetamiento* de los pigmentos al aumentar los pigmentos por unidad de peso, posiblemente a través de los cambios que la morfología de las hojas de *T. testudinum* ejercen sobre la sección transversal de pigmentos.

Esto sugiere que las hojas de *T. testudinum*, deben regular la variabilidad de sus tejidos para maximizar la capacidad y eficiencia con que absorben luz. Estos tejidos, conforman las tres capas celulares de la hoja, cada una con características ópticas distintas, las cuales determinan su grosor total. Las dos capas de células epidérmicas, con un determinado coeficiente de dispersión, s_e , y otro de absorción, a_e , debida a la presencia de pigmentos y de cristales de oxalato de calcio (**Dobbs et al., 2004**) y la tercera capa, el aerénquima, que probablemente sólo contribuye a dispersar la luz, s_a .

Una estrategia para evaluar el efecto de cada una de las capas de células de la hoja, sobre la capacidad y eficiencia de absorción de luz, es mediante modelos de simulación como el de Monte Carlo. Éste modelo puede simular y predecir la habilidad para absorber y dispersar-esparcir la luz de cada capa del tejido de la hoja (**Wang & Jacques, 1992**). Para ello, se deben conocer los valores del coeficiente de absorción, a , y dispersión, s , de cada tejido como resultado de la integración del efecto de los pigmentos, los cristales, la densidad de células, así como de un factor crucial, el grosor total de la hoja y de cada tejido que la conforma. Es importante considerar que pequeños cambios en el grosor pueden ejercer un fuerte efecto sobre la absorción de luz de toda la hoja. Esto se debe a que el grosor de la hoja, es la suma de lo que regula la variación de la epidermis y lo que regula la variación del aerénquima. La simulación de Monte Carlo es uno de los retos a perseguir a partir de este estudio comparativo.

VI. CAPITULO 2

ANÁLISIS DE LA RESPUESTA FOTOACLIAMATATIVA DE LAS
HOJAS DE *THALASSIA TESTUDINUM*.

6.1 Materiales y Métodos.

Las hojas de los pastos marinos se desarrollan a partir de un meristemo apical situado en el extremo del rizoma vertical, de forma que las hojas más jóvenes se encuentran dentro del haz de hojas y las más viejas son las que ocupan una posición más exterior, próxima a desprenderse del haz. Las hojas crecen también a partir de un meristemo basal situado entre la vaina y la hoja, que permite su elongación, por tanto, la parte basal de la hoja es también la más joven. Las hojas se suelen numerar por orden de edad, de forma que la más joven es la hoja 1 y la más vieja en el caso de *Thalassia testudinum* suele ser la hoja 3. El análisis de la respuesta fotoaclimatativa se hizo sólo para los segmentos maduros de la hoja 2, con el fin de excluir del análisis las partes de la hoja que no habían desarrollado todavía la respuesta fotoaclimatativa completa al campo lumínico disponible en el entorno. La hoja 2, excluyendo su parte basal inmadura, ha completado ya todo su desarrollo a diferencia de la hoja 1, y el daño acumulado sobre la hoja y la cobertura de epífitos son mínimos con respecto al que se observa en hojas más viejas.

En este trabajo se observó que el grado de inmadurez o la frontera entre la hoja inmadura y madura de *T. testudinum* es diferente para la maduración estructural y para la maduración pigmentaria. La razón es que la hoja se desarrolla antes dentro de un haz que está enterrado en el sedimento. El desarrollo de la pigmentación no se induce hasta que se disparan los genes que codifican la formación de los cloroplastos, cuando sienten suficiente luz (**Mullet, 1998**). Por ello, se han seguido dos criterios para definir un segmento maduro. El primero, de la maduración morfológica, siguiendo el patrón de variación del área específica, SLA, para definir a partir de su valor mínimo (en la parte basal) a la hoja madura. La maduración morfológica de los haces foliares en cada pradera fue diferente, es decir, que la separación de los segmentos maduros en función del SLA fue distinta para cada una de las seis praderas. En la pradera A y B los segmentos inmaduros fueron 0-2, en la C fueron los segmento del 0-2 a 14-16, en la D fueron de 0-2 a 8-10, en E fueron de 0-2 a 4-6 y en la pradera F fueron los segmentos 0-2 y 2-4. El segundo criterio, el pigmentario, se aplicó en base al patrón de variación de la densidad de pigmentos por unidad de área, y excluyó la parte de significativa menor

pigmentación o zona inmadura en la base de la hoja. La variabilidad de los pigmentos entre praderas fue más homogénea, ya que los segmentos inmaduros fueron de 0 a 3cms en todos los sitios, excepto en D, donde los segmentos inmaduros fueron de 0-5cms.

6.1.1 Análisis estadístico.

En este segundo capítulo el objetivo fue el análisis de la respuesta fotoaclimatativa de la hoja. Para realizar este análisis sólo se utilizaron los segmentos maduros y se excluyó de la base de datos anterior todos los valores que correspondían a la parte inmadura de la hoja. Para explicar la variabilidad de los descriptores medidos se utilizó la media \pm el error estándar (E.E.) y el coeficiente de variación (C.V.).

La variabilidad entre praderas se representó con gráficos de barras mostrando los promedios \pm el error estándar (E.E.). Para probar si las diferencias observadas eran significativas, se aplicaron análisis de variancia de una vía (donde las praderas son el factor fijo con seis niveles). Cuando se obtuvieron diferencias significativas entre las praderas se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey que determina que pradera (s) es (son) distinta (s) del resto. Finalmente, se analizaron las asociaciones de variación con el coeficiente de correlación de Pearson (r).

6.2 Resultados.

El análisis de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *Thalassia testudinum* se realizó comparando tanto la variación de esta respuesta entre hojas crecidas en diferentes praderas situadas a lo largo de un gradiente de profundidad en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, como la variabilidad de la respuesta que se observa a lo largo de una misma hoja, como consecuencia del gradiente lumínico que se forma en el interior del dosel de cada pradera. Por tanto, la variabilidad de respuestas fotoaclimatativas desplegadas por las hojas de *T. testudinum*, son el resultado de la variabilidad del campo lumínico tanto en profundidad como dentro del dosel de cada pradera.

La descripción de los patrones encontrados está agrupada por sitios o praderas, y dentro del dosel o a lo largo de la hoja de cada pradera y se describen con la media, el error estándar y el coeficiente de variación.

6.2.1 Variación del campo lumínico de las hojas de *T. testudinum* en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).

Variabilidad entre praderas: irradiancia relativa en la superficie del dosel, E_s [%].

Las seis praderas seleccionadas para este análisis variaron entre una profundidad de 0.5m, la más somera (pradera A), hasta una profundidad de 4m, la más profunda (pradera F) situada en el centro de la laguna arrecifal (**Tabla 1**). Según la descripción del campo lumínico realizada por **Olivé et al. (2005)**, aunque la pradera A fue la más somera, la pradera B es la que presentó los valores más altos de irradiancia a la altura del dosel, al tener un dosel alto (**Tabla 1**). Según estos valores, la pradera B recibe 1.8 veces más irradiancia a la altura del dosel (88.8% E_s) que la pradera F (49.6% E_s) (**Figura 26a**), pero estas diferencias se reducen a 1.3 veces cuando se considera el promedio dentro del dosel (**Figura 26a**), y, además es la pradera C la que presenta un promedio mayor (55.8% E_s) y la E la que presenta el menor (41.8% E_s), como consecuencia de las diferencias en la atenuación de luz dentro del dosel (**Figura 26b**).

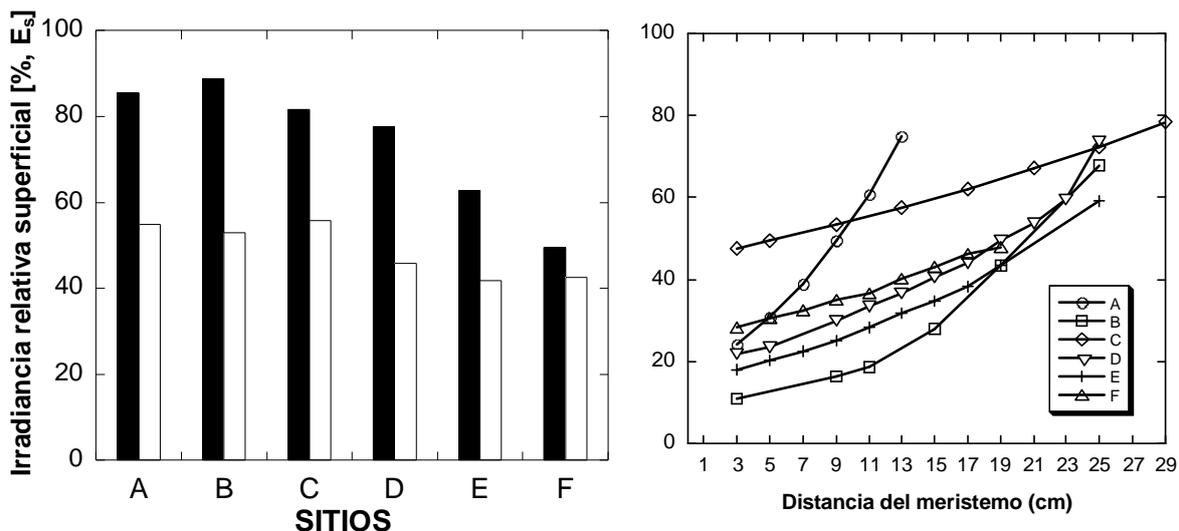


Figura 26. Variabilidad entre praderas a la altura del dosel (negro), variabilidad promedio dentro del dosel (blanco) (a), y a lo largo de la hoja (b) de la irradiancia relativa en la superficie del dosel (E_s).

Variabilidad a lo largo de la hoja: irradiancia relativa dentro del dosel, E_s [%].

Dentro del dosel de cada pradera, la variación del campo lumínico foliar estuvo afectada principalmente por la variación de la densidad de haces de un modo similar al descrito por **Enríquez y Pantoja-Reyes (2005)** para la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Como consecuencia de la dependencia del campo lumínico foliar en la variación de la morfología del dosel entre praderas, las praderas A, B, D y E experimentaron una fuerte reducción de luz dentro del dosel (de la zona apical a la base de las hojas), con una variación de la irradiancia relativa ~35% (**Figura 26b**), mientras que las praderas C y F presentaron los menores valores de atenuación de luz dentro del dosel.

6.2.2 Variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de los pigmentos de las hojas de *T. testudinum* en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).

Variabilidad entre praderas: densidad de pigmentos por unidad de área [$mg\ m^{-2}$].

El sitio A, que corresponde a la pradera más somera, tuvo la menor densidad de pigmentos en promedio por unidad de área ($61.25 \pm 4.39\ mg\ m^{-2}$). Por su parte, las praderas B y D presentaron las mayores densidades de pigmentos (113.85 ± 10.29 y $111.77 \pm 5.07\ mg\ m^{-2}$, respectivamente), lo que significa que

tuvieron 1.9 y 1.8 veces, respectivamente, más pigmentos por unidad de área que el sitio A (**Figura 27a**). Aunque la densidad de pigmentos entre las praderas varió significativamente ($F=12.36$, $n= 260$, $p<0.0001$), sólo la pradera A fue distinta de los sitios restantes (**Tabla 5**). No se encontraron diferencias significativas entre las praderas B a F en cuanto al contenido de pigmentos de sus hojas, a pesar de las diferencias observadas en el campo lumínico a la altura del dosel. Los valores de los segmentos maduros para la densidad de pigmentos por unidad de área mostraron la mayor variabilidad de los descriptores de pigmentos (C.V.=40%).

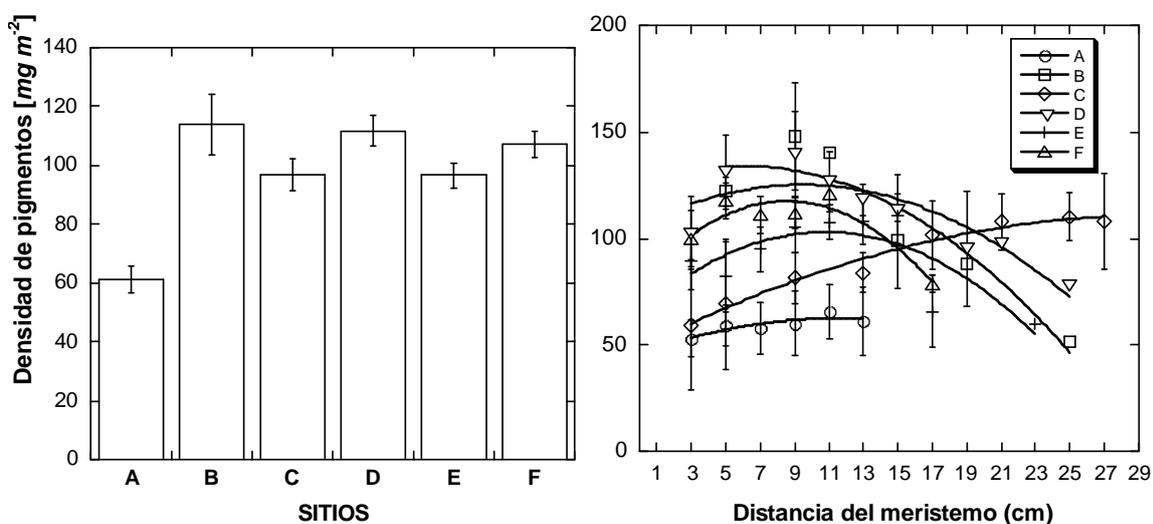


Figura 27. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la densidad de pigmentos.

Tabla 5. Probabilidades asociadas a la densidad de pigmentos [$mg\ m^{-2}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.000	1.000				
C	0.000	0.682	1.000			
D	0.000	1.000	0.315	1.000		
E	0.000	0.680	1.000	0.325	1.000	
F	0.000	0.989	0.646	0.982	0.655	1.000

Variabilidad a lo largo de la hoja: densidad de pigmentos por unidad de área [$mg\ m^{-2}$].

La variación del contenido de pigmentos por unidad de área a lo largo de la hoja (sólo la sección madura), mostró que la parte apical de la hoja tiende a presentar menor densidad de pigmentos, a excepción de las praderas A y C

que no mostraron una variación significativa de la densidad de pigmentos por unidad de área hacia el ápice de la hoja (**Figura 27b**).

Variabilidad entre praderas: cociente carotenoides / clorofila a.

La variabilidad del cociente carotenoides / clorofila *a*, no mostró un patrón de variación entre praderas (**Figura 28a**). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas entre los sitios ($F=4.49$, $n= 262$, $p=0.001$), F, que presentó el mayor valor promedio (0.194 ± 0.02 *mg* carotenoides / mg^{-1} chl *a*) y las praderas C, D y E (**Tabla 6**). Las praderas C y D presentaron los menores valores promedios de este cociente (0.145 ± 0.005 y 0.142 ± 0.01 *mg* carotenoides / mg^{-1} chl *a*, respectivamente). Esto significa que la pradera F, la más profunda, tenía sorprendentemente más inversión en fotoprotección, es decir entre 1.3 y 1.4 veces más carotenoides por clorofila *a*, que las praderas más someras como C y D, pero incluso que la situada en la orilla de la playa, la A. La variabilidad de este parámetro dentro de cada pradera (a lo largo de la hoja) fue del 26% (C.V.) en la pradera C al 62% en la E (C.V.), con una variación promedio del 54% (C.V.).

Variabilidad a lo largo de la hoja: cociente carotenoides / clorofila a.

La variabilidad a lo largo de la hoja del cociente carotenoides y clorofila *a*, mostró una tendencia a incrementarse hacia la zona apical en las praderas que mostraron un cambio significativo del contenido de pigmentos a lo largo de la hoja (B, D, E y F). La variabilidad encontrada indica que al aumentar la disponibilidad de luz en las zonas apicales del dosel, disminuye la sección transversal de pigmentos (< densidad de pigmentos) y aumenta la capacidad fotoprotectora (> razón carotenoides/clorofila *a*) (**Figura 28b**).

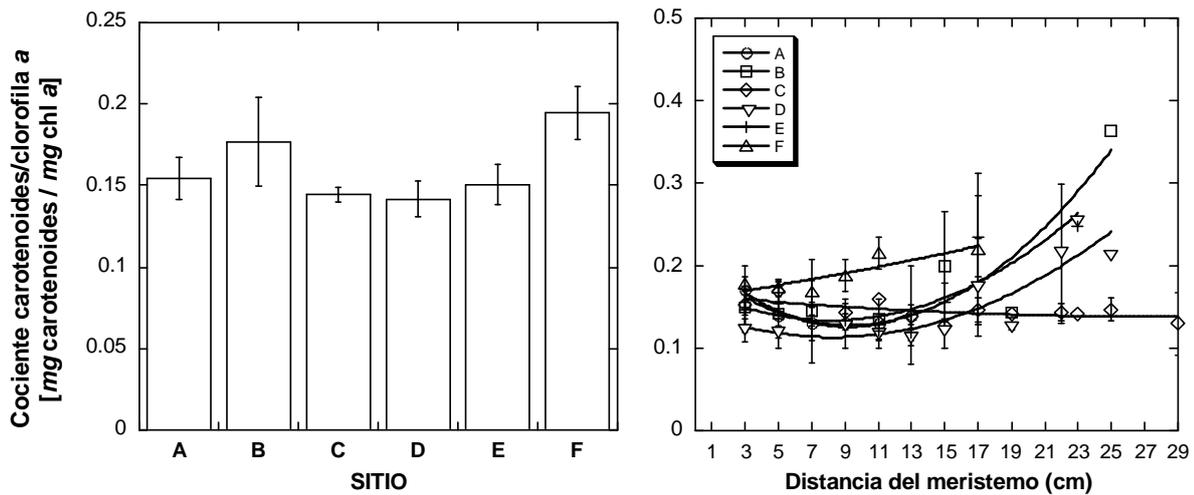


Figura 28. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del cociente carotenoides / clorofila a.

Tabla 6. Probabilidades asociadas al cociente carotenoides / clorofila a [mg carotenoides / mg^{-1} chl a], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.346	1.000				
C	0.415	0.927	1.000			
D	0.854	0.836	0.997	1.000		
E	0.452	0.927	1.000	0.997	1.000	
F	0.000	0.990	0.041	0.039	0.049	1.000

Variabilidad entre praderas: razón molar clorofila a / b.

La variabilidad de la razón molar *clorofila a / b* fue menor al anterior cociente, variando del 7% (C.V.) en las praderas D y F, al 30% (C.V.) en A, con un valor promedio del 19% (C.V.). A pesar de esta menor variación, el análisis de varianza de la razón molar *clorofila a / b* también arrojó diferencias significativas entre los sitios ($F=19.97$, $n= 264$, $p<0.001$), separándose únicamente la pradera A, con los valores promedios más bajos (2.21 ± 0.09), de las cinco restantes (**Figura 29a, Tabla 7**). El valor promedio más alto se registró en la pradera E (2.73 ± 0.04), que presentó valores 1.2 veces mayores al sitio A.

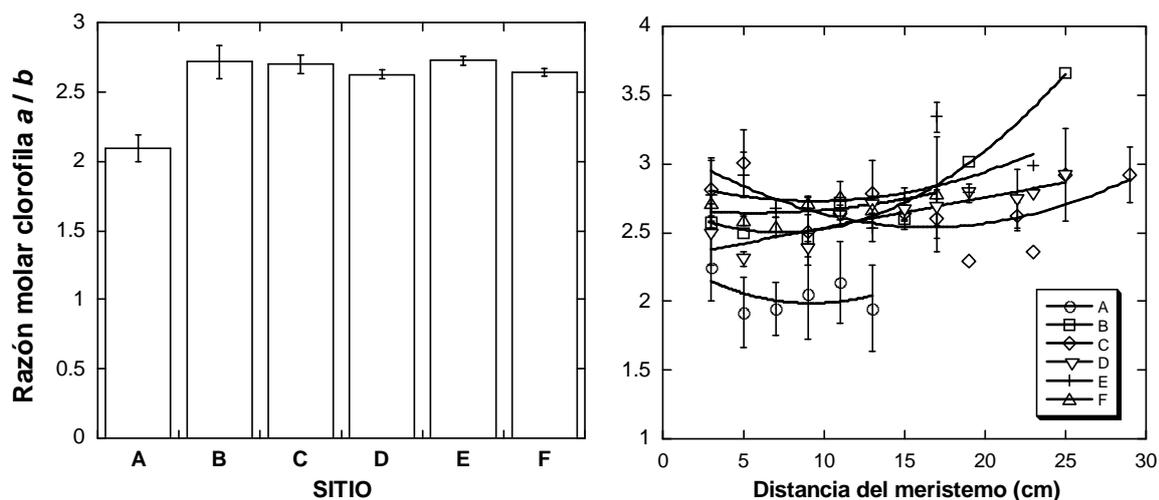


Figura 29. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la razón molar a/b .

Tabla 7. Probabilidades asociadas a la razón molar a/b , de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.000	1.000				
C	0.000	1.000	1.000			
D	0.000	0.998	0.999	1.000		
E	0.000	1.000	0.987	0.949	1.000	
F	0.000	0.999	1.000	1.000	0.958	1.000

Variabilidad a lo largo de la hoja: razón molar clorofila a/b .

La tendencia de la variación de la razón molar clorofila a/b dentro del dosel, mostró un claro incremento hacia el ápice de la hoja, particularmente en la pradera B. Solamente la pradera A mostró una disminución hacia el ápice, pero esta variación no fue significativa (**Figura 29b**).

Variabilidad entre praderas: capacidad de absorción de luz [absorptancia, A%].

La pradera A y en coherencia con los menores valores del contenido de pigmentos por unidad de área encontrados, también presentó la menor capacidad para absorber luz ($49.43 \pm 1.17\%$). Por otro lado, las praderas B y D presentaron los mayores valores promedio de absorptancia ($55.37 \pm 2.26\%$ y $57.09 \pm 0.78\%$, respectivamente), significativamente mayores que los de las praderas C, E y F, ($F = 5.45$, $n = 247$, $p < 0.0001$, **Figura 30a**) a pesar de que las diferencias no fueron significativas con respecto al contenido de pigmentos. Particularmente, la pradera D fue distinta de los sitios A, C, E y F (**Tabla 8**). La

variabilidad general de la absorptancia fue baja (C.V. =14%), así como dentro de cada pradera (sitio D, C.V.= 8% y sitio C, C.V.=17%).

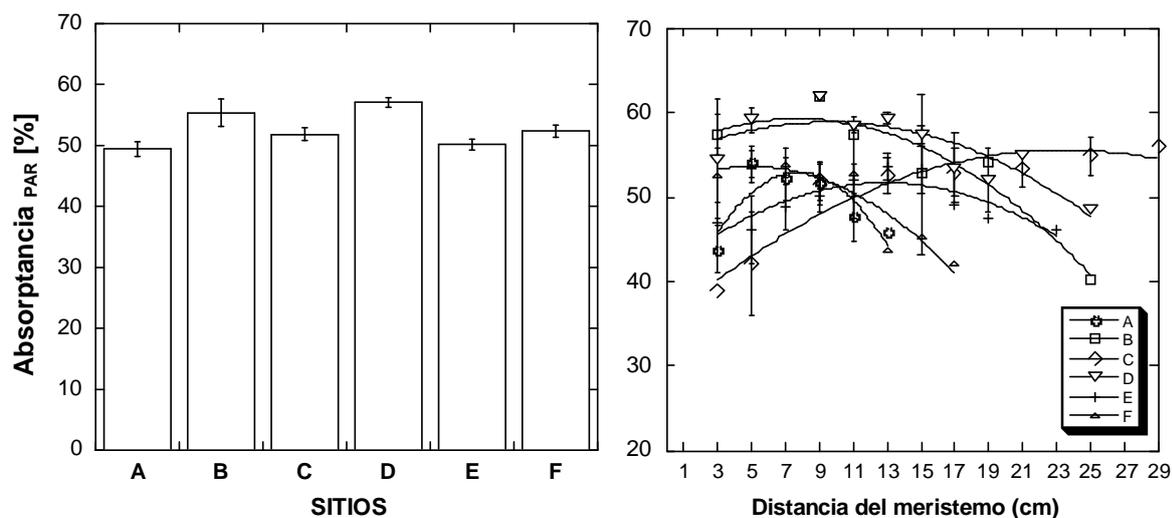


Figura 29. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la absorptancia.

Tabla 8. Probabilidades asociadas a la absorptancia [%], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.202	1.000				
C	0.637	0.700	1.000			
D	0.000	0.985	0.007	1.000		
E	0.997	0.276	0.787	0.000	1.000	
F	0.421	0.851	0.997	0.038	0.536	1.000

Variabilidad a lo largo de la hoja: capacidad de absorción de luz [absorptancia, A%].

La variación de la absorptancia mostró un patrón semejante al de los pigmentos por unidad de área, es decir, que los segmentos con menor capacidad para absorber luz se encuentran en las partes apicales de la hoja. A excepción del sitio C que no registró una variación significativa a lo largo de la hoja. En los sitios restantes, la mayor capacidad de absorción se determinó en la parte media de la hoja, donde los pigmentos también se determinaron en mayor densidad (**Figura 30b**).

Variabilidad entre praderas: eficiencia de absorción de luz [coeficiente específico de absorción referido a pigmentos, a^ , $m^2 mg^{-1}$].*

El análisis de varianza arrojó diferencias significativas entre los sitios ($F= 4.98$, $n= 242$, $p<0.001$) en la eficiencia de absorción de luz por unidad de pigmento de las hojas, pero de nuevo, estas diferencias eran básicamente entre el sitio A

con el resto de las praderas (**Figura 31, Tabla 9**). En los sitios A y C se midieron las mayores eficiencias de absorción de luz (0.011 ± 0.001 y $0.0087 \pm 0.0027 \text{ m}^2 \text{ mg}^{-1}$, respectivamente), asociadas a la menor densidad de pigmentos de las hojas del sitio A, así como las del C. En las praderas B, D, E y F se registraron las menores eficiencias de absorción de luz (**Figura 31a**). El sitio A mostró un aumento de la eficiencia de absorción de luz de 1.4 veces comparado con el sitio F, que presentó 1.9 veces más pigmentos por unidad de área que el A. A pesar de la gran variabilidad encontrada entre praderas en el contenido de pigmentos de las hojas, esto sólo se reflejó en un 35% (C.V.) de variabilidad general de la eficiencia de absorción de luz entre praderas.

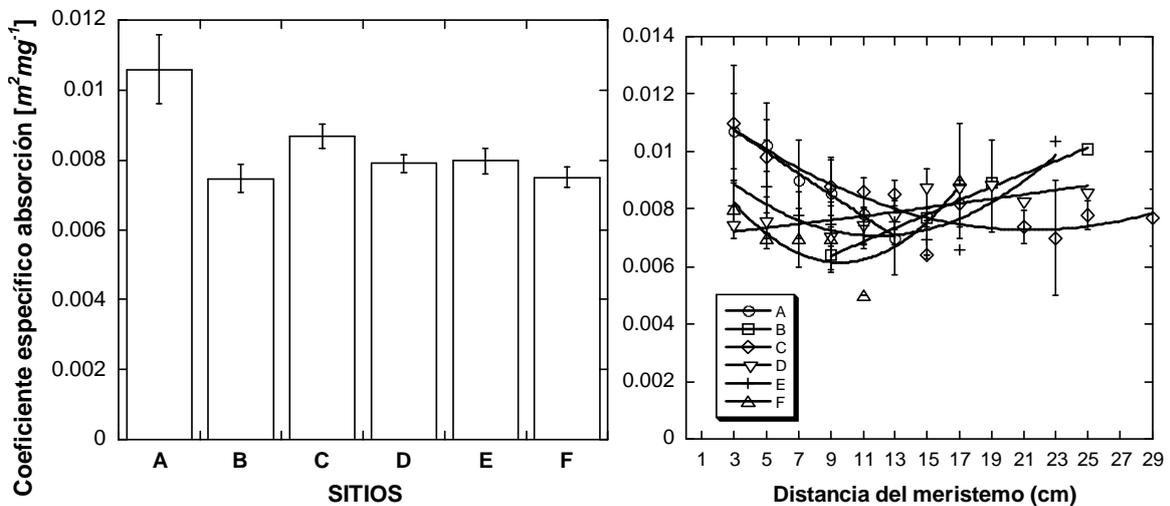


Figura 31. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del coeficiente específico de absorción.

Variabilidad a lo largo de la hoja: eficiencia de absorción de luz [coeficiente específico de absorción referido a pigmentos, $a \cdot \text{m}^2 \text{ mg}^{-1}$].

El patrón de variación de la eficiencia de absorción de luz fue inverso a los pigmentos por unidad de área y a la absorptancia. Los segmentos que presentaron la menor eficiencia para absorber luz fueron los de la parte media de la hoja, que coincidía con los segmentos que presentaron la mayor densidad de pigmentos por unidad de área y grosor de hoja medio (**Figura 31b**). De nuevo la variabilidad observada fue pequeña.

Tabla 9. Probabilidades asociadas al coeficiente específico de absorción [$m^{-2} mg^{-1}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.033	1.000				
C	0.038	0.805	1.000			
D	0.003	0.998	0.788	1.000		
E	0.001	0.995	0.747	1.000	1.000	
F	0.000	1.000	0.268	0.995	0.973	1.000

6.2.3 Variación de la morfología foliar de *T. testudinum* en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).

Variabilidad entre praderas: grosor de hoja [μm].

La tendencia observada entre praderas en el grosor promedio de la hoja, muestra que éste disminuye al incrementarse la profundidad. Los grosores de hoja más bajos se midieron en las praderas E y F (209.79 ± 7.17 y $220.47 \pm 8.09 \mu m$, respectivamente, **Figura 32a**) en donde también se observó la menor disponibilidad de luz en la superficie del dosel de la pradera (**Figura 26a**). Las praderas con mayores grosores de hoja fueron las de los sitios A, B y C (256.79 ± 8.89 , 276.00 ± 24.95 y $241.49 \pm 11.08 \mu m$, respectivamente). El grosor de las hojas del sitio B fue 1.3 veces mayor que el del sitio E (**Figura 32a**). La variabilidad intra-praderas del grosor de la hoja varió entre un 17% (C.V.) en el sitio D al 29% (C.V.) en el sitio B. Ésta variación arrojó diferencias estadísticas significativas ($F=4.91$, $n=219$, $p>0.001$), particularmente del sitio E con las praderas A y B (**Tabla 10**). El grosor de hoja mostró la mayor variabilidad de los descriptores morfológicos (C.V.=26%). Los valores promedios de la seis praderas mostraron una reducción exponencial y significativa con la profundidad (**Figura 32b**, $r^2=0.61$, $p<0.05$), y con la irradiancia relativa en la superficie del dosel ($r=0.85$, $n=6$, $p<0.05$).

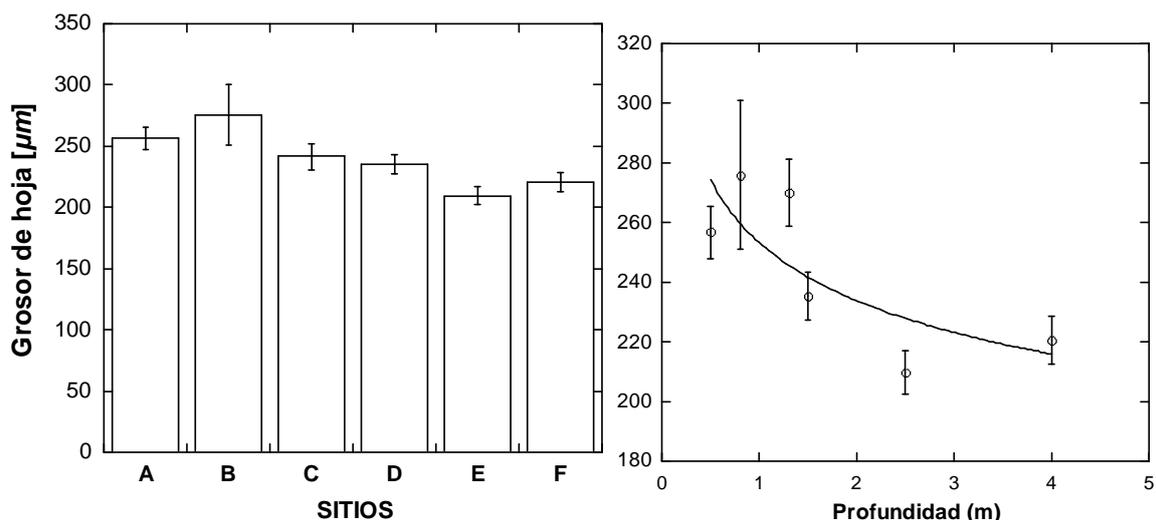


Figura 32. Variabilidad entre praderas (a) y valores promedios del grosor de hoja, (b) mostrando una reducción exponencial con la profundidad.

Tabla 10. Probabilidades asociadas al grosor de hoja [μm], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.933	1.000				
C	0.824	0.569	1.000			
D	0.673	0.446	0.999	1.000		
E	0.001	0.015	0.133	0.501	1.000	
F	0.028	0.078	0.604	0.919	0.954	1.000

Variabilidad a lo largo de la hoja: grosor de hoja [μm].

El patrón de variación del grosor de hoja en las praderas A y B, consistió en una reducción continua del grosor desde la base y hacia la zona apical de la hoja, mientras que, en las praderas D, E y F, se midió un pequeño aumento del grosor hacia la punta de las hojas (**Figura 33a**). En la pradera C se observó una suave disminución del grosor de las hojas. Esto se debe, a que en esta pradera la zona joven de la hoja (hojas muy delgadas y con bajo contenido de pigmentos o inmaduras) ocupa una mayor porción de la longitud total de la hoja, comparada con las otras praderas, lo que indica que es una pradera con una alta tasa de crecimiento de la hoja y que confirma **Olivé et al. (2005)** en su estudio. En función de los valores máximos y mínimos se observó que las praderas B y A presentan una reducción mayor del grosor de la hoja entre el valor máximo y el valor mínimo apical, comparada con las otras praderas, mientras que los sitios C, D y F mostraron la menor variación (mínima diferencia) (**Figura 33b**). Comparando la variación de la irradiancia relativa

dentro del dosel con la variación del grosor de la hoja dentro de cada pradera, se encontró una asociación significativa y negativa, aunque débil, entre ellas ($r = -0.18$, $n = 219$, $p < 0.01$), lo que indica que en la estructura morfológica del dosel de *Thalassia testudinum*, la parte basal, menos iluminada es la que presenta los segmentos de hojas más gruesos.

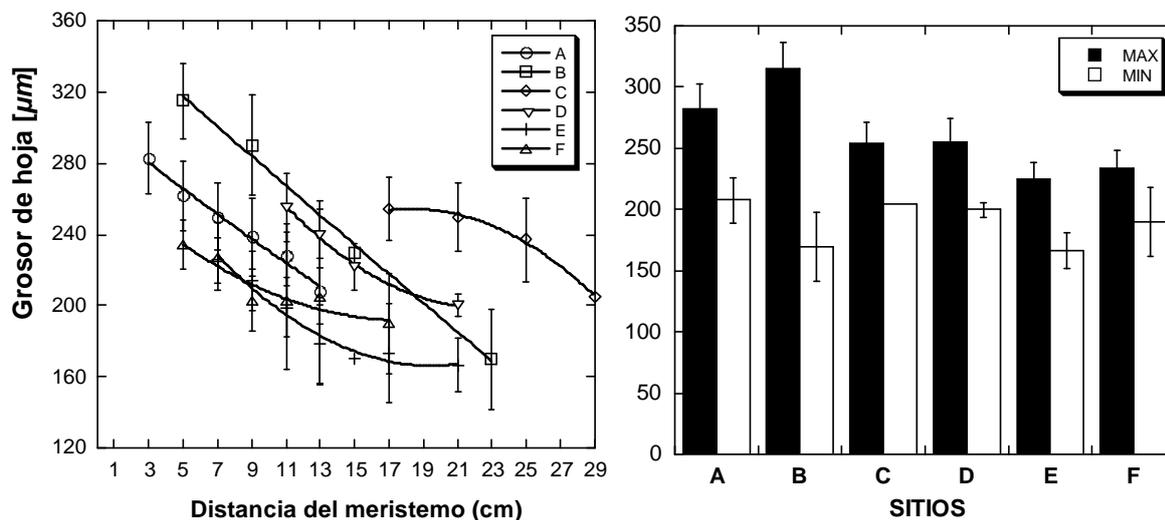


Figura 33. Variabilidad a lo largo de la hoja (a), y máximos-mínimos del grosor de la hoja (b).

En resumen, el parámetro morfológico grosor de hoja, parece que sigue un patrón de variación negativo con la profundidad (a mayor profundidad menor grosor) pero no necesariamente con la irradiancia disponible, pues la parte basal de la hoja suele ser la más gruesa y es además la que recibe menos luz.

Variabilidad entre praderas: grosor de la epidermis [μm].

El grosor de la epidermis presentó una moderada variabilidad (C.V. 14%), lo que no impidió observar diferencias significativas entre praderas. Por ejemplo, la pradera F, la más profunda (4m), presentó los valores más altos del grosor de la epidermis ($14.39 \pm 0.26 \mu m$, $F = 51.25$, $n = 228$, $p < 0.0001$), mientras que el valor más bajo se midió en una pradera de profundidad intermedia, la pradera C ($10.48 \pm 0.09 \mu m$, **Figura 34a**), que presentó valores del grosor de la hoja intermedios, pero no significativamente diferentes de las praderas con los grosores de hoja mayores (**Figura 34a, Tabla 11**). El grosor de la epidermis de las hojas de la pradera F fue 1.4 veces mayor que la del sitio C. En la pradera F, la más profunda, también se midió la menor altura del dosel (0.1m), la menor

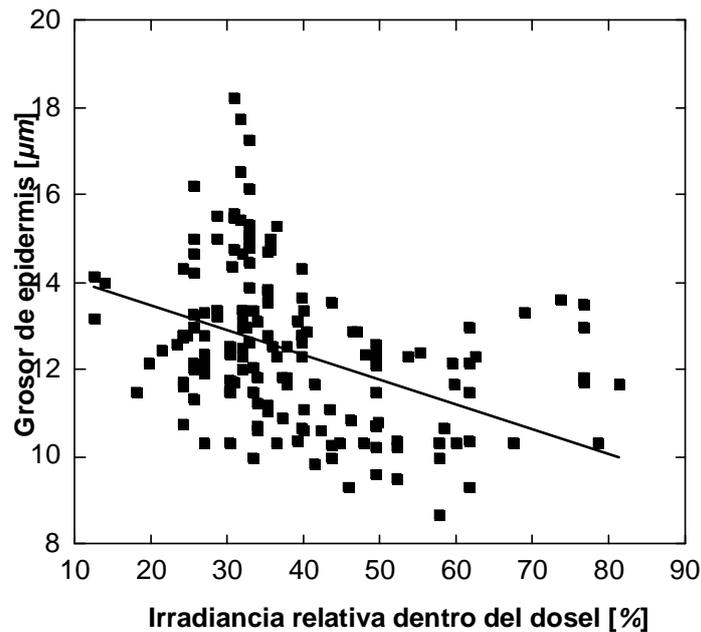


Figura 35. Variabilidad del grosor de la epidermis, en función de la irradiancia dentro del dosel.

Variabilidad a lo largo de la hoja: grosor de epidermis [μm]

La variabilidad desplegada por el grosor de la epidermis mostró que existe una reducción del grosor de epidermis desde la base y hacia la punta de la hoja (**Figura 34b**). Este patrón similar de variación del grosor de hoja y de epidermis a lo largo de la hoja, explica la débil pero significativa, asociación positiva encontrada entre estos dos parámetros (Log/log, $r=0.24$, $n=217$, $p<0.001$). Sin embargo, el patrón diferente de variación con la profundidad (entre praderas) que se ha observado para cada uno de ellos en este estudio, y la debilidad de esta asociación indican que estos dos descriptores morfológicos posiblemente tengan mecanismos de regulación diferentes.

Variabilidad entre praderas: área específica, SLA [$\text{m}^2 \text{g}^{-1}$].

La variabilidad del área específica fue moderada (C.V.= 17%). El promedio más bajo se midió en la pradera B ($163.50 \pm 5.72 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; C.V.=11%), donde también se determinó el mayor grosor de hoja. El valor promedio más alto se determinó en la pradera C ($197.05 \pm 5.61 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$; C.V.=17%) (**Figura 36a**). La pradera C tuvo 1.2 veces mayor área específica que el sitio B. El análisis de varianza arrojó diferencias significativas entre las praderas ($F=4.24$, $n=226$, $p=0.001$), particularmente de la pradera C con B y F, así como, del sitio E con el F (**Tabla**

12). Se observó una asociación significativa y negativa entre los segmentos maduros de SLA y el grosor de hoja (Log-log, $r = -0.66$, $n = 215$, $p < 0.0001$). Pero no se encontró asociación del SLA con la profundidad ($r = -0.13$, $n = 6$, $p > 0.05$), ni con el porcentaje de luz en la superficie del dosel ($r = 0.03$, $n = 6$, $p > 0.05$), aunque sí hubo asociación con la irradiancia dentro del dosel ($r = 0.28$, $n = 226$, $p < 0.0001$).

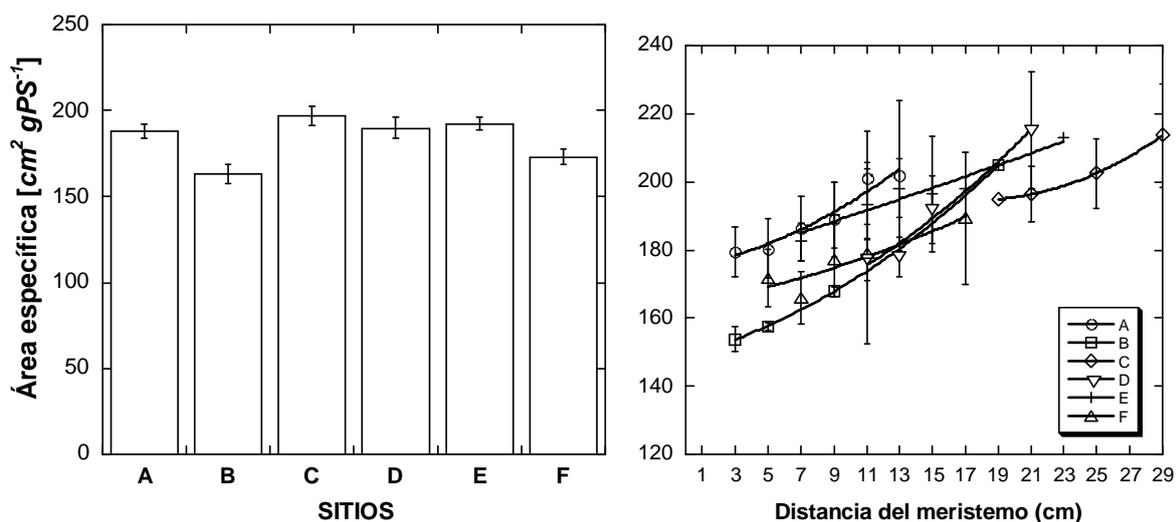


Figura 36. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del área específica.

Tabla 12. Probabilidades asociadas al área específica [$\text{cm}^2 \text{gPS}^{-1}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.171	1.000				
C	0.687	0.022	1.000			
D	1.000	0.168	0.946	1.000		
E	0.970	0.065	0.980	1.000	1.000	
F	0.143	0.942	0.005	0.211	0.027	1.000

Variabilidad a lo largo de la hoja: área específica, SLA [$\text{cm}^2 \text{gPS}^{-1}$].

La tendencia de la variabilidad del área específica, SLA, mostró un aumento de la base de la hoja y hasta la punta. Esto significa que en la zona basal, la hoja es más pesada que en la punta por unidad de área. En la parte basal la hoja es además más gruesa y menos densa, por lo que tiende a mantener bajos valores de biomasa por unidad de volumen, pero, con altos valores de biomasa por unidad de área [$\text{LMA}, \text{mg cm}^{-2} = 1/\text{SLA}$]. La zona apical, por el contrario, mantiene valores altos de SLA (o bajos de su inverso LMA) y tiende a ser más delgada, aunque más densa por unidad de volumen. Se observó que cuando la base de la hoja es muy joven o inmadura, es decir, delgada y con bajo

contenido de pigmentos, se presentan valores más altos de SLA que en los segmentos siguientes, en donde la hoja tiende a madurar y engrosar (datos no presentados). Por otro lado, también se observó que las praderas A y B presentan una hoja madura a partir del segmento dos de la hoja, mientras que la C es madura a partir del segmento dieciséis, la D en el centímetro diez, la E en el seis y la F en el centímetro cuatro (**Figura 36b**). Los valores máximos y mínimos muestran que la menor variación del área específica se presentó en la pradera C, mientras que la variación más amplia se registró en la pradera B (**Figura 37**). Este patrón de variación de SLA a lo largo de la hoja, explica la asociación significativa y positiva encontrada con la irradiancia dentro del dosel ($r= 0.28, n=226, p<0.0001$).

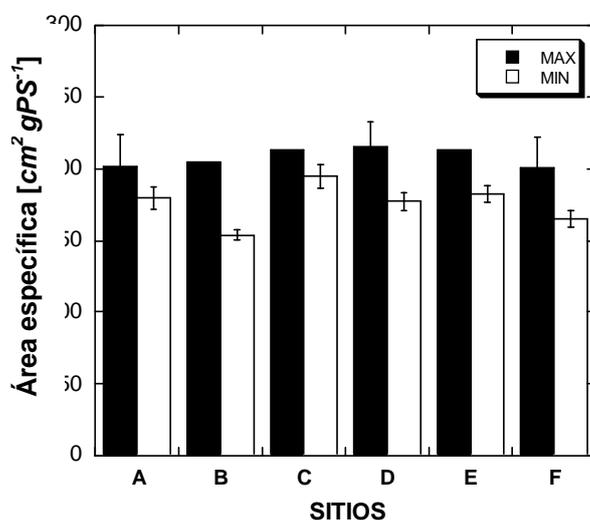


Figura 37. Valores máximos y mínimos del área específica.

Variabilidad entre praderas: contenido de peso por unidad de volumen [densidad de hoja, $mg\ cm^{-3}$].

El análisis de variancia arrojó diferencias significativas entre las praderas ($F=4.06, n=192, p=0.001$) en la densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen de hoja), separando principalmente a la pradera F de A, C y D (**Tabla 13**). La densidad de las hojas tiende a aumentar con la profundidad (**Figura 38a, Tabla 13**). Los valores promedios más altos se midieron en las praderas E y F (243.40 ± 11.13 y $270.73\pm 5.96\ mg\ cm^{-3}$) en donde también se registraron los valores más bajos del grosor de la hoja. El menor valor promedio se determinó en el sitio C ($227.64\pm 8.47\ mg\ cm^{-3}$), donde también se midió el menor grosor de epidermis (**Figura 34a**). La pradera F tuvo 1.2 veces mayor densidad de hoja que la C. Se encontró para los segmentos maduros

una asociación negativa y significativa entre la densidad de la hoja y el grosor (Log-log, $r = -0.62$, $n=192$, $p < 0.0001$), así como, una asociación positiva con la profundidad ($r = 0.90$, $n=6$, $p=0.01$), negativa con el porcentaje de luz en la superficie del dosel ($r = -0.88$, $n=6$, $p < 0.05$) y no hubo asociación con la variación de la irradiancia dentro del dosel ($r=0.03$, $n=192$, $p > 0.05$). Por tanto, las hojas de mayor densidad, son también las hojas más delgadas debido a que el sistema lacunar se reduce, disminuyendo el espacio interno que ocupan los *lacunae*. Este parámetro parece que sigue un patrón de variación similar al grosor de hoja, positivo con la profundidad pero no necesariamente con la irradiancia.

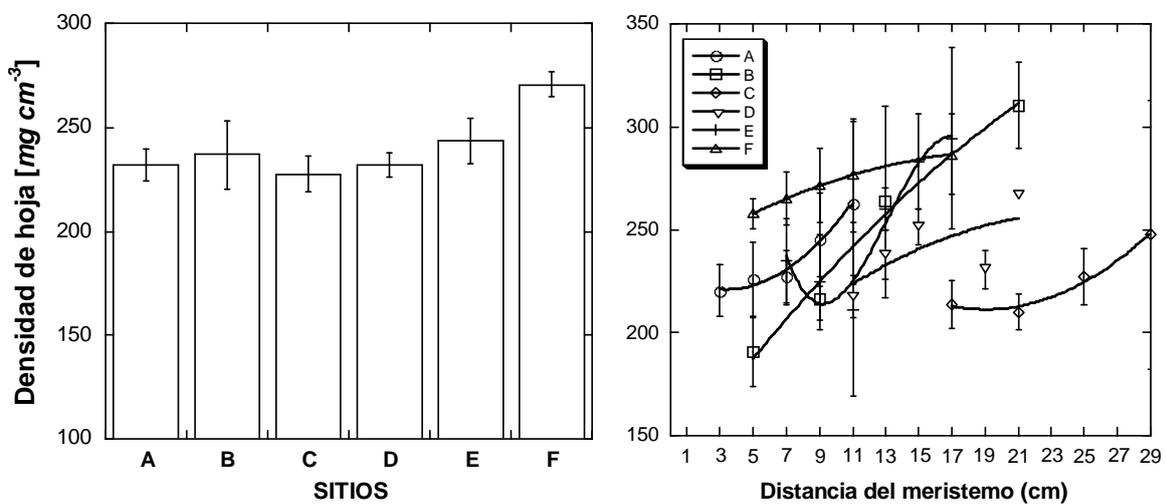


Figura 38. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la densidad de hoja.

Variabilidad a lo largo de la hoja: contenido de peso por unidad de volumen [densidad de hoja, mg cm^{-3}].

La variación a lo largo de la hoja del contenido de peso por unidad de volumen (densidad de hoja) de los segmentos maduros, mostró un incremento de la densidad de hoja de la base a la zona apical. En los sitios A, C y E se observó un pequeño incremento de la densidad en los segmentos maduros de la parte basal, mientras que, en las praderas B, D y F los segmentos basales tienen valores de densidad bajos (**Figura 38b**).

Tabla 13. Probabilidades asociadas a la densidad de hoja [$mg\ cm^{-3}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	1.000	1.000				
C	0.999	0.995	1.000			
D	1.000	1.000	1.000	1.000		
E	0.909	0.999	0.762	0.951	1.000	
F	0.004	0.381	0.002	0.026	0.153	1.000

6.2.4 Variación del contenido de pigmentos por unidad de volumen y de peso de las hojas de *T. testudinum* en dos gradientes de luz. Variabilidad entre praderas (en profundidad) y a lo largo de la hoja (dentro del dosel).

Variabilidad entre praderas de la concentración de pigmentos por unidad de volumen [$\mu g\ cm^{-3}$].

La magnitud de la autosombra de los pigmentos dentro de las hojas, está asociada al incremento de la sección transversal de pigmentos (por unidad de área proyectada) pero también al contenido de pigmentos por unidad de volumen (**Enríquez y Sand-Jensen, 2003**). La variación entre praderas de los valores promedio de los pigmentos por unidad de volumen fue estadísticamente significativa ($F=14.45$, $n=258$, $p<0.0001$), particularmente, se diferenció el sitio A con el resto de las praderas y del sitio D con E y F (**Figura 39a, Tabla 14**). La variabilidad de la concentración de pigmentos fue de 43% (C.V.). La concentración promedio más alta se registró en el sitio D ($20,232\pm 1,037\ \mu g\ cm^{-3}$), que además presenta una epidermis moderadamente delgada (**Figura 34a**). Los menores valores promedio de los pigmentos por unidad de volumen se encontraron en la pradera A ($9,878\pm 744\ \mu g\ cm^{-3}$), que tiene una epidermis ligeramente gruesa y significativamente menor contenido en pigmentos por unidad de área (**Figura 27a**). El sitio D tuvo 2 veces más pigmentos por unidad de volumen que el sitio A, asimismo, en la pradera A el grosor de la epidermis sólo fue 1.1 veces más gruesa comparada con las hojas de la pradera D ($p<0.05$, **Figura 39a**). La pradera F, que se encuentra a mayor profundidad, tuvo únicamente 1.5 veces más pigmentos por unidad de volumen que el sitio A y 1.1 veces mayor grosor de epidermis, teniendo 1.7 veces más pigmento por unidad de área que A. La relación entre la concentración de

pigmentos y el grosor de epidermis en los segmentos maduros, fue negativa y significativa (Log/log, $r = -0.28$, $n = 204$, $p < 0.0001$), lo que indica que conforme la epidermis se adelgaza las hojas tienden a aumentar la concentración de pigmentos. La debilidad de esta relación sugiere que *Thalassia testudinum* debe regular fuertemente este parámetro a través de la variación del grosor de la epidermis, lo que le permitiría evitar *empaquetamientos* demasiado altos de los pigmentos (concentraciones demasiado elevadas) que comprometerían seriamente la capacidad de absorción de luz de sus hojas.

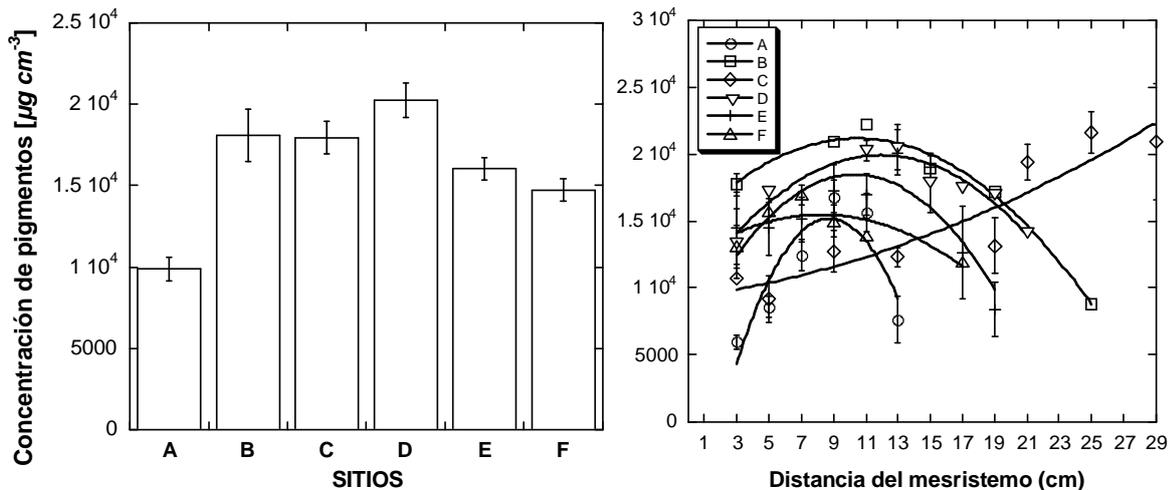


Figura 39. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la concentración de pigmentos.

Tabla 14. Probabilidades asociadas a la concentración de pigmentos [$\mu\text{g cm}^{-3}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.001	1.000				
C	0.000	1.000	1.000			
D	0.000	0.923	0.515	1.000		
E	0.000	0.922	0.501	0.023	1.000	
F	0.001	0.563	0.037	0.001	0.836	1.000

Variabilidad a lo largo de la hoja de la concentración de pigmentos por unidad de volumen [$\mu\text{g cm}^{-3}$].

La variabilidad desplegada por el parámetro concentración de pigmentos por unidad de volumen mostró que los segmentos de la zona basal y apical de la hoja presentan bajas concentraciones de pigmento, mientras que en la parte media se registra un máximo. Sin embargo, las hojas de la pradera C tienden a aumentar la concentración de pigmentos hacia la punta de la hoja. Al observar

el patrón de variación del grosor de epidermis se encontró que los segmentos más gruesos, que se encuentran en la zona basal, y de reciente desarrollo, mantienen una baja concentración de pigmentos por unidad de volumen. Así mismo, en la zona apical, que es la de más edad y la que se encuentra en las partes más iluminadas del dosel, también se determinó una menor concentración de pigmentos (**Figura 39b**).

Variabilidad entre praderas del contenido de pigmentos por unidad de peso seco [$mg\ gPS^{-1}$].

El análisis de varianza entre praderas arrojó diferencias significativas ($F=8.84$, $n=259$, $p<0.0001$) en el contenido de pigmentos por unidad de peso. Los valores promedio mayores se observaron en mitad del gradiente de profundidad, en el sitio D ($450.72\pm 25.23\ mg\ g^{-1}$), y los menores en las praderas someras (A, B y C). La pradera A mostró el menor valor promedio ($247.48\pm 16.68\ mg\ g^{-1}$) y diferencias significativas con el resto de los sitios, excepto el B (**Tabla 15**). Las praderas someras B y C, también tuvieron bajos contenidos de pigmentos por unidad de peso (274.40 ± 30.98 y $348.18\pm 22.98\ mg\ g^{-1}$), mientras que los sitios más profundos, E y F, tuvieron valores altos (398.80 ± 24.13 y $393.18\pm 18.9\ mg\ g^{-1}$) (**Figura 40a**). La pradera D tuvo 1.8 veces más contenido de pigmentos que la pradera A. La variabilidad de éste parámetro cambió de 32% (C.V.) en el sitio D a 53% (C.V.) en C.

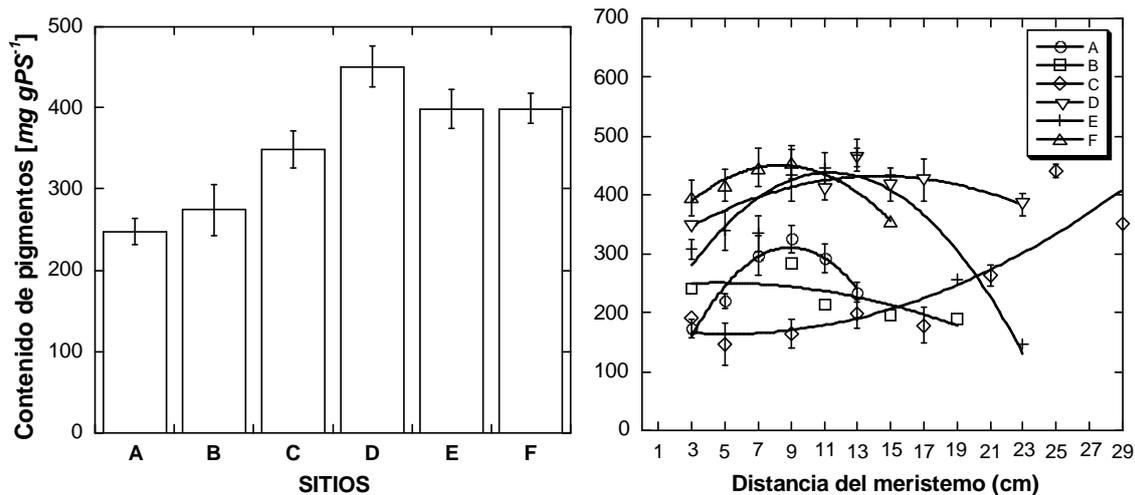


Figura 40. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del contenido de pigmentos.

Tabla 15. Probabilidades asociadas al contenido de pigmentos [$mg\ gPS^{-1}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

Praderas	A	B	C	D	E	F
A	1.000					
B	0.996	1.000				
C	0.010	0.722	1.000			
D	0.000	0.021	0.030	1.000		
E	0.000	0.182	0.499	0.662	1.000	
F	0.000	0.231	0.645	0.566	1.000	1.000

Variabilidad a lo largo de la hoja del contenido de pigmentos por unidad de peso seco [$mg\ gPS^{-1}$].

No se encontró un patrón consistente de variación a lo largo de la hoja en el contenido de pigmentos por unidad de peso. Sin embargo, la tendencia de la variabilidad mostró que en las praderas A, D, E y F los segmentos de la parte basal y apical presentaron bajo contenido de pigmentos, registrándose un máximo en la parte media de la hoja. En el sitio B, sin embargo, disminuyó el contenido de pigmentos de la base y hacia la zona apical de la hoja, y, en contraste con esto, en la pradera C se registró un fuerte incremento del contenido de pigmentos por unidad de peso de la base y hacia la punta de la hoja (**Figura 40b**).

6.3 Discusión

El análisis comparativo alométrico estuvo enfocado a examinar las relaciones forma-función entre la morfología foliar y la variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de las hojas de *Thalassia testudinum*, más que a entender su respuesta fotoaclimatativa. Esta primera comparación general permitió profundizar en el conocimiento del papel diferencial de cada uno de los distintos descriptores morfológicos sobre la variación de las propiedades ópticas de las hojas. Sin embargo, determinar cómo ajusta la planta cada descriptor en función de la variación del campo lumínico y, en general, de los recursos disponibles, requiere de otro tipo de análisis que además excluya de la base de datos todos los segmentos inmaduros que no han desarrollado todavía la respuesta fotoaclimatativa completa.

La aproximación utilizada en este siguiente análisis fue describir la variación natural de la respuesta fotoaclimatativa de *T. testudinum* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, tanto la observada en las hojas crecidas en cada una de las seis praderas seleccionadas de un gradiente de profundidad de 0.5m a 4m, como a lo largo de una misma hoja como consecuencia de la atenuación del campo lumínico dentro del dosel de cada pradera.

La regulación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz es una de las propiedades funcionales clave de la respuesta fotoaclimatativa de los organismos fotosintéticos. Los cambios en la habilidad para coleccionar la luz no sólo dependen de los cambios en la cantidad y tipo de pigmentos del aparato fotosintético, sino de la propia anatomía de la estructura fotosintética (i.e., volumen, distribución de pigmentos, presencia de estructuras dispersivas, etc.). Pocos estudios han examinado las consecuencias sobre la capacidad y eficiencia de absorción de luz de la variabilidad en el contenido de pigmentos, del grosor del tejido foliar o diámetro celular, al igual que sus implicaciones sobre la variación de las tasas fotosintéticas. Cabe destacar los estudios comparativos para el fitoplancton de **Morel & Bricaud (1981)** y **Geider & Osborne (1992)**, para organismos bénticos marinos, como algas a **Ramus (1978, 1990)** y **Enríquez et al. (1994)**, para pastos marinos a **Enríquez et al., (1992)** y **Enríquez (2005b)** y para hojas con anatomía típica bifacial terrestre a

Enríquez & Sand-Jensen (2003) enfocados en la planta anfibia de agua dulce, *Mentha aquatica*. Así mismo, cabe señalar los estudios que han descrito la variación del campo lumínico en el interior de las hojas de plantas terrestres y su relación con el tipo de mesófilo (i.e., **Vogelmann & Martin, 1993; Vogelmann et al., 1996**) y los estudios que han descrito la variabilidad de la respuesta fotoaclimatativa en el interior de la hoja asociada a esta variación del campo lumínico (**Terashima & Saeki, 1983, 1985; Terashima & Inoue, 1984, 1985**).

Enfoque en pastos marinos.

Los pastos marinos son organismos bénticos que están obligados a desarrollar estrategias para compensar la variabilidad del campo lumínico, tanto diurna como estacional. En su adaptación al medio marino, desarrollaron una nueva anatomía foliar perdiendo el mesófilo especializado de las hojas bifaciales terrestres. Esta nueva anatomía consiste en una epidermis pigmentada y en un mesófilo no pigmentado formado por células con grandes vacuolas, que delimitan el sistema lacunar o aerénquima (**Kuo & McComb, 1989**). Al perder el parénquima de empalizada ya no disponen de un tejido especializado en canalizar hacia el interior de la hoja la luz, pero quizás no sea necesario pues los pigmentos fotosintéticos se encuentran únicamente en la parte más externa de la hoja, en la epidermis. La nueva anatomía probablemente esté sujeta a una presión ambiental diferente al ambiente lumínico terrestre.

Al ser organismos complejos, los pastos marinos presentan respuestas fotoaclimatativas no sólo a nivel de hoja (i. e., membrana fotosintética, tejidos), sino también a nivel de haz (i. e. organismo completo, número de hojas, altura del haz) y de población de haces o pradera (i. e., densidad de haces, biomasa, **Olesen et al., 2002**) de acuerdo al *pool* genético, plasticidad fenotípica (aclimatativa/adaptativa) y etapa ontogénica. **Olesen y colaboradores (2002)** encontraron que las respuestas fotoaclimatativas a baja luz fueron más importantes a nivel de la estructura poblacional (la densidad de haces y la biomasa foliar variaron entre 5 y 6 veces) que a nivel del haz y de la hoja (la morfología del haz y las medidas fotosintéticas de la hoja variaron 1.5 veces). Además sugirieron que en praderas de pastos marinos con alta densidad de biomasa foliar, la aclimatación en profundidad puede estar influenciada tanto

por la atenuación de luz en la columna de agua, como por los cambios del campo lumínico dentro del dosel, determinando que *Posidonia oceanica* y *Cymodocea nodosa* reducen la densidad de haces al incrementarse la profundidad. **Olesen y colaboradores (2002)** sugirieron que esto puede explicar la ausencia de patrón en profundidad de la respuesta fisiológica de la hoja en las especies de mayor tamaño como *P. oceanica*. Estos resultados los apoyan **Enríquez et al., (2002)** y **Enríquez & Pantoja-Reyes (2005)** que además son los primeros que aportan una descripción del campo lumínico dentro del dosel, asociada a la variación morfológica de la pradera. **Olivé et al., (2005)** describen también por primera vez esta variación morfológica asociada al grado de autosombra del dosel, en función de un gradiente de luz en profundidad en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. **Olivé et al. (2005)** coinciden con **Olesen et al. (2002)** en que la mayor variabilidad de la respuesta fotoaclimatativa de la especie *Thalassia testudinum* se encuentra a nivel poblacional y no a nivel fisiológico resultado de la fuerte homogenización del campo lumínico dentro del dosel (**Figura 41a**). En contraste, otras interpretaciones han apuntado a la existencia de una limitada respuesta fotoaclimatativa de la fisiología de las hojas, es decir, de la respuesta fotosintética de algunas especies de pastos (**Dawes, 1998**).

En un trabajo reciente **Cayabyab & Enríquez (2007)** aportan evidencias experimentales de la limitada plasticidad de la respuesta fotoaclimatativa fotosintética de las hojas de *Thalassia testudinum*. Estos autores también concluyen que la fisiología foliar del pasto marino más abundante en el Caribe y Golfo de México es de planta *adaptada*, en sentido Darwiniano, a la sombra, caracterizada por una gran eficiencia cuántica (próxima al máximo termodinámico de 0.125 moles de oxígeno evolucionados por mol de fotones absorbido) y poca habilidad para aclimatarse a alta luz. La necesidad de explicar el éxito ecológico de esta especie en las aguas someras fuertemente iluminadas del Caribe, hace concluir a estos autores que el dosel de la pradera debe jugar un papel muy importante en el control del campo lumínico de las hojas para asegurar un ambiente sombreado en las praderas más iluminadas.

6.3.1 Variabilidad del campo lumínico entre praderas.

Como se señaló en la descripción del área de estudio, la irradiancia relativa en

la parte superior del dosel disminuyó cerca del 35% entre las praderas más someras y las situadas a mayor profundidad (de valores del 85.6% de la irradiancia superficial, E_s , en la pradera más somera, A, hasta valores de 49.6% E_s , en la pradera más profunda, F, **Tabla 1**). Estos resultados indican que el gradiente de profundidad seleccionado fue suficiente para definir una variación significativa de luz disponible en la parte superior del dosel de las praderas, como resultado de la atenuación de luz en la columna de agua y a pesar de que la laguna arrecifal de Puerto Morelos es somera (profundidad máxima $\sim 4m$). En el estudio de **Olivé y colaboradores (2005)** se encontró además un fuerte gradiente lumínico dentro del dosel de cada pradera, y específico para cada sitio dependiendo de la biomasa foliar, pero fundamentalmente, de la densidad de haces foliares siguiendo un patrón similar al patrón descrito en **Enríquez & Pantoja-Reyes (2005)**. La parte apical de la hoja es la zona más iluminada y el campo lumínico disminuye exponencialmente hacia la parte basal, que es donde se sitúa el tejido más joven de la hoja. Según este gradiente, la hoja se forma en una zona poco iluminada, y debe fotoaclimatarse a una mayor iluminación a medida que crece y ocupa posiciones más altas en el dosel. A menudo en esta zona y en estos ambientes someros arrecifales, esta parte de la hoja se encuentra expuesta la mayor parte del día a luz supersaturante, como ha señalado **Enríquez y colaboradores (2002)**. El gradiente más pronunciado lo mostraron las praderas más someras (A y B), que a su vez son las praderas que presentaron mayor biomasa foliar y, por tanto, mayor autosombra. Así mismo, las hojas de la pradera C son las que reciben en promedio más luz (promedio a lo largo de la hoja), mientras que paradójicamente, una de las praderas más someras, la B, es la que tiene sus hojas, en promedio, menos iluminadas (**Figura 41a**).

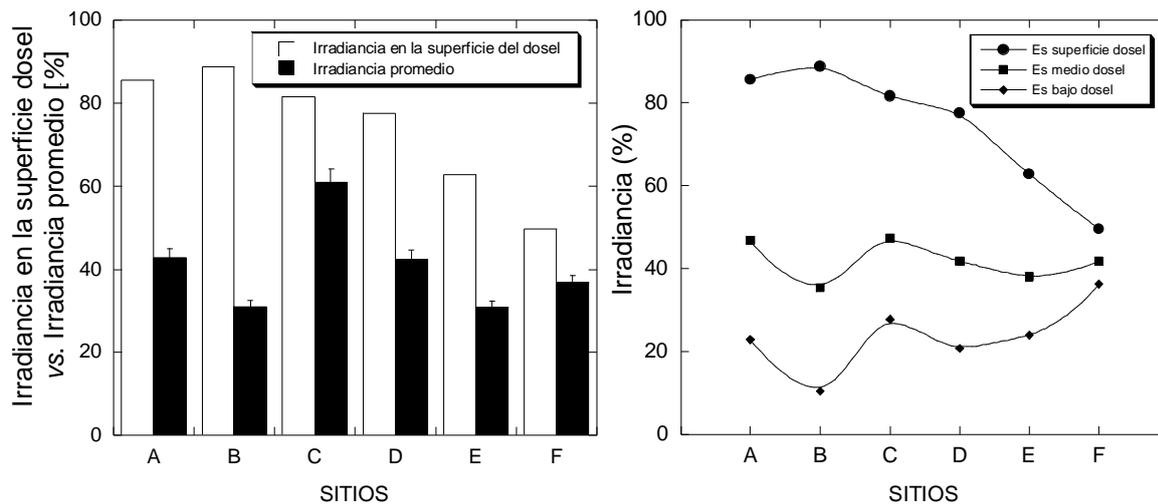


Figura 41. a) Comparación de la irradiancia superficial (blanco) vs. la irradiancia promedio en las seis praderas (negro), b) Niveles de irradiancia relativa dentro del dosel de cada pradera: zona apical, intermedia y base.

Olivé *et al.* (2005) encontraron que dentro del dosel de cada pradera la atenuación de luz (Kd_{dosel}) variaba un poco más de tres veces (de $10.99 m^{-1}$ en el sitio A hasta $3.46 m^{-1}$ en F, **Tabla 1**), en función de los cambios morfológicos experimentados por el dosel con la profundidad. Esta respuesta de la morfología de la pradera permite reducir el auto-ensombreamiento de las hojas, es decir, que reducir la densidad de haces al aumentar la profundidad puede mejorar substancialmente la cantidad relativa de luz disponible para ser absorbida por las hojas dentro del dosel.

En este estudio, para la pradera F, reducir la autosombra y, por tanto, la atenuación de luz dentro del dosel ($3.46 m^{-1}$), representa una respuesta de la planta completa para favorecer su desempeño fotosintético. Consecuentemente, el valor promedio del campo lumínico foliar varió significativamente entre praderas (**Figura 41b**), pero es importante señalar que el gradiente de luz dentro del dosel domina a la variación exponencial de luz con la profundidad. Por ejemplo, la pradera F, la más profunda, mostró el valor más alto de irradiancia relativa en la base del dosel, debido a que en este sitio se tuvo baja densidad de haces y de pequeño porte; esto es similar a lo reportado para la especie templada *Posidonia oceanica* (Dalla-Via *et al.*, 1998), y, algo importante, la irradiancia relativa en la parte media del dosel se mantuvo relativamente homogénea entre praderas.

Estos resultados confirman el fuerte control sobre el campo lumínico de

las hojas que ejerce la respuesta morfológica de la pradera. Considerando conjuntamente los dos gradientes lumínicos, el asociado con la columna de agua, que varía en función de la profundidad, y, el asociado a la morfología del dosel, que es función de la densidad de la biomasa foliar de la pradera, se pudieron distinguir en este estudio un máximo de disponibilidad de luz en la zona media del gradiente de profundidad, en la pradera C, y dos tendencias a disminuir esta disponibilidad de luz situadas a ambos lados de la pradera C. El primer gradiente de atenuación de luz está dominado por la columna de agua y sitúa a las praderas C, D, F, E en una disminución progresiva de la luz con la profundidad. Mientras que el segundo gradiente está dominado por la forma del dosel de la pradera y sitúa a las praderas C, B, A en un gradiente de mayor a menor iluminación en función del aumento de la densidad de biomasa foliar (**Figura 41a**).

6.3.2 Respuestas fotoaclimatativas: variabilidad del contenido de pigmentos.

Al analizar las variaciones de la densidad de pigmentos por unidad de área no se encontró un patrón de variación de la densidad de pigmentos (**Figura 27a**) en función de los cambios en la disponibilidad de luz, ni asociados a la profundidad, ni a la atenuación de luz en el dosel. La densidad de pigmentos no experimentó entre praderas una variación significativa, excepto la más somera, la A, que mostró valores 1.7 veces menores en promedio que el resto de las praderas. De nuevo, ésta variación entre praderas parece no responder a la respuesta fotoaclimatativa típica (**Boardman, 1977; Björkman, 1981; Falkowski & LaRoche, 1991**), en la que se espera un aumento del contenido en pigmentos por unidad de área, al disminuir la disponibilidad de luz asociada con la profundidad (E, F) y con el aumento de la autosombra dentro del dosel de las praderas más densas (A, B). La mayor variación se observó dentro de la misma pradera, a lo largo de la hoja (**Figura 27b**), comparada con la variación entre praderas. Casi todas las praderas excepto dos (A y C) presentaron una tendencia a disminuir el contenido de pigmentos hacia el ápice de la hoja, el segmento más iluminado (**Figura 27b**). Éste comportamiento también fue observado por **Enríquez (2005b)** para esta misma especie. Las hojas de plantas terrestres y de pastos marinos de zonas templadas no suelen presentar

valores tan bajos del contenido en pigmentos como los reportados en este estudio (cf. **Enríquez et al., 1992; Bjørkman & Demming, 1987**), a menos que sufran clorosis. En este caso, no hay ninguna indicación de que las hojas de *T. testudinum* sufran clorosis en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Por el contrario, las tasas de crecimiento y abundancia de la biomasa de estas praderas, indican que se encuentran adaptadas y fotoaclimatadas a las condiciones del ambiente arrecifal.

La pradera F presentó la mayor densidad relativa de carotenoides respecto a la densidad de clorofila *a*, mientras que las praderas C, D y E presentaron una mayor densidad relativa de clorofila *a* (**Figura 28a**). Este parámetro es un indicador de actividad fotoprotectora. Llama la atención que la mayor inversión en fotoprotección la presentó la pradera más profunda, la F, lo que sugiere que la luz ambiental no es el único factor que modula la variación de esta razón, sino posiblemente las diferencias en la disponibilidad y asignación de recursos entre praderas, que inducen que algunas praderas *sientan* más luz o presión que otras. La pradera C, que es somera y que presentó la mayor longitud total de las hojas no parece *sentir* tanta presión, ya que es baja la razón carotenoides / clorofila *a* a lo largo de toda la hoja. La pradera A, la más somera, tampoco mostró valores tan altos de esta razón pero es también la pradera que presentó la mayor autosombra de las hojas en el dosel. No se puede ofrecer a partir de este estudio una explicación consistente del por qué los valores más altos de este cociente los presentó la pradera más profunda, la F, posiblemente sea el resultado de una limitación de recursos en esta pradera para la optimización de la estructura de su aparato fotosintético (estructuras supramoleculares de la membrana fotosintética vs. actividad enzimática del estroma). En cuanto a la variabilidad a lo largo de la hoja se observó que todas las praderas aumentaron el cociente carotenoides/ clorofila *a* hacia el ápice de la hoja, excepto la pradera C. Esto sugiere, que las praderas que presentan cambios en su respuesta fotoaclimatativa a lo largo de la hoja (cambios en la densidad de pigmentos) también muestran una tendencia a aumentar significativamente su capacidad fotoprotectora hacia el ápice de la hoja (valores altos de la razón carotenoides / clorofila *a*, **Figura 28b**).

La razón molar clorofila a/b mostró que la pradera A, presentó menor densidad relativa de clorofila a respecto a la b , que es el principal pigmento accesorio y por tanto es un indicador del tamaño de la antena en las hojas de esta pradera. Una disminución de la razón molar clorofila a/b en la pradera más somera es un resultado no esperable, además, porque esta pradera presenta el menor contenido de pigmentos. Como no se han analizado los componentes del aparato fotosintético de estas poblaciones no es posible extraer ninguna conclusión al respecto, pero quizás se podría argumentar que una disminución del contenido de clorofila a en las hojas de la pradera A, podría ser indicador de una disminución en el número de centros de reacción de las hojas de esta pradera. Lo que podría ser explicado por la mayor competencia por recursos (nitrógeno y/o fósforo) entre haces foliares, dentro de la pradera con la población de haces foliares más densa. Esta mayor competencia por recursos entre haces podría explicar también el menor contenido de pigmentos encontrado en las hojas de esta pradera, que además de estar expuestas a altos valores de irradiancia también lo están a mayores perturbaciones, principalmente por desecación y exposición a radiación ultravioleta. El resto de las praderas presentaron valores similares y mayores de la razón molar clorofila a/b (**Figura 29a**).

El aumento de la razón molar clorofila a/b en las praderas más profundas, tiene difícil interpretación fuera del contexto señalado anteriormente. La razón molar determinada en el presente estudio se encuentra por debajo de 3.0 que es el valor promedio para plantas terrestres y algas verdes de agua dulce, y es superior a 1.0-2.3 (excepto la pradera A) que son valores para algas verdes marinas unicelulares y multicelulares (**Kirk, 1994**). La tendencia aquí encontrada, es decir, poca variación de la razón molar clorofila a/b de unos valores generalmente bajos sugiere que los pigmentos en las hojas de *T. testudinum* no alteran significativamente el tamaño de su antena que quizás sea extraordinariamente pequeña para minimizar el fotodaño en una fisiología fotosintética poco eficiente a alta luz (**Cayabyab & Enríquez, 2007**). En contraste, en la variabilidad a lo largo de la hoja, se observó el patrón esperable, ya que los segmentos en la zona basal (baja irradiancia) son los que presentaron mayores contenidos relativos de clorofila b , excepto en la pradera A, que presentó valores constantes (**Figura 29b**).

Aunque la densidad de pigmentos es uno de los descriptores de la respuesta fotoaclimatativa foliar más importante (**Falkowski & LaRoche, 1991; Iglesias-Prieto & Trench, 1994**), en este estudio no se encontró un patrón de variación de este parámetro (ni del cociente carotenoides / clorofila *a*, ni de la razón molar clorofila *a* / *b*) asociado a la atenuación de luz en la columna de agua. Éstos resultados son similares a la ausencia de patrón reportada para otras especies como *Posidonia oceanica* (**Pirc, 1986; Olesen et al., 2002**), *Posidonia sinuosa* (**Masini et al., 1995**) y al documentado para esta misma especie, *T. testudinum* (**Enríquez, 2005b**), aunque sí está registrado que las hojas de algunas especies de pastos marinos responden claramente con un aumento del contenido de pigmentos a la reducción de la disponibilidad de luz como *Zostera marina* (**Dennison & Alberte, 1985, 1986; Dennison, 1987; Zimmerman et al., 1995**) y *Cymodocea nodosa* (**Olesen et al., 2002**). El resultado obtenido en este estudio apoya la tesis de **Enríquez y colaboradores (2002)** y **Olesen y colaboradores (2002)** que consideran que la variación del campo lumínico dentro del dosel, controlado por la propia pradera, es el que domina la regulación de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas, al menos en las especies de mayor porte como *T. testudinum* en ambientes arrecifales y en *Posidonia spp.* en ambientes templados.

De acuerdo a los resultados mostrados en la presente investigación, la variación más importante de la densidad de pigmentos se encontró dentro de cada pradera, a lo largo del gradiente lumínico al que está expuesta la hoja dentro del dosel. Sin embargo, dos praderas: *i*) la que presenta los valores más bajos del contenido de pigmentos, la más somera, la A; y *ii*) la más iluminada, la C, que es a la vez la pradera que mostró los mayores valores de crecimiento foliar del haz (**Olivé et al., 2005**) no muestran este patrón a lo largo de sus hojas, sino un mantenimiento de un máximo en la parte madura de la hoja sin mostrar una disminución hacia el ápice de la hoja. Estos resultados confirman que además de la luz, existen otros factores ambientales y/o intrínsecos al crecimiento de la planta que pueden contribuir a la regulación de la sección transversal de pigmentos de las hojas, así como, a su capacidad y eficiencia de absorción de luz. En este caso, la pradera A, la más somera y densa, debe sufrir un mayor fotodaño por exposiciones instantáneas a intensidades de luz muy altas, *sun-flecks*, además de quedar expuesta al aire y a la desecación en

momentos de marea baja. Su alta densidad de haces y pequeño porte, también sugieren una fuerte competencia entre haces por los recursos disponibles. Esto puede contribuir a explicar el menor contenido en pigmentos en las hojas de una pradera sometida posiblemente a mayor presión relativa de luz (*sensu Iglesias-Prieto et al., 2004*). La pradera C, sin embargo, es la que presenta una mayor iluminación de sus hojas y menor competencia de recursos entre haces (baja densidad de haces), pues ya ha sufrido una significativa auto-poda, *self-thinning*. En este caso, un exceso de recursos ligado a un fuerte crecimiento puede explicar la ausencia de presión y el mantenimiento del contenido máximo de pigmentos hacia la parte superior del dosel sin experimentar una caída significativa.

6.3.3 Respuestas fotoaclimatativas: variabilidad de la capacidad y eficiencia de absorción de luz.

La variabilidad de la capacidad para absorber luz, absorptancia, de las hojas de *Thalassia testudinum* siguió el mismo patrón de la densidad de pigmentos, es decir, se encontró que las hojas de las praderas que tenían una mayor densidad de pigmentos, B y D, eran también las que tenían una mayor capacidad de absorber luz. Este patrón de variación no se encuentra relacionado, de nuevo, con la atenuación de luz dentro de la columna de agua ($p > 0.05$), pero si se encontró una tendencia a disminuir la absorptancia hacia la parte apical de la hoja, excepto en las praderas C, A, en donde no hubo cambio de la absorptancia en la zona madura, resultado también de la ausencia de variabilidad en el contenido de pigmentos.

Las hojas de la pradera más somera, A, que experimentaron una significativa disminución del contenido de pigmentos por unidad de área (39% en promedio), no mostraron una disminución significativa de la absorptancia (4% en promedio), con respecto a las praderas C, E, F (**Figura 30a**). La cuantificación de la eficiencia de absorción de luz, no determinó diferencias significativas entre las praderas B, C, D, E, F, pero claramente la pradera A desarrolló las hojas más eficientes para absorber luz (1.3 veces más eficientes en promedio que las del resto de las praderas, **Figura 31a**). Este resultado apoya la interpretación de que la pradera, A, podría presentar fuerte competencia por recursos entre sus haces foliares, además de mayores

pérdidas por perturbación (deseccación) y, por tanto, sería la pradera que mayores beneficios obtendría de mejorar la eficiencia de absorción de luz de sus hojas. Las características morfológicas de las hojas pueden estar ligadas a esta mejora de la eficiencia de absorción de luz, de la pradera A, con un significativo aumento tanto del grosor de la hoja como del grosor de la epidermis (**Figuras 32a, 34a**). Estos cambios morfológicos resultan en que las hojas de la pradera A presentaron los valores menores en pigmentos por unidad de volumen y por unidad de peso (**Figuras 39a, 40a**), lo que en definitiva permitió reducir fuertemente el grado de empaquetamiento de los pigmentos.

La variación entre praderas mostró la alta eficiencia del sitio A, pero también la homogénea eficiencia para absorber luz que presentaron las praderas B, C, D, E, F (**Figura 31a**). Estos resultados indican que las hojas de *T. testudinum* son capaces de ajustar su habilidad para coleccionar luz y conseguir optimizar la eficiencia de absorción de luz de sus pigmentos fotosintéticos, gracias a la variación de su morfología. De hecho, la variación a lo largo de la hoja de la eficiencia de absorción (**Figura 31b**) mostró una gran homogeneidad a pesar de la clara variación observada en el contenido de pigmentos y de la absorptancia. En este sentido, **Enríquez & Sand-Jensen (2003)** observaron que la eficiencia de absorción de luz presenta una mayor regulación anatómica por la variabilidad de la disponibilidad de nutrientes que por la disponibilidad de luz.

Una de las conclusiones del análisis alométrico desarrollado en el presente estudio, es que las hojas de *Thalassia testudinum* no parecen mejorar la capacidad de absorción de luz a partir de los 100 mg clorofila m^{-2} , pues la absorptancia se estabiliza alrededor de un valor promedio de $61.3 \pm 0.41\%$ ($n = 45$). Este valor está muy por debajo del valor promedio considerado para hojas de plantas terrestres del 83%, y el observado para especies templadas de pastos marinos (**Enríquez et al., 1992; Olesen et al., 2002; Enríquez et al., 2004**). Posiblemente, y considerando que el pasto marino *T. testudinum* se encuentra casi todo el día expuesto a luz supersaturante (**Enríquez et al., 2002**) en las aguas someras del Caribe, se podría explicar por qué esta especie tiene más baja capacidad para coleccionar luz que los pastos marinos de zonas templadas y de anatomía similar a *T. testudinum*, como *Cymodocea*

nodosa, *Posidonia oceanica*, *Zostera marina* y *Zostera noltii*, que muestran una mayor habilidad para coleccionar luz que ésta especie tropical (Enríquez, 2005b). Es posible que estemos ante un ejemplo de la *utilidad de ser ineficiente* para reducir el fotodaño. Sin embargo, las razones últimas, mecánicas, de esta ineficiencia deben ser todavía exploradas. El aumento de la capacidad para absorber luz de la hoja puede hacerse crítico cuando la luz es limitante y la planta no puede aumentar el área foliar total sin reducir peligrosamente el campo lumínico en el interior del dosel. Esto es relevante, ya que un pequeño aumento de la dosis de luz absorbida por la hoja podría asegurar los requerimientos mínimos de luz de la pradera, y por tanto su supervivencia a una determinada profundidad, mientras que la inhabilidad para hacerlo pondría en riesgo su supervivencia a esa misma profundidad o a las nuevas condiciones lumínicas.

En resumen, el efecto más claro de la luz sobre la variación de la respuesta fotoaclimatativa de la hoja en el pasto marino *T. testudinum* se observa dentro de cada pradera y sobre una misma hoja, en el patrón de reducción de la densidad de pigmentos, así como, de la absorptancia, hacia la zona más iluminada del dosel o ápice de la hoja. Sin embargo, este patrón no se encontró, como se señaló anteriormente en todas las praderas, ya que no lo presentó la más somera, A, y la más iluminada, C.

6.3.4 Respuestas fotoaclimatativas: variabilidad morfológica.

La variabilidad de la morfología foliar observada en este estudio, relevante para considerar que pueda estar implicada en la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *Thalassia testudinum*, se relaciona con cambios en el grosor y densidad de hoja, en el grosor de epidermis y en los espacios intercelulares del aerénquima o *lacunae*.

La variación del grosor de las hojas de *T. testudinum* siguió dos tendencias una entre praderas y otra dentro del dosel de cada pradera. El patrón de variación entre praderas mostró una reducción del grosor de la hoja conforme aumentó la profundidad ($R^2 = 0.61$, $p < 0.05$) y conforme disminuyó la intensidad de luz en la parte superior del dosel ($r = 0.85$, $n = 6$, $p < 0.05$). La tendencia de reducir el grosor de la hoja al aumentar la profundidad (variación entre praderas, **Figura 32a**) ya fue indicada por **Kuo & den Hartog (2006)** para

otras especies de pastos marinos, pero recientemente se ha reportado un patrón inverso de variación, es decir, un aumento del grosor de la hoja en las praderas más profundas de *Posidonia sinuosa* además de diferencias estacionales asociadas a este patrón de variación con la profundidad (Collier *et al.*, 2007). Estos resultados son indicativos de la importancia de otros factores ambientales como temperatura o disponibilidad de nutrientes, además de la luz, en la regulación del grosor de la hoja de pastos marinos. El patrón descrito para plantas terrestres consiste en un aumento del grosor de la hoja en ambientes más iluminados (Björkman, 1981; Vogelmann, 1993; Vogelmann & Martin, 1993; Poorter *et al.*, 1995; Enríquez & Sand-Jensen, 2003). Esta tendencia es similar al patrón encontrado entre las praderas de *T. testudinum* de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, donde el mayor grosor de la hoja se midió en las praderas más someras. Sin embargo, es opuesto al patrón observado dentro del dosel de este pasto, pues la parte basal madura, menos iluminada, es la que presenta el mayor grosor de hoja. En el presente estudio, el patrón de variación a lo largo de la hoja fue una constante entre los seis sitios muestreados y reveló una clara tendencia a disminuir hacia el ápice, es decir, a reducirse el grosor de hoja al aumentar la disponibilidad de luz dentro del dosel (Figura 33a). Esta tendencia se confirma con la observación de la existencia de una asociación negativa y significativa, aunque débil ($r = -0.18$, $n = 219$, $p < 0.01$) entre la irradiancia relativa dentro del dosel (% Es) y la variación del grosor de la hoja. Este resultado sugiere que la luz parece estar regulando de dos formas opuestas la morfología de la hoja. Por un lado existe una variación del grosor de la hoja que parece estar asociada a la irradiancia en la superficie del dosel, pero también existe otra variación a lo largo de la hoja asociada a la irradiancia dentro de cada pradera.

Esta aparente contradicción en el efecto de la luz sobre la morfología quizás sea consecuencia de la coincidencia de la variación del campo lumínico dentro del dosel con el desarrollo ontogénico de las hojas de este pasto, pues la hoja madura hasta alcanzar un valor máximo de su grosor en la zona basal, menos iluminada, del dosel (hoja Tipo I según el análisis alométrico), para posteriormente disminuir en su grosor hacia la punta de la hoja, la zona más iluminada. Por tanto, la interpretación de estos resultados y en coherencia con los obtenidos en el análisis alométrico, debe considerar el desarrollo de la hoja

desde su maduración hasta su agotamiento o senescencia. En este caso no hemos examinado el desarrollo completo de la planta, sino los cambios que experimenta la hoja 2 desde su nacimiento hasta el máximo de desgaste que ésta sufre. La parte inmadura, que se encuentra en la parte basal de la hoja, es a su vez la parte más sombreada dentro del haz foliar, por estar rodeada por otras hojas más viejas además de la vaina. También hay que señalar que esta parte de la hoja se encuentra muy a menudo enterrada en el sedimento. Una mejora significativa en la capacidad de absorción de luz gracias a un mayor grosor puede beneficiar significativamente esta parte de la hoja, y explicar por qué es precisamente esta zona la que presenta el mayor grosor una vez que se ha completado el desarrollo morfológico de la hoja. El grosor máximo que alcanza una hoja puede estar determinado por la luz, pero probablemente participen en su regulación también otros factores ambientales y/o intrínsecos a la planta, lo que puede explicar por qué la maduración pigmentaria y estructural de la hoja no coincide. A partir de este máximo, la hoja parece experimentar una progresiva reducción de su grosor o *desgaste* hacia la punta, es decir, hacia las zonas también más iluminadas del dosel, y este cambio si podría estar más relacionado con la respuesta fotoaclimatativa de la morfología, aunque los cambios en el grosor de la hoja a lo largo de su trayectoria ontogénica y asociados posiblemente a la historia lumínica en el dosel, son también dependientes del máximo desarrollado en su parte basal una vez completada la madurez estructural. La combinación de la expresión de la respuesta fotoaclimatativa en el dosel con el desarrollo ontogénico de la hoja, podría explicar la aparente contradicción en los resultados obtenidos de la asociación de la variación del grosor de la hoja con la irradiancia en los dos gradientes de luz examinados.

En resumen, probablemente la disponibilidad de luz no es el factor regulador más importante de la variación del grosor de la hoja de pastos marinos y son otros factores externos (ambientales) y/o internos (desarrollo ontogénico de la hoja, partición de recursos dentro de la planta, etc.) los que están más relacionados con ella. Determinar el papel exacto de la luz en la regulación del grosor de la hoja dentro de la respuesta fotoaclimatativa de esta especie, sólo puede hacerse bajo condiciones experimentales semicontroladas de luz, lo que este análisis comparativo no puede ofrecer. Sin embargo, en el

estudio de **Cayabyab & Enríquez (2007)** se ha documentado que *Thalassia testudinum* responde a la disminución ambiental de la luz con un aumento significativo del grosor de la hoja, pero de nuevo no es posible concluir si este aumento es el resultado de un esfuerzo de la planta por construir hojas más gruesas a baja disponibilidad de luz, o si, por el contrario, es el resultado de un mayor desgaste de la hoja creciendo a alta luz y en condiciones de limitación por nutrientes, lo que conduciría a disminuir fuertemente su grosor. Estos resultados sugieren que los cambios en el grosor de las hojas de *T. testudinum* son dependientes de la disponibilidad de luz, pero quizás también de la disponibilidad de los recursos externos disponibles para el haz o los asignados a éste por la planta.

En el presente estudio se observó que la pradera B, que presentó la menor irradiancia relativa promedio como consecuencia de su alta densidad foliar a pesar de ser una pradera somera, desarrolló las hojas con los mayores grosores (**Figura 32a**), lo que puede sugerir que la luz que *siente* el meristemo foliar es la que más podría estar relacionada con la determinación del grosor máximo de la hoja, sin descartar la importancia de otros factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes, necesarios para *construir* hojas más gruesas, y quizás más costosas. Por otro lado, el patrón de disminución del grosor a lo largo de la hoja probablemente esté más relacionado con su desgaste y, por tanto, con la variación del campo lumínico que la hoja experimenta al crecer a lo largo del dosel (**Figura 33a**). Así que, todavía no es posible concluir a partir de este análisis cuales son los principales factores reguladores de la variación del grosor de la hoja en *T. testudinum*, tanto de la variación del grosor máximo como de la variación del grosor a lo largo de la hoja, aunque estos resultados sugieren como hipótesis para ser probada experimentalmente la importancia de la disponibilidad de nutrientes en combinación con la luz para determinar en las hojas de pastos marinos, tanto el grosor máximo de la hoja como su patrón de disminución hacia el ápice.

Por otro lado, la interpretación mecánica del efecto del grosor sobre la variación de la habilidad para coleccionar la luz de las hojas debe considerar los efectos de dos fenómenos, el efecto paquete y la dispersión múltiple. Al considerar el aumento del grosor de la hoja de los pastos marinos se debe tener en cuenta que va unido fundamentalmente a un aumento del tejido no-

pigmentado que conforma más del 80% del tejido total de la hoja, lo que podría favorecer la habilidad para absorber la luz de la hoja, al promover preferentemente la dispersión múltiple sin incrementar prácticamente nada el empaquetamiento de los pigmentos. En el presente trabajo se encontró que existe una relación negativa y significativa entre el grosor y la densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen, Log-log, $r = -0.62$, $p < 0.01$, $n = 197$). Esta relación respalda lo antes mencionado, ya que en la parte basal de la hoja, donde se midió el mayor grosor de hoja, por el incremento de los espacios lacunares también se determinó la menor densidad de hoja, mientras que en el ápice se presentó el fenómeno inverso.

En el presente estudio, el parámetro morfológico más claramente asociado a la variación de la luz fue el grosor de la epidermis, que es precisamente la parte de la hoja donde se desarrolla el proceso fotosintético. Una disminución de la disponibilidad de luz parece estar asociada a un aumento del grosor de la epidermis, ya sea relacionada con la atenuación de luz en la profundidad, praderas E, F o con la autosombra dentro del dosel por el aumento de la biomasa foliar, praderas A, B (**Figura 34a**). También se encontró un patrón de variación a lo largo de la hoja y asociado a la atenuación de luz dentro del dosel, ya que el mayor grosor de epidermis se determinó en la zona basal de la hoja y se observó una progresiva disminución hacia la parte apical (**Figura 34b**). Estos resultados sugieren que para mantener relativamente constante la concentración de pigmentos por unidad de volumen, o por lo menos evitar que aumente por encima de un valor crítico, las hojas que crecen en ambientes de baja luz (praderas E, F) y que deben incrementar su contenido en pigmentos, consiguen neutralizar el *efecto paquete* al aumentar el grosor de la epidermis. A lo largo de la hoja, la concentración de pigmentos (**Figura 39b**) aumenta al ir disminuyendo el grosor de la epidermis hasta un máximo en la parte media, a partir del cual disminuye rápidamente hacia la punta al reducirse también su contenido de pigmentos. Esto sugiere una regulación sincronizada de la morfología de la hoja y del contenido de pigmentos.

En este análisis fotoaclimatativo, se observó que la variabilidad del grosor de la epidermis es un elemento clave en la mejora de la eficiencia de absorción de luz. Al analizar con más detenimiento la variación del grosor de la epidermis de cada pradera con la variación de la irradiancia dentro del dosel (**Figura 35**),

se observó una clara tendencia a disminuir este parámetro a altos valores de irradiancia y esta tendencia es específica para cada pradera, aunque dos praderas, la C y la D no presentaron una asociación significativa (**Figura 42**). Examinando la asociación de variación de cada pradera resaltan: i) la ausencia de asociación en la pradera C que recibe en promedio más luz y que además presentó el menor grosor promedio de epidermis; ii) las praderas A y F presentaron los valores mayores del grosor de la epidermis, las dos praderas se sitúan en los extremos menos iluminados de los dos gradientes de luz examinados: el de autosombra en el dosel, A, y el de atenuación de luz en profundidad, F; y iii) las praderas B, E que son dos de las praderas que presentaron los valores más bajos de irradiancia promedio, y que tuvieron valores intermedios del grosor de la epidermis, además de una asociación significativa entre la variación de éste y la irradiancia (**Figura 42**).

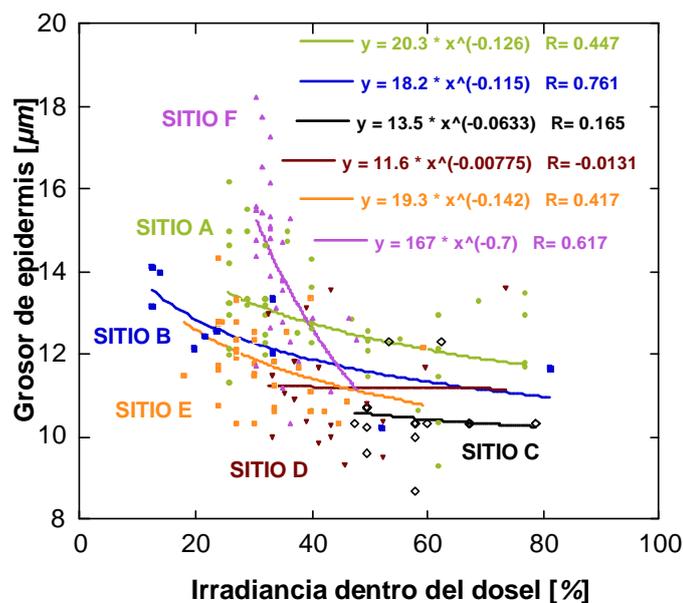


Figura 42. Variabilidad del grosor de epidermis en función de la irradiancia dentro del dosel.

En los pastos marinos la epidermis podría actuar, para algunas especies que habitan aguas muy iluminadas como *Thalassia testudinum*, como el tejido de empalizada en plantas terrestres, ya que teóricamente podría dirigir los fotones hacia el aerénquima y sistema lacunar, donde pueden aumentar su paso óptico efectivo y consecuentemente su probabilidad de absorción en los pigmentos. Por tanto, aumentar la epidermis y el grosor de hoja simultáneamente podría mejorar significativamente la habilidad de los

pigmentos para absorber luz por medio de la dispersión múltiple. Este fenómeno es el que precisamente se ha observado en este estudio y que ha permitido aumentar considerablemente la eficiencia de absorción de luz de las hojas de la pradera más somera, la A.

Se debe señalar también que a baja luz la hoja podría contrarrestar la fuerte disminución de la producción foliar de la pradera como consecuencia de la reducción de la densidad de haces (**Enríquez & Pantoja-Reyes, 2005**) a través de dos mecanismos compensatorios: *i*) aumentar su área foliar (tamaño del haz); y *ii*) aumentar la maquinaria fotosintética interna de la hoja (por unidad de área proyectada), con el fin de aumentar las tasas fotosintéticas. El primer mecanismo dependería de la regulación de la tasa de duplicación del meristemo foliar. El segundo se conseguiría únicamente aumentando el grosor de la epidermis, ya que los pastos marinos carecen de un mesófilo pigmentado. Este aumento, aunque pequeño puede ser lo suficientemente significativo para asegurar un balance de carbono positivo a la planta en condiciones de fuerte limitación por luz. Además, un aumento del grosor de la epidermis puede mejorar la eficiencia de absorción de luz cuando disminuye o mantiene en los mismos valores la concentración de pigmentos por unidad de volumen, por lo que puede ser especialmente beneficioso en condiciones de limitación de recursos. Los resultados del análisis alométrico son consistentes con esta hipótesis.

Las hojas de plantas terrestres que se desarrollan a bajas intensidades de luz tienden a presentar valores más altos de SLA, y son hojas más delgadas con un tejido de empalizada poco estructurado, baja densidad de hoja y alta concentración de pigmentos. Por el contrario, si crecen a altas intensidades de luz, las hojas son más gruesas y más densas, con un tejido de empalizada bien desarrollado (**Jurik, 1986; Enríquez & Sand-Jensen, 2003**). SLA se considera un factor clave para explicar las diferencias fisiológicas entre las plantas que se aclimatan a la sombra (**Björkman, 1981; Enríquez et al., 1994; Lambers et al., 1998**). En el presente estudio, SLA no mostró un patrón de variación a lo largo del gradiente de profundidad entre praderas (**Figura 36a**), pero sí dentro del dosel, donde el SLA aumenta hacia el ápice de la hoja, es decir, hacia las zonas más iluminadas del dosel (**Figura 36b**) opuesto a lo propuesto para plantas terrestres. **Enríquez (2005b)** analizó la habilidad para absorber luz de

las hojas de *Thalassia testudinum* y observó que las hojas que presentan mayores valores de SLA tienen además menores valores de absorptancia. En el presente estudio se confirma esta observación, pues se encontró que el SLA y la absorptancia tienen una asociación significativa negativa, aunque débil (Log/log, $r = -0.22$, $p < 0.001$, $n = 186$). Mientras que, la relación SLA y el coeficiente específico de absorción no fue significativa, pero sí se observó una asociación significativa y negativa de SLA con los pigmentos por unidad de peso (Log/log, $r = -0.14$, $p < 0.01$, $n = 203$), es decir, los segmentos de hoja delgados y con mayores valores de SLA tienen además en promedio menores contenidos de pigmentos por unidad de peso, lo que explica la ausencia de correlación entre SLA y el coeficiente específico de absorción.

6.3.5 Modelo de variación morfológica de la respuesta fotoaclimatativa de la hoja de *Thalassia testudinum*.

Los dos tipos de hojas encontrados en el análisis alométrico no necesariamente corresponden con la variación morfológica encontrada en la respuesta fotoaclimatativa. Al excluir del análisis comparativo los segmentos inmaduros, se encontró que los segmentos maduros, adaptados a baja luz presentan semejanzas al Tipo I de hoja (**Figura 23**). Lo que implica tener un mayor grosor de hoja (en la parte basal) y menor densidad de hoja, pero contrario al Tipo I, está asociado a un mayor contenido de pigmentos por unidad de peso. Aumentar el contenido de pigmentos está asociado a mejorar las tasas fotosintéticas y la productividad foliar, este aumento ligado a un aumento del grosor de la hoja puede permitir contrarrestar el efecto paquete en estos segmentos más pigmentados. Un aumento adicional del grosor de epidermis puede aumentar el efecto paquete si está acompañado de un aumento de la concentración de pigmentos, pero podría favorecer el desarrollo de cristales de oxalato de calcio (pudiendo aumentar su tamaño y/o número) y, mejorar la dispersión múltiple del tejido pluricelular. En contraste, los segmentos maduros adaptados a alta luz presentan semejanzas al Tipo II de hoja (**Figura 23**), pero donde el menor grosor de hoja, y de la epidermis van acompañados también de un menor contenido de pigmentos, así como de una mayor densidad de la hoja. Este tipo de hoja mantiene una alta eficiencia de

absorción de luz debido principalmente al efecto del menor contenido de pigmentos por unidad de peso.

En función de la respuesta fotoaclimatativa se pueden considerar dos tipos de segmentos maduros a lo largo de la hoja: *i*) uno aclimatado a baja luz, zona basal; y *ii*) otro segmento aclimatado a valores mayores de la irradiancia hacia la zona apical. Las respuestas morfológicas inducidas a baja luz fueron principalmente un mayor grosor de hoja y de epidermis, y por tanto segmentos de hoja con menor densidad, aunque baja SLA. Estas hojas tienen además mayor contenido de pigmentos por unidad de área y una mayor capacidad de absorber luz. A alta luz, se presentaron las características inversas (**Figura 43**). La mayor capacidad de absorber luz de los segmentos de la parte basal maduros, se consiguió al combinar el efecto de aumentar el contenido de pigmentos, que son los primeros involucrados en el proceso de absorción de la luz, e incrementar el grosor de la hoja y de la epidermis. Como resultado de estos cambios morfológicos, la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos se mantiene constante entre los dos tipos de segmentos.

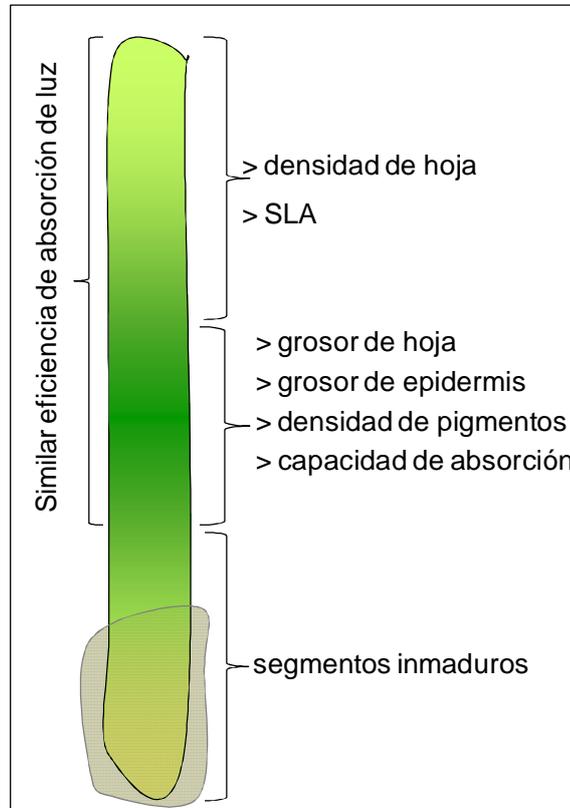


Figura 43. Modelo de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *T. testudinum*, determinado en este estudio.

VII. CAPITULO 3

ANÁLISIS DEL EFECTO DE LOS CRISTALES DE OXALATO DE
CALCIO EN LA REGULACIÓN DE LAS PROPIEDADES ÓPTICAS
DE LAS HOJAS.

7.1 Materiales y Métodos.

7.1.1 Aislamiento de células epidérmicas sin pared celular (protoplastos) de las hojas de *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme*.

El aislamiento de los protoplastos (células sin pared celular) se realizó con el fin de separar las células pigmentadas del resto del tejido foliar que conforma las hojas de cada una de las dos especies de pastos marinos que se analizaron, y poder estudiar así por separado sus propiedades ópticas. Los protoplastos de las dos especies se analizaron desde la perspectiva óptica como suspensiones de células siguiendo una metodología similar a la del fitoplancton. Al eliminar el efecto del tejido, es posible comparar el efecto de los cristales de oxalato de calcio, presentes en los protoplastos de *T. testudinum* y ausentes en los protoplastos de *S. filiforme*, sobre la eficiencia de absorción de luz (coeficiente específico de absorción, a^*).

El aislamiento de los protoplastos inicialmente se realizó conforme a lo descrito por **Balestri y Cinelli (2001)** para dos pastos marinos del Mediterráneo, sin embargo, las recomendaciones que ellos presentan no permitieron digerir las hojas de las especies tropicales. El aspecto más importante fue determinar la proporción de enzimas utilizadas para digerir los tejidos de *T. testudinum* y *S. filiforme*. En este estudio la proporción óptima fue la siguiente: celulasa 1%, pectinasa 1.5% y hemicelulasa 0.5%. También se realizaron otras modificaciones a la técnica original, que se describen a continuación:

i) Las hojas de *T. testudinum* y *S. filiforme* se enjuagaron y se mantuvieron con agua de mar filtrada-esterilizada y con una solución antioxidante (vol. 1:1).

ii) Las hojas se cortaron en segmentos muy finos (~1 mm de ancho) y se tomaron 10g (peso húmedo) de material de cada especie, el que se colocó en dos cajas Petri con medio pre-plasmólisis, que ablanda los tejidos, durante una hora.

iii) Se tomaron 5g de pedacitos de hoja en el medio pre-plasmólisis y se colocaron en tubos Falcon (50ml) con 10ml de mezcla de enzimas, que degrada los tejidos.

iv) Los tubos se introdujeron en un recirculador de agua (Neslab RTE-100), con agitación suave, protegidos de la luz, a 30°C. La digestión del tejido para obtener los protoplastos fueron: para *T. testudinum* 12h y para *S. filiforme* 10h.

v) Al finalizar la digestión, las muestras se tamizaron para separar el material grueso no degradado.

vi) Las soluciones separadas con material muy fino, se colocaron en 10ml de solución de lavado, que permite la liberación de los protoplastos, dentro de tubos Falcon (50ml) que se introdujeron al recirculador de agua (Neslab RTE-100), con agitación suave, protegidos de la luz, a 30°C, durante una hora.

vii) Las muestras se filtraron con una malla de nylon de 100µm de abertura.

viii) El material filtrado se desechó y la solución se colocó en tubos de policarbonato (50ml) con solución de lavado para concentrar el material y se centrifugaron (International Equipment Co., USA) a 1500rpm, durante 20 minutos a temperatura ambiente.

ix) El pelet obtenido se depositó en tubos de policarbonato (15ml) en donde previamente se habían colocado las distintas soluciones del gradiente de Ficoll (0, 30 y 35%) y se centrifugaron (International Equipment Co., USA) a 1800rpm, durante 15 minutos a temperatura ambiente.

x) Los protoplastos, posterior a la centrifugación, se separaron y situaron en la banda media del gradiente de Ficoll, éstos se recolectaron y resuspendieron en 5ml de solución de lavado fresca.

La preparación de los reactivos empleados se describe en el Anexo 11.3.

7.1.2 Determinación de los descriptores ópticos de las suspensiones de protoplastos.

Se realizaron lecturas de absorbancia, D , en el espectrofotómetro (Aminco, DW2, USA) del pelet resuspendido para cada especie, en la solución de lavado fresca (el cual se llamará concentrado de protoplastos). El concentrado de protoplastos se consideró como una muestra al 100%. Una porción de ésta muestra se utilizó para preparar el blanco de referencia, que se blanqueó con

hipoclorito de sodio (Sigma). Posteriormente, se tomó una parte del concentrado de protoplastos, así como, del blanco de referencia y se diluyeron con solución de lavado fresca al 80, 60, 50, 25, 10, 5, 4, 3 y 2% de su concentración original y se midió la absorbancia, D , de las diluciones.

Con estos datos se calculó el coeficiente específico de absorción en el pico de absorción en el rojo de la clorofila a , que en este caso correspondía a valores similares a los del fitoplancton de $675nm$, a^*_{675} , como se describió en el apartado 4.2.1.

7.1.3 Determinación de la densidad de pigmentos de los protoplastos.

La extracción de pigmentos se hizo únicamente del concentrado de pigmentos por duplicado para cada especie. Se tomaron $1000\mu l$ del concentrado de protoplastos y se colocaron en tubos Eppendorf ($1.5ml$). Se centrifugó la muestra para concentrarla (Sorval, Heraeus), hasta que la micro-centrífuga alcanzará su máxima velocidad ($13,000rpm$), esto es para que el pelet se compacte, pero no excesivamente, y la acetona diluya los pigmentos. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, secando el pelet con una toallita (Kimwipes EX-L). Se agregaron $1000\mu l$ de acetona pura fría y se agitó la muestra con un vortex (Fisher) durante un minuto. Los tubos con el extracto se mantuvieron protegidos de la luz con papel aluminio y en refrigeración ($4^{\circ}C$, $\sim 20h$). Después de éste periodo, las muestras se centrifugaron (Sorval, Heraeus) a temperatura ambiente, durante 10 minutos a $13,000rpm$, para separar el sobrenadante que contiene los pigmentos disueltos.

Las lecturas de absorción de los pigmentos se realizaron con un espectrofotómetro como se describió en el apartado 4.2.1. Como blanco de referencia se utilizó acetona pura y fría. Las concentraciones de clorofila a se calcularon con las formulas de **Jeffrey & Humphrey (1975)**. La cantidad de clorofila a se expresó por unidad de área proyectada [densidad de clorofila a , $mg\ chl\ a\ m^{-2}$].

7.1.4 Determinación del tamaño de los protoplastos.

El tamaño de los protoplastos se midió en un microscopio óptico compuesto (Olympus CH-2), equipado con un ocular graduado.

7.1.5 Análisis estadístico.

Para comparar el efecto de los cristales de oxalato de calcio en los protoplastos de las hojas de *T. testudinum* con los protoplastos de *S. filiforme*, se ajustó la variación observada entre los coeficientes específicos de absorción y la densidad de clorofila *a* a una función lineal (regresión lineal simple) con los descriptores transformados logarítmicamente.

7.2 Resultados.

7.2.1. Variabilidad de la morfología de los cristales.

Las observaciones que se han realizado hasta ahora en este estudio, se limitan al microscopio óptico (modelo). En los cortes paradermales que se realizaron a las hojas de este pasto para observar los cristales de oxalato de calcio, se observó la presencia de entre uno y dos cristales individuales por célula de la epidermis, así como la presencia ocasional de un cristal gemelo por célula (**Figura 44**).

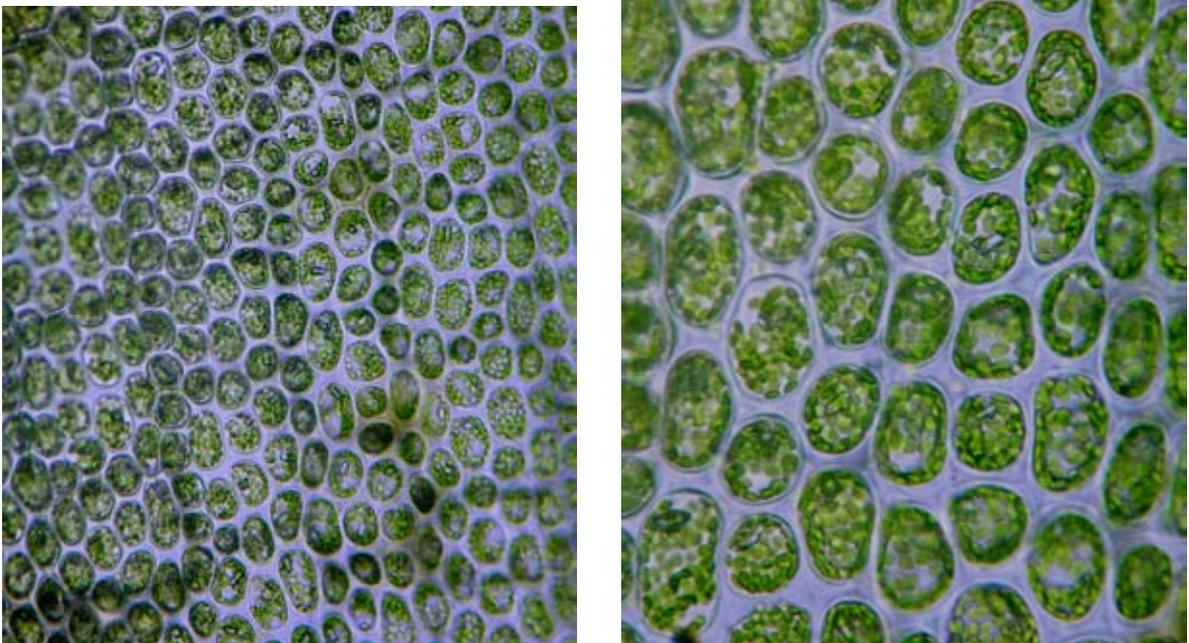


Figura 44. Presencia de cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas (corte paradermal) de las hojas de *Thalassia testudinum* (Foto S. Enríquez).

La forma de este cristal fue consistente, aunque no su orientación. Son cristales prismáticos (**Figura 45**) con bordes apuntados, que variaron de tamaño en un rango entre $12 \times 3 \mu\text{m}$ a $45 \times 12 \mu\text{m}$, para un solo cristal.

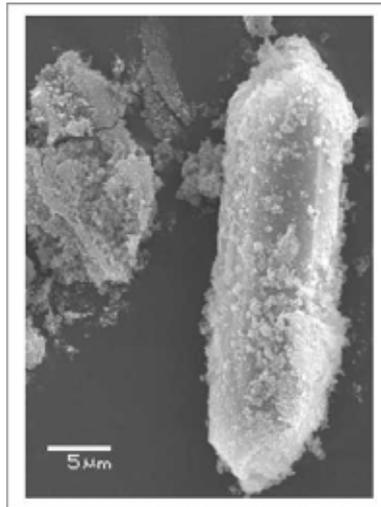


Figura 45 Cristal de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas de las hojas de *Thalassia testudinum* (foto R. Wong).

También se observó que en la zona inmadura o parte basal de la hoja (i.e., 1cm, **Figura 46**), los cristales son pequeños, es decir, están poco desarrollados, mientras que en los siguientes segmentos (3 y 8cms), que corresponden a la parte madura de la hoja, se observó un aumento progresivo del tamaño del cristal, es decir, están ya desarrollados y han incrementado su volumen dentro de las células epidérmicas. Esto revela que los cristales dentro de las células epidérmicas de la hoja siguen un proceso de maduración o crecimiento al igual que la misma hoja, es decir, que la parte basal de la hoja ya contiene cristales aunque inmaduros o poco desarrollados y que estos alcanzan mayor tamaño conforme crece la hoja.

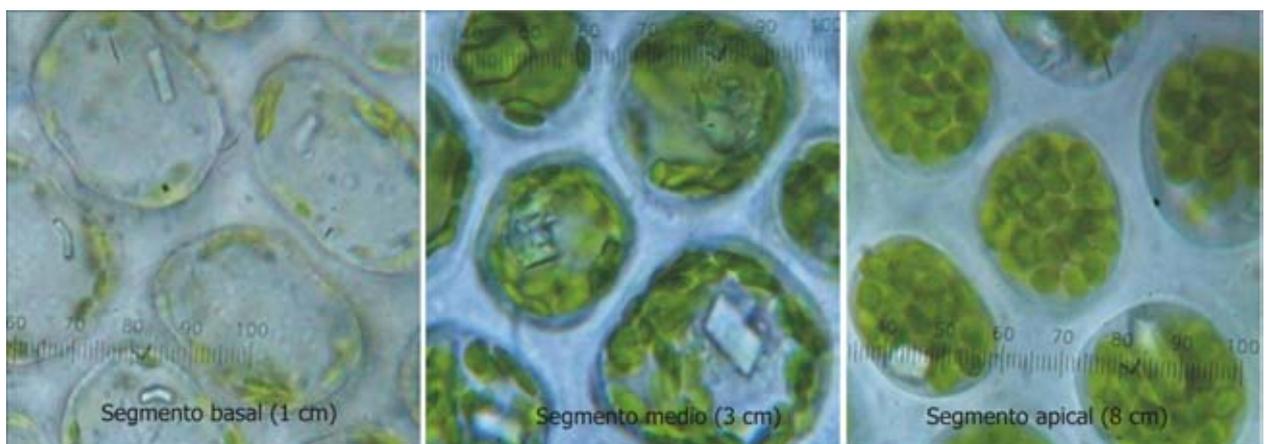


Figura 46. Presencia de cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas (corte paradermal) de las hojas de *Thalassia testudinum*, colectadas en la pradera A (Fotos L. Legaria-Moreno).

7.2.2. Análisis del efecto de los cristales de oxalato de calcio sobre la eficiencia de absorción de luz en protoplastos de pastos marinos.

Para hacer esta comparación se examinaron las propiedades ópticas de las células epidérmicas de *Thalassia testudinum*, que contiene estos cristales, con células epidérmicas de otro pasto marino, *Syringodium filiforme*, que no contiene estos cristales (Dobbs *et al.*, 2004). Para eliminar el efecto de la morfología foliar, pues son dos especies con grandes diferencias en su anatomía foliar (Figura 47), se produjeron protoplastos (células epidérmicas sin pared celular) de las dos especies y se analizaron las propiedades ópticas de estos protoplastos. En este análisis se siguió la metodología utilizada para el fitoplancton y se analizaron las propiedades ópticas de dos suspensiones de células.

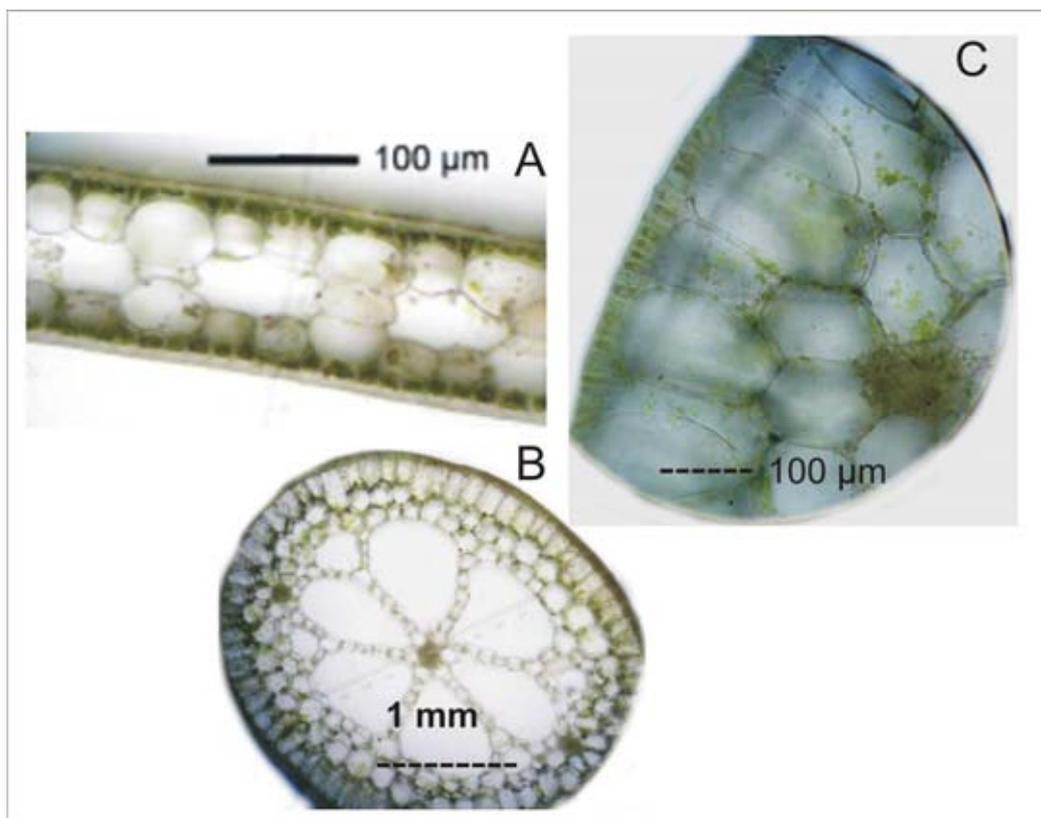


Figura 47. Cortes transversales de las hojas de a) *Thalassia testudinum* (foto S. Enríquez) escala 100µm, b) *Syringodium filiforme* (Foto L. Legaria-Moreno) escala 1mm y acercamiento de *S. filiforme* (Foto L. Legaria-Moreno) escala 100µm, describiendo las diferencias en su anatomía interna.

Se compararon los coeficientes específicos de absorción de las células epidérmicas de *T. testudinum*, con las células epidérmicas de *Syringodium*

filiforme. Para hacer esta comparación se digirieron hojas recién colectadas de ambas especies y se produjeron dos suspensiones limpias de protoplastos, una para cada especie (**Figura 48**).

Debido a que el coeficiente específico de absorción, a^* , también depende del diámetro celular, d , y del contenido de clorofila de la célula, Ci (i.e., células más grandes y células con contenidos mayores de pigmentos suelen presentar mayores empaquetamientos, y por tanto menores valores de a^* , ver **Kirk, 1975, 1976, 1994**), se examinaron las posibles diferencias morfológicas entre los protoplastos de las dos especies, *T. testudinum* y *S. filiforme*, así como, las diferencias ópticas y de pigmentos.

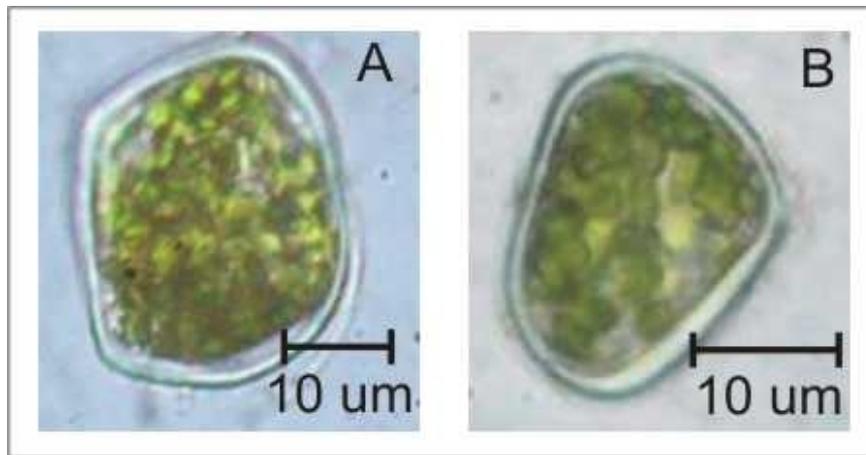


Figura 48 Protoplastos de a) *Thalassia testudinum* y b) *Syringodium filiforme* (fotos L. Legaria-Moreno).

Descriptores morfológicos de los protoplastos.

De acuerdo con los análisis realizados, se observó que los protoplastos de *S. filiforme* contienen 1.4 veces más clorofila *a* que los protoplastos de *T. testudinum*, pero que eran más pequeños de tamaño, puesto que los protoplastos de *T. testudinum* variaron entre 25 y 30 μm y los de *S. filiforme* variaron entre 15 y 20 μm . Es decir, los protoplastos de *T. testudinum* fueron 1.6 veces mayores en su diámetro celular que los de *S. filiforme* (**Tabla 16**).

Tabla 16. Descriptores morfológicos de los protoplastos (células sin pared celular) de *T. testudinum* y *S. filiforme*.

Especie	Concentración intracelular de pigmentos [$\mu\text{g cel}^{-1}$]	Rango diámetro celular [μm]	Cristales de oxalato de calcio
<i>Thalassia testudinum</i>	0.000241	25-30	Si
<i>Syringodium filiforme</i>	0.000341	15-20	No

Descriptores de pigmentos y ópticos de los protoplastos.

Para comparar las posibles diferencias en la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos de las dos suspensiones de protoplastos, se analizó el patrón de variación del coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* al aumentar la sección transversal de pigmentos. La variación de la sección transversal de pigmentos se consiguió con una serie de diluciones de la suspensión concentrada de células. Se analizó únicamente la variación de la absorbancia, *D*, en el pico de la clorofila *a*, medida a 675nm , de las distintas diluciones, y se calculó, conociendo la sección transversal de clorofila *a* [mg m^{-2}], el coeficiente específico de absorción, a^* [$\text{m}^2 \text{mg clorofila } a^{-1}$] para cada dilución. El siguiente gráfico ilustra los resultados de esta comparación (**Figura 49**):

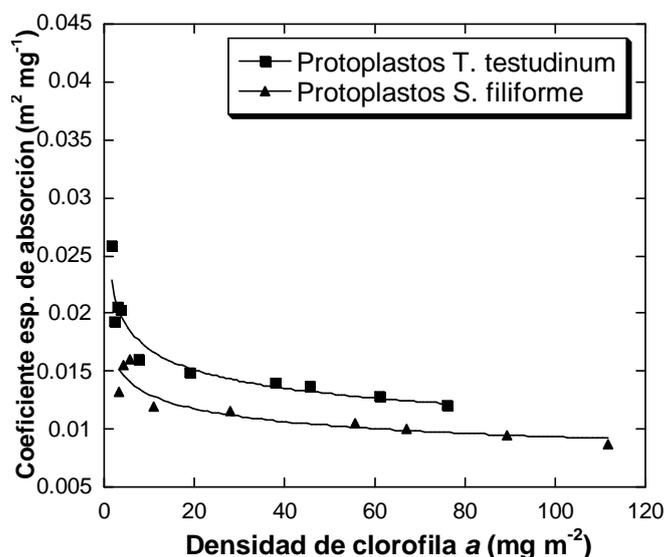


Figura 49. Comparación de la variabilidad de la eficiencia de absorción de luz de la clorofila *a* de los protoplastos de *T. testudinum* (cuadros negros) y *S. filiforme* (triángulos negros).

Para comparar la eficiencia de absorción de luz (coeficiente específico de absorción, a^*), de los protoplastos de las dos especies, en función de la

densidad de clorofila *a*, se realizó un ajuste lineal (Log-log) a los datos de cada especie. Los modelos que describen la eficiencia de absorción de luz de los protoplastos de *T. testudinum* y *S. filiforme* fueron:

$$a^*_{T. testudinum - protoplastos} = 10^{-1.61 \pm 0.02} \times \text{clorofila } a \text{ por unidad de área}^{-0.16 \pm 0.02}$$

(Log/log, $R^2=0.92$, $n=10$, E.E.=0.03, $p<0.001$),

$$a^*_{S. filiforme - protoplastos} = 10^{-1.74 \pm 0.03} \times \text{clorofila } a \text{ por unidad de área}^{-0.14 \pm 0.02}$$

(Log/log, $R^2=0.86$, $n=9$, E.E.=0.04, $p<0.001$).

Los factores de escala corregidos de estos modelos (*sensu* Niklas, 1994) muestran valores similares en el patrón de empaquetamiento de los pigmentos en los protoplastos en suspensión (factor de escala de los protoplastos de *T. testudinum* -0.16 ± 0.02 , y de los protoplastos de *S. filiforme*, -0.14 ± 0.02). Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el intercepto log/log de esta relación que indican que en todo el rango examinado, los protoplastos de *T. testudinum* mantienen una mayor eficiencia de absorción de luz que los de *S. filiforme* (rango estimado entre 1.24 y 1.32 veces). Esta diferencia de la eficiencia para absorber luz de los protoplastos de *T. testudinum* se mantuvo relativamente homogénea en todo el rango. El patrón de variación también muestra que las diferencias en la eficiencia de absorción de luz son ligeramente superiores cuando la densidad de clorofila *a* en la suspensión de protoplastos es más baja. Puesto que, para una baja densidad de pigmentos, 3 mg m^{-2} , la eficiencia de absorción de luz de los protoplastos de *T. testudinum* alcanzan la mayor diferencia, es decir son 1.32 veces más eficientes para absorber luz, comparada con los protoplastos de *S. filiforme*, mientras que a altas densidades de pigmentos, 75 mg m^{-2} , la diferencia es de 1.24 veces (**Figura 49**).

7.2.3 Comparación de la eficiencia de absorción de luz de los protoplastos versus el tejido foliar pluricelular de *Thalassia testudinum*.

Una vez que se describió el patrón de variación de la eficiencia de absorción de luz de las dos suspensiones de protoplastos se compararon estos dos patrones de variación con los valores obtenidos en la base de datos general de este trabajo para los segmentos de hoja, tanto maduros como inmaduros de *T. testudinum*.

Los valores de la eficiencia de absorción de la clorofila *a* de las hojas, también se ajustaron a una función lineal (Log-log) y se calcularon los datos teóricos según el siguiente modelo:

$$a^*_{T. testudinum - hojas} = 10^{-1.03 \pm 0.02} \times \text{clorofila } a \text{ por unidad de área}^{-0.51 \pm 0.01}$$

(Log/log, $R^2=0.86$, $n=355$, E.E.=0.10, $p<0.001$).

Los resultados mostraron que, a bajas densidades de pigmentos ($<40 \text{ mg m}^{-2}$), la eficiencia de absorción de luz de la clorofila *a* dentro del tejido foliar pluricelular fue mucho mayor que en la suspensión de los protoplastos de *T. testudinum* (entre 2.6 veces para valores de 3.0 mg m^{-2} y 1.1 veces para valores de 35 mg m^{-2}). A altas concentraciones de pigmentos la a^* entre el tejido pluricelular y la suspensión de protoplastos es casi similar (**Figura 50**).

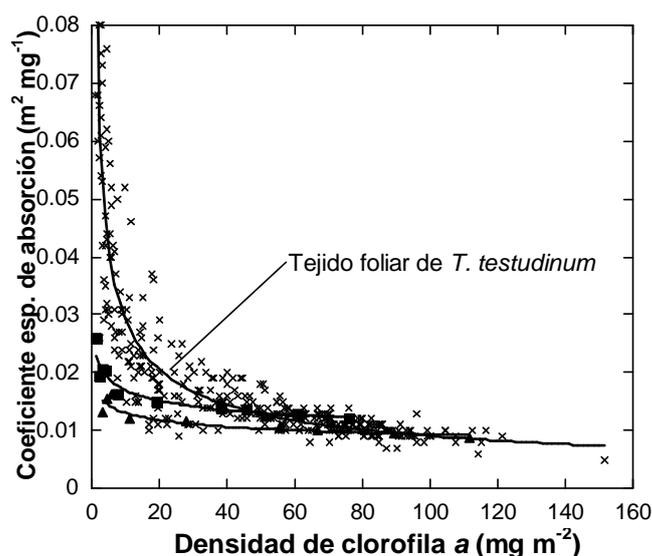


Figura 50. Comparación de la variabilidad de la eficiencia de absorción de luz de la clorofila *a* de los protoplastos de *T. testudinum* (cuadros negros) y *S. filiforme* (triángulos negros) versus el tejido foliar pluricelular de *T. testudinum* (equis negras).

7.3 Discusión.

En este capítulo se evaluó el efecto de la presencia de estructuras dispersivas como los cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas de las hojas de *T. testudinum* (Dobbs *et al.*, 2004), sobre las propiedades ópticas de las hojas, ya que se partía de la hipótesis de que una de las principales funciones de estos cristales es la de optimizar la habilidad para colectar luz de los pigmentos fotosintéticos (Franceschi & Nakata, 2005). Para ello se compararon las propiedades ópticas de los protoplastos en suspensión obtenidos de la digestión de las hojas del pasto marino tropical *Thalassia testudinum*, con las propiedades ópticas de los protoplastos del pasto marino, *Syringodium filiforme* que no contiene cristales de oxalato de calcio. La presencia de cristales de oxalato de calcio se ha documentado en todos los reinos naturales, Monera, Protista, Fungi, Animalia y Plantae. En las últimas tanto terrestres (~215 familias), como acuáticas (Friedmann *et al.*, 1972; Nakata, 2003; Dobbs *et al.*, 2004; Franceschi & Nakata, 2005).

7.3.1 Cristales de oxalato de calcio en organismos foto-autótrofos.

El oxalato de calcio es una sal cristalina poco soluble formada de ácido oxálico y calcio. Los cristales de oxalato de calcio, en los organismos fotoautótrofos se suelen producir en células especializadas llamadas idioblastos, las cuales tienen características específicas que no se han observado en otras células. Estas características son: un citoplasma muy denso con abundante retículo endoplásmico, que regula el metabolismo del calcio durante la formación del oxalato de calcio; aparatos de Golgi que transportan la matriz de proteínas hacia la vacuola; mitocondrias; pequeñas vesículas; vacuolas; plástidos y una estructura única de la membrana asociada con los cristales dentro de la vacuola. La membrana esta conformada por abundantes proteínas asociadas con el desarrollo de los cristales de oxalato de calcio (Li *et al.*, 2003).

Dentro de la vacuola de cada idioblasto se encuentra la membrana que forma una cámara que define el espacio en el que los cristales de oxalato cálcico se precipitarán y crecerán, ya que conforme el cristal aumenta de tamaño, también la estructura de la cámara aumenta. Dentro de la estructura

de los cristales se produce una matriz de proteínas (**Franceschi & Nakata, 2005**) compuesta de distintos aminoácidos (**Bouropoulos et al., 2001**). Ésta matriz de proteínas promueve la formación de los cristales y permanece durante su desarrollo, y es la responsable de la forma del cristal (**Nakata, 2003**). Este comportamiento (regulación genética) es similar al que ocurre en corales, pues la matriz de proteínas dirige la precipitación de los cristales de aragonita. Existe abundante literatura que soporta la información de que los idioblastos (que tienen una gran capacidad de almacenar calcio) y la formación de cristales están inducidos por el calcio. Esto es, conforme se incrementa la cantidad de calcio en el medio, también se incrementa la cantidad en el apoplasto (o pared celular), lo que induce la diferenciación del idioblasto. Por otro lado, se ha encontrado que el ácido ascórbico es el sustrato primario de la síntesis del ácido oxálico usado por los idioblastos, sin embargo, pueden existir otros potenciales sustratos (**Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**).

En el caso de *Thalassia testudinum* la formación de los cristales ocurre dentro de las células de la epidermis, que son además las que soportan la actividad fotosintética de la hoja, y actualmente no se conoce nada del proceso celular que regula la formación de estos cristales, recientemente descubiertos por **Dobbs et al. (2004)** en hojas de pastos marinos.

Forma, tamaño y densidad de los cristales de oxalato de calcio.

La morfología de los cristales de oxalato de calcio presenta un fuerte control genético (**Nakata & McConn, 2000; Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**). Una mutación de un único gen puede alterar drásticamente la forma de los cristales (**Nakata, 2002**). Sobre su forma, también existen componentes ambientales e inherentes al ambiente celular que contribuyen a alterarla, aunque marginalmente. Estos factores son el estado de hidratación del cristal, la relación entre la cantidad de oxalato *versus* calcio y los contaminantes (**Bouropoulos et al., 2001; Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**). Probablemente el tamaño del cristal tenga un componente ambiental mayor de regulación, pero este aspecto no ha sido todavía suficientemente estudiado.

Las formas de los cristales de oxalato de calcio descritas son: *i*) cristales prismáticos-romboidales, que pueden estar presentes uno o varios por célula; *ii*) drusas, que son conglomerados multifacéticos cercanamente esféricos; *iii*)

cristales en forma de arena, que son masas de pequeños cristales angulares, vi) paquetes de espículas, *raphide*, que son cristales delgados y alargados, algunas veces con ranuras en un extremo, que se pueden presentar en cantidades de cientos a miles; y v) estiloides, *styloids*, que se produce uno por célula (**Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**).

La forma, densidad y sitio en que se desarrollan los cristales de oxalato de calcio dentro de un organismo varía ampliamente. Es decir, que en una misma especie los cristales se pueden encontrar en uno o varios tejidos, sean fotosintéticos o de otro tipo, así mismo, los cristales pueden ser de una sola forma en toda la planta o producir distintos tipos o incluso pueden ser de múltiples formas dentro de cada planta, pero en diferente tejido o región (**Franceschi & Nakata, 2005**). Afortunadamente, la variación dentro de una misma especie no es grande, por lo que se usan como una característica taxonómica (**Nakata, 2003**). La amplia variabilidad entre especies en la distribución de los cristales de oxalato de calcio, ha sugerido que pueden presentar orígenes múltiples e independientes en cuanto a su formación y función, lo que ha promovido el desarrollo de algunos estudios sobre los mecanismos evolutivos implicados. Como se mencionaba anteriormente, existe un fuerte control genético sobre la forma de los cristales, mientras que, en la cantidad y quizás el tamaño tienen mayor peso las condiciones ambientales, como la intensidad de luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes (**Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**).

Función de los cristales de oxalato de calcio.

En los estudios realizados hasta la fecha, se han centrado los esfuerzos para obtener evidencias sobre la función de los cristales en la regulación del calcio, en la protección de las plantas frente a los herbívoros, así como en la detoxificación frente a la presencia de metales pesados (**Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**). En la regulación del calcio su principal función es como sumidero, ya que los cristales retienen altas concentraciones de calcio (**Volk et al., 2002**). Referente a la protección de las plantas, se ha observado que la cantidad de cristales aumenta tanto en hojas como en semillas en respuesta a un aumento de la herbivoría artificial (**Volk et al., 2002; Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**). En cuanto a la detoxificación por metales,

se ha encontrado que en suelos contaminados de aluminio, estroncio, cadmio, cobre y plomo, la planta puede eliminarlos del suelo a través de las raíces o incorporarlos dentro de los cristales de oxalato cálcico (**Nakata, 2003; Franceschi & Nakata, 2005**). Finalmente, un aspecto pobremente estudiado todavía es, si estos cristales ejercen algún tipo de control sobre las propiedades ópticas de las hojas. Hasta ahora solamente se ha señalado que los cristales pueden regular el campo lumínico dentro de los líquenes (**Clark et al., 2001**) y que podrían tener un papel importante en aumentar la reflectancia de la hoja (Franceschi & Horner, 1980, en **Nakata, 2002, 2003**).

Cristales de oxalato de calcio en pastos marinos.

La presencia de cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas de las hojas del pasto marino *Thalassia testudinum* fue descrita recientemente por **Dobbs y colaboradores (2004)**. Estos mismos autores también reportan en su estudio la ausencia de los cristales en otras especies de pastos marinos como *Zostera marina*, *Phyllospadix torreyi*, *Syringodium filiforme* y *Halodule wrightii*. **Dobbs et al. (2004)** mencionan que en las células epidérmicas de las hojas de *T. testudinum* generalmente solo se encontró un cristal romboidal, fuertemente refractivo, al igual que lo observado en este estudio (**Figura 51**). Estos autores también describieron la presencia de dos o más cristales gemelos dentro de cada célula, mientras que en este estudio se observó entre uno y dos cristales individuales por célula, así como la presencia ocasional de un cristal gemelo por célula. El tamaño reportado por **Dobbs et al. (2004)** (rango de $12 \times 6 \mu\text{m}$ a $22 \times 27 \mu\text{m}$, para los dos cristales unidos) fue inferior al encontrado en este estudio (rango $12 \times 3 \mu\text{m}$ a $45 \times 12 \mu\text{m}$, para un solo cristal), esta información apunta sobre la necesidad de estudios más detallados sobre el desarrollo de estos cristales en pastos marinos (variación de la forma, tamaño y distribución de los cristales), así como analizar el efecto de la luz y otros parámetros ambientales sobre esta variación (**Figura 51**).



Figura 51. Forma y tamaño de los cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas del pasto marino *Thalassia testudinum*, las barras representan 10 y 2 μ m. Tomado de Dobbs *et al.*, 2004.

La presencia y ausencia, respectivamente, de cristales de oxalato de calcio dentro de la epidermis de las hojas de las especies *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme*, permitieron analizar una de las hipótesis planteada en este estudio, respecto a la potencial función de los cristales de oxalato de calcio sobre la mejora de la colecta de luz o su pérdida por reflexión (Clark *et al.*, 2001; Franceschi & Horner, 1980, en Nakata 2002, 2003).

7.3.2 Determinación de la eficiencia de absorción de luz.

La comparación de los coeficientes específicos de absorción de los pigmentos entre organismos con estructuras ópticas diferentes pero, sobre todo, con diferente composición pigmentaria, es posible gracias a que se analiza la variación del coeficiente específico de absorción, a^*_{Chla} , de un único pigmento, la clorofila *a*, pigmento universal que se encuentra en todos los organismos foto-autótrofos (Kirk, 1994). El coeficiente específico de absorción, a^*_{Chla} , se calcula como se ha explicado anteriormente considerando la absorbancia, *D*, del máximo de absorción de luz en el rojo (675-680nm) que corresponde al pico de la clorofila *a* en donde tiene la menor interferencia con otros pigmentos accesorios. El coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* es un descriptor adecuado de su absorción óptica efectiva en comparaciones entre

diferentes estructuras que pueden variar en la concentración relativa de otros pigmentos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que la suspensión de células o protoplastos de las hojas de *T. testudinum* son 1.26 veces en promedio más eficientes para absorber la luz, que los protoplastos de *S. filiforme*. También se observó que las diferencias a bajas densidades de pigmentos son mayores que a altas densidades de pigmentos. Esto indica que el empaquetamiento de la clorofila *a* en la suspensión de protoplastos de *T. testudinum* es inferior a la de los protoplastos de *S. filiforme*. La presencia de los cristales de oxalato de calcio podría explicar estas diferencias si no fuera porque también se detectaron en este estudio diferencias en el tamaño celular de los protoplastos y en su contenido intracelular de clorofila *a*.

Teoría óptica desarrollada para el fitoplancton.

La teoría óptica desarrollada para el fitoplancton y que aplica para la suspensión de protoplastos, señala que el auto-sombreado o efecto paquete de los pigmentos fotosintéticos incrementa en: *i*) los picos máximos de absorción de pigmentos; *ii*) a altas concentraciones intracelulares de pigmentos, C_i , y *iii*) conforme aumenta el diámetro celular equivalente, d , (**Morel & Bricaud, 1981; Kirk, 1994**). **Morel & Bricaud (1981)** indican que cuando el C_i decrece a un diámetro celular equivalente constante, el coeficiente específico de absorción aumenta, es decir, se desempaquetan los pigmentos. El diámetro celular tiene un efecto similar, es decir, las células más grandes, para concentraciones intracelulares similares de clorofila *a*, sufren un mayor efecto paquete.

En este estudio, se encontraron diferencias en el diámetro celular y en el contenido de clorofila *a* de los protoplastos. Estos resultados indican que el diámetro mayor de los protoplastos de *T. testudinum* puede haber contribuido a reducir la eficiencia de absorción de luz de la clorofila *a* en las células epidérmicas de esta especie (capítulo 1 y 2), sin embargo, estos protoplastos también presentaron valores menores de su contenido intracelular de clorofila *a*, por lo que se hubiera contrarrestado este mayor empaquetamiento. La magnitud de ambos efectos se desconoce, ya que no se pudo cuantificar el efecto individual de cada componente: d y C_i de clorofila, ni confirmar que las diferencias en a^*_{Chla} observadas eran exclusivamente debidas a la presencia o

ausencia de los cristales de oxalato de calcio. Sin embargo, la presencia de dos efectos contrarios apoya la interpretación del posible papel de los cristales de oxalato de calcio en la mejora de la eficiencia de absorción de luz de los protoplastos.

Para determinar el efecto concreto de los cristales de oxalato de calcio sobre las propiedades ópticas de los protoplastos es preciso considerar las diferencias morfológicas entre ambas especies en el diámetro celular y en el contenido de clorofila *a* de sus protoplastos. Esta valoración requiere de otra aproximación que permita determinar los coeficientes de absorción, C_a , y de esparcimiento, C_s , de los protoplastos de cada especie y determinar en qué medida la presencia de los cristales pueden afectar sus propiedades ópticas (**Tabla 16**). Estas determinaciones ya se han hecho con el asesoramiento y el apoyo del Dr. Eugenio Méndez, aunque por razones de tiempo no ha sido posible incluir esta información en este manuscrito.

Efecto del tejido foliar.

El tejido multicelular de las hojas de *T. testudinum* está conformado por una epidermis pigmentada, grandes espacios aéreos que conforman el sistema lacunar y vacuolas a su alrededor (**Kuo & den Hartog, 2006**). La presencia de cristales de oxalato de calcio en células de la epidermis, supone que la hoja coloca los cristales en dos planos, adaxial y abaxial, de la hoja, dejando el aerénquima y los *lacunae* entre ellos. Al comparar la eficiencia de absorción de luz de las dos suspensiones de células o protoplastos de *T. testudinum* y *S. filiforme*, con los valores de la eficiencia de absorción de luz de las hojas de *T. testudinum*, se observó que, para una baja densidad de clorofila ($<40 \text{ mg m}^{-2}$), este pigmento dentro del tejido foliar multicelular fue entre 2.6 y 1.1 veces más eficiente para absorber la luz que en la suspensión de protoplastos de ambas especies (**Figura 50**). Sin embargo, a altas densidad de clorofila (75 mg m^{-2}), el tejido multicelular redujo su eficiencia en un 16%. Estos resultados sugieren que la presencia de los cristales de oxalato de calcio pero también su distribución en dos planos en la parte superior e inferior de la hoja, puede contribuir extraordinariamente a aumentar la probabilidad de que los fotones sean absorbidos dentro del tejido pluricelular de *Thalassia testudinum*. Este efecto amplificador sobre la eficiencia de absorción de luz, sin embargo no se

mantiene a altas densidades de pigmentos. La posible relación de la presencia de los cristales de oxalato de calcio con un aumento de la reflectancia de la hoja no parece ser muy probable en las hojas de *Thalassia testudinum*, pues los valores promedios de reflectancia reportados para esta especie son bajos, del orden del 6% (**Enríquez, 2005b**), en comparación con los valores promedios reportados para las hojas de plantas terrestres del orden del 10-15% (**Knapp & Carter, 1998**).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que los cristales de oxalato de calcio no sólo pueden regular el campo lumínico dentro de la hoja, como sugería **Clark et al. (2001)** para especies de líquenes, sino que incluso pueden contribuir a incrementar el paso óptico de la luz por medio de la dispersión múltiple, y, por tanto, a mejorar la capacidad y eficiencia de la absorción de luz de las hojas, contrarrestando el empaquetamiento de los pigmentos en el tejido (**Enríquez, 2005**).

VIII. Corolario.

El análisis alométrico permitió observar una gran variabilidad en la capacidad (C.V.=39%) pero sobre todo en la eficiencia (C.V.=79%) de absorción de luz de las hojas de *Thalassia testudinum*, resultado de una variación de más de dos órdenes de magnitud en la sección transversal de pigmentos [densidad de clorofila $(a + b) \text{ mg m}^{-2}$]. Este rango de variación es el mayor hasta ahora examinado en pastos marinos, gracias a la consideración en esta comparación de segmentos inmaduros, poco pigmentados, con valores de densidad de pigmentos por debajo de 20 mg (clorofila $a + b) \text{ m}^{-2}$. En este rango de variación, la magnitud del *paso óptico efectivo* de la luz o la habilidad máxima de estas hojas para amplificar la capacidad de absorción de luz, puede ser mejor evaluada. Los valores máximos determinados en este estudio para la sección transversal de pigmentos no sobrepasaron los 270 mg m^{-2} (máximo= 267.7 mg m^{-2}). Este resultado confirma que las hojas de *T. testudinum* mantienen valores generalmente bajos de su contenido de pigmentos en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, en comparación con especies de pastos marinos de ecosistemas templados que presentan promedios entre 200 y 440 mg clorofila m^{-2} . El valor máximo observado de la absorptancia de las hojas de *T. testudinum* de la laguna arrecifal de Puerto Morelos fue de 61.3% y se alcanza a valores de densidades de pigmentos por encima de los 142 mg m^{-2} . Este valor también está por debajo del promedio considerado para hojas de plantas terrestres que está reportado en 83% , a pesar de que los valores promedios de reflectancia de estas hojas son de alrededor del 15% mientras que los reportados para *Thalassia testudinum* son del orden del 6% .

Por encima del valor promedio máximo de la absorptancia, incrementos en la sección transversal de pigmentos no se ven reflejados en una mejora significativa de la capacidad de absorción de luz. La pérdida de eficiencia de los pigmentos fotosintéticos en absorber luz cuando están organizados dentro de estructuras fotosintéticas se denomina *efecto paquete*, y es un fenómeno que se ha observado y descrito para organismos unicelulares pero también se ha comprobado que afecta a estructuras dispersivas multicelulares. El análisis alométrico permitió describir la magnitud del *efecto paquete* en las hojas de *Thalassia testudinum*, determinando un factor de escala en la asociación

log/log entre el coeficiente específico de absorción, a^* , y la sección transversal de pigmentos cercano a $-1/2$ (-0.52), y similar a los encontrados para las asociaciones de a^* con la concentración de pigmentos por unidad de volumen (-0.50) y con el contenido de pigmentos por unidad de peso (-0.55). Estos resultados indican que la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos decae no linealmente al aumentar tanto su sección transversal como el contenido de pigmentos por unidad de volumen y de peso foliar, pero también que las hojas más pigmentadas de esta especie son capaces de contrarrestar el efecto paquete ya que sufren proporcionalmente un menor empaquetamiento (factor de escala > -1).

El fenómeno que compensa el efecto paquete en estructuras dispersivas, es la *dispersión múltiple*, el cual permite incrementar la eficiencia de absorción de luz al incrementar el paso óptico efectivo de la luz y, por tanto, la probabilidad de que un fotón sea absorbido por una molécula de pigmento. La eficiencia de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos, a^* , en las hojas de *Thalassia testudinum*, mostró en este estudio una variación de un orden de magnitud ($0.0034-0.0693 \text{ m}^2 \text{ mg}^{-1}$). Variaciones de la anatomía de las hojas de *T. testudinum*, asociadas a cambios no tanto en la distribución de pigmentos sino en el volumen de hoja que ocupan (grosor de la epidermis), en el volumen total de la hoja (grosor total) y en el volumen de los *lacunae* (densidad de hoja), además del desarrollo de cristales de oxalato cálcico dentro de las células epidérmicas, podrían ser los responsables de explicar esta variación en la eficiencia de absorción de luz. Las variaciones observadas en este estudio de la morfología de la hoja apoyan esta conclusión, pues se encontraron diferencias importantes tanto en el grosor de la hoja ($110-410 \mu\text{m}$), de la epidermis ($8.7-18.8 \mu\text{m}$), y del sistema lacunar ($15.3-162.0 \mu\text{m}$), así como en el área específica ($104.7-378.0 \text{ cm}^2 \text{ gPS}^{-1}$). El análisis alométrico permitió determinar que los cambios en el grosor y en la densidad de la hoja, los dos descriptores morfológicos tradicionalmente considerados más involucrados en la regulación de las propiedades ópticas de la estructura fotosintética, son también los descriptores morfológicos más importantes en la regulación de la capacidad de absorción de luz de las hojas de *T. testudinum*. En este estudio se encontró que el grosor tiene un mayor efecto ($\sim 40\%$) que la densidad de la hoja ($\sim 30\%$), para mejorar significativamente la absorptancia. Sin embargo, los

cambios en el grosor de la hoja o en su densidad no parecieron tener ningún efecto directo sobre la variación de la eficiencia de absorción de luz, a^* , más allá de su efecto sobre la variación del contenido de pigmentos por unidad de peso. Las implicaciones biológicas de estos resultados son muy importantes pues significa que si un aumento del grosor de la hoja permite alargar el paso óptico efectivo de la luz y mejorar la absorción de luz, estas hojas podrían reducir significativamente los costos de inversión en pigmentos. Es decir, *Thalassia testudinum* y probablemente todos los pastos marinos de anatomía foliar similar a ella, pueden producir hojas más gruesas, con contenidos menores de pigmentos por sección transversal de hoja, sin comprometer su capacidad de absorción de luz. El aumento del grosor de hoja implica también un incremento del tamaño de los lacunae (sistema lacunar) y por tanto, no necesariamente requiere de una mayor inversión estructural en carbono. Esta interpretación del papel del grosor de la hoja en la respuesta fotoaclimatativa de los pastos marinos contrasta fuertemente con las interpretaciones tradicionales que se han reportado en el ámbito de la ecología terrestre y acuática, en dónde una disminución del grosor de la estructura fotosintética (célula, talo u hoja) está asociada siempre a menores disponibilidades de luz, como consecuencia de la necesidad de regular el fuerte gradiente interno de luz que se forma en el interior del tejido (reducir la autosombra) y de optimizar la relación superficie/volumen. Estudios previos realizados en pastos marinos no habían encontrado hasta ahora un claro efecto del grosor sobre las propiedades ópticas de las hojas. Ésta es la primera vez que se describe un patrón que además contrasta con las interpretaciones tradicionales y que probablemente sea el resultado de la especial anatomía desarrollada por este grupo taxonómico en su adaptación al medio marino. En las hojas de los pastos marinos de anatomía similar a la de *T. testudinum*, un aumento del grosor de hoja puede favorecer el aumento del paso óptico efectivo de la luz en el aerénquima gracias a la presencia de estructuras refractivas como burbujas de aire en el sistema lacunar, la presencia de grandes vacuolas, o de las paredes celulares o de los mismos cristales de oxalato de calcio dentro de la epidermis, sin comprometer en exceso la fotosíntesis pues el tejido que regula la actividad fotosintética está concentrado en la epidermis. Otras anatomías foliares como las de *Syringodium filiforme* quizás no requieren de la presencia de estos

cristales al ser ópticamente mucho más gruesas y tener un volumen de distribución de los pigmentos mucho mayor.

Otra importante observación de este estudio es que las variables grosor de hoja, densidad de hoja y pigmentos por unidad de peso en *Thalassia testudinum* están inter-correlacionadas. Aumentar el grosor de la hoja en esta especie conduce necesariamente a una disminución de su densidad, ya que el aumento involucra principalmente al tamaño del aerénquima y los *lacunae*. Esta colinearidad involucra también al contenido de pigmentos por unidad de peso, pues el segmento de las hojas más grueso y menos denso tiende a ser el que menos pigmentos contiene, aunque este segmento es generalmente la parte inmadura de la hoja que todavía no ha desarrollado su completa pigmentación. Esto permitió inferir a partir del análisis alométrico que durante la trayectoria ontogénica de las hojas de *T. testudinum* se producen dos tipos de segmentos. El Tipo I, que corresponde a la etapa más temprana de la hoja, y son segmentos inmaduros desde el punto de vista pigmentario, caracterizados por un mayor grosor y una menor cantidad de pigmentos por unidad de área. El Tipo II, que por el contrario corresponde a un segmento maduro, donde se expresa toda la respuesta fotoaclimatativa de la hoja. Por tanto, son segmentos que ya han alcanzado su máxima pigmentación, pero también muestran cierta aclimatación a mayores irradiancias. Esta sección de la hoja muestra también una progresiva disminución de su grosor junto con un aumento en su densidad hacia el ápice. En el análisis alométrico, en donde se consideraron todos los segmentos de la hoja de *T. testudinum*, tanto inmaduros como maduros, tiene mucho peso el segmento inmaduro pues constituye el 38% de la base de datos. En *T. testudinum* la maduración morfológica ocurre antes que la pigmentaria lo que permitió describir al segmento Tipo I, aunque hay que considerar también un pequeño grupo dentro de esta tipología constituido por segmentos que todavía no han madurado estructuralmente y que, por tanto, son muy delgados y muy poco pigmentados. Esta sección de la hoja no tiene un papel relevante en la producción fotosintética de la planta, pero sí parece importante para delimitar las características que va a tener la hoja productiva. La combinación de un máximo desarrollo estructural y un mínimo contenido de pigmentos permite obtener información muy relevante en el análisis alométrico,

para la comprensión de la relación entre la morfología de la hoja y sus propiedades ópticas.

Por otro lado, el análisis de la respuesta fotoaclimatativa permitió distinguir al menos dos secciones en la hoja madura desde el punto de vista pigmentario, es decir, la considerada Tipo II en el análisis alométrico. Estas dos secciones son la parte basal que corresponde a la zona más sombreada por el dosel y, por tanto, la que desarrolla una respuesta fotoaclimatativa a baja luz; y la parte apical que es la que ocupa zonas más iluminadas del dosel y, por tanto, ha desarrollado una respuesta fotoaclimatativa a mayor irradiancia. El segmento basal maduro es el que muestra los mayores contenidos de pigmentos de la hoja y es igual o ligeramente menos grueso que la parte basal inmadura. Por el contrario, el segmento apical maduro ha podido o no experimentar una disminución de su contenido de pigmentos, pero siempre es mucho más delgado y presenta valores de densidad de la hoja mucho mayores. El segmento basal maduro de la hoja no sólo tiene poca luz por estar en las partes más bajas del dosel, sino porque suele estar cubierto por las otras hojas del haz y además suele estar enterrado en el sedimento. Los cambios morfológicos asociados a este desarrollo ontogénico de la hoja le permiten que: i) el mayor contenido de pigmentos de la hoja basal madura se asocie a un mayor grosor; mientras que ii) la reducción progresiva del grosor y el aumento de la densidad hacia la punta coincida con la disminución del contenido de pigmentos, que conducen a que la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos se compense y los cambios que se observan en ella a lo largo de la hoja sean mínimos.

Por tanto y combinando los resultados de ambos análisis para describir el desarrollo ontogénico de la hoja 2 de *Thalassia testudinum*, se definen tres tipos de secciones de hoja o tipologías. El segmento Tipo I, que se encuentra en la parte más basal de la hoja y que corresponde a la parte inmadura desde el punto de vista pigmentario, se caracteriza por presentar contenidos bajos de pigmentos y suele ser un segmento de hoja más grueso y menos denso si ha alcanzado ya la madurez estructural. El segmento Tipo II se limitaría a describir la sección de la hoja madura aclimatada a baja luz y que presenta los valores mayores del contenido de pigmentos. Y, por último, el tercer segmento, Tipo III, definiría la sección de la hoja madura que ya ha experimentado una respuesta

fotoaclimatativa asociada al cambio de la intensidad de luz dentro del dosel. Este segmento suele presentar una progresiva reducción del contenido de pigmentos y del grosor, acompañado también de un aumento en la densidad de la hoja. Esta clasificación está ilustrada en la siguiente figura:

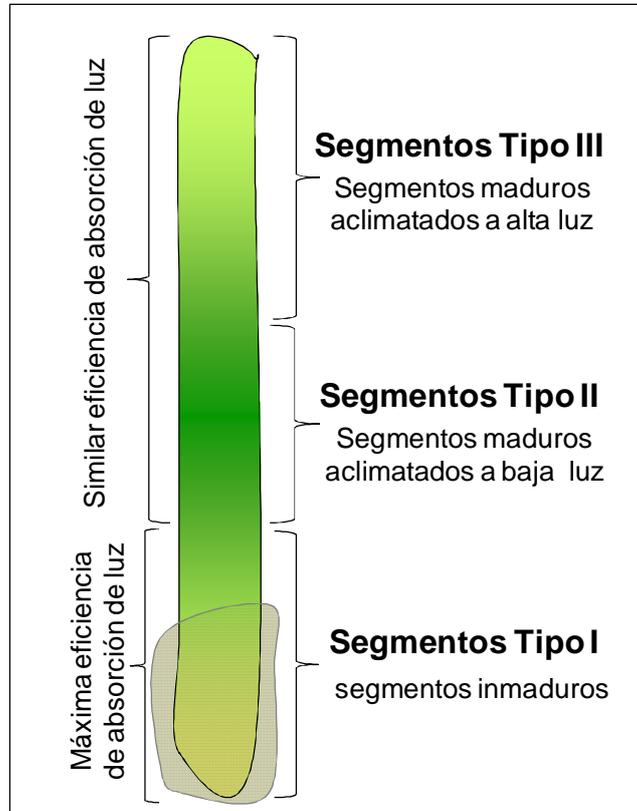


Figura 52. Modelo de variación morfológica de las hojas de *Thalassia testudinum*.

Como resultado de esta covariación de descriptores y de esta diferenciación morfológica a lo largo del desarrollo ontogénico de la hoja, se observa que el coeficiente específico de absorción, a^* , se mantiene constante a lo largo de la hoja que ya ha expresado una respuesta fotoaclimatativa completa, ya sea a baja luz (Tipo II) o a valores mayores de irradiancia (Tipo III). Es interesante la observación de que la sección de la hoja que muestra los valores mayores de a^* sea la Tipo I, ya que esta sección de la hoja es la que permanece más cubierta y protegida de la luz (cubierta por las otras hojas y por la vaina, además de estar enterrada en el sedimento), pero es la que debe ser suficientemente eficiente para colectar el mínimo número de fotones capaces de disparar en el momento oportuno los genes que regulan la formación de los cloroplastos y la inducción de la maduración pigmentaria.

La variación del grosor de epidermis presentó la menor variabilidad de todos los descriptores morfológicos considerados (C.V.=16%), pero esta pequeña variación, sin embargo, esconde una mayor variabilidad en el volumen total de la hoja que es ocupado por los pigmentos (C.V.=27.9%). Este nuevo descriptor morfológico definido como el porcentaje del volumen total pigmentado de la hoja, tuvo un valor promedio en la base de datos del 10.88% del volumen foliar total de las hojas de *Thalassia testudinum* analizadas, con un rango de variación desde un mínimo de 5.88% del volumen foliar total a un máximo del 22.1%. El grosor de la epidermis también contribuyó a explicar parte de la incertidumbre de la absorptancia en relación a los pigmentos por unidad de área, pues se encontró en el análisis alométrico un efecto directo significativo y negativo del grosor de la epidermis sobre a^* . El modelo múltiple obtenido en el análisis alométrico indicó que para valores similares del contenido de pigmentos por unidad de volumen, un aumento del grosor de la epidermis resulta en un mayor empaquetamiento de los pigmentos, mientras que menores grosores pueden favorecer una mejora de su eficiencia de absorción de luz. No obstante, un aumento del grosor de la epidermis permitiría también reducir fuertemente la concentración de pigmentos por unidad de volumen y mejorar su eficiencia de absorción de luz, por lo que aumentar el grosor de la epidermis también podría contribuir indirectamente al desempaquetamiento de los pigmentos. Un aumento del grosor de la epidermis al disminuir la disponibilidad de luz es precisamente el tipo de respuesta que se observó en el análisis de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de *T. testudinum*. En este análisis se pudo observar un máximo de disponibilidad de luz en una pradera intermedia en el gradiente de profundidad, la C, y dos gradientes lumínicos de atenuación de luz respecto a la pradera C: el primero controlado por el dosel y la biomasa foliar de las praderas, C, B, A; y el segundo controlado por la atenuación de luz en la columna de agua, C, D, F, E. La variación del grosor de la epidermis se ajustó a estos dos gradientes pues aumentó tanto en profundidad asociado al aumento de la atenuación de luz en la columna de agua (praderas D, E, F), como asociado al aumento de la autosombra de las hojas dentro del dosel (praderas B, A). La pradera C es la que presentó los menores valores del grosor de la epidermis. Éste resultado sugiere que el grosor de la epidermis es quizás el descriptor morfológico más

fuertemente regulado por la luz en la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de los pastos marinos.

El análisis de la respuesta fotoaclimatativa también confirma que el dosel de la pradera ejerce un fuerte control sobre el campo lumínico de *Thalassia testudinum*, pero que este control es mucho mayor en las praderas más someras con altas densidades de biomasa foliar. En ellas, el gradiente de luz que debe afrontar una misma hoja a lo largo de su crecimiento dentro del dosel, puede variar hasta tres órdenes de magnitud en la irradiancia en tan sólo 20cm. La respuesta fotoaclimatativa de la hoja, por tanto, debe ser capaz de desplegar estrategias adecuadas de variación en el contenido de pigmentos y en su morfología para mantener la producción fotosintética, minimizar el fotodaño y optimizar la eficiencia de absorción de luz a lo largo de su etapa completa de desarrollo. En este estudio se determinó que las respuestas fotoaclimatativas a baja luz fueron principalmente producir segmentos de hoja con un mayor grosor de hoja y de epidermis, además de menor densidad así como, un mayor contenido de pigmentos por unidad de área. Todo ello permite una mayor capacidad de absorber luz. A alta luz, se presentaron las características inversas, excepto para la eficiencia de absorción de luz, que no mostró cambios a lo largo de la hoja. Los valores del área específica en este tipo de segmento de hoja fueron también mayores. La mayor capacidad de absorber luz de los segmentos de la parte basal maduros, se consiguió al combinar el efecto de: i) la mayor cantidad de pigmentos, que son los primeros involucrados en el proceso de absorción de luz; ii) incrementar el grosor de la hoja y de la epidermis; y iii) producir cristales de oxalato de calcio.

La contribución más significativa del análisis del papel de los cristales de oxalato de calcio dentro de las hojas de *Thalassia testudinum*, fue determinar su importancia sobre las propiedades ópticas de la hoja. Los resultados mostraron que la presencia de los cristales de oxalato de calcio mejoran 1.26 veces en promedio la eficiencia de absorción de luz de la suspensión de protoplastos de *T. testudinum*, comparado con la eficiencia mostrada por los protoplastos de *S. filiforme*. Además se encontró que la morfología del tejido foliar multicelular de *T. testudinum* permite mejorar la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos 2.6 veces más en promedio, en comparación con la eficiencia de la suspensión de protoplastos. Por tanto se

puede concluir a partir de los resultados obtenidos que una de las principales funciones de los cristales de oxalato de calcio es regular las propiedades ópticas de las hojas de *T. testudinum*. Todavía se requiere determinar cual es la contribución específica de estos cristales sobre la actividad fotosintética de las hojas, además de profundizar en el conocimiento de los factores reguladores de su formación y de sus posibles efectos sobre el tamaño y número de cristales presentes dentro de las células de la epidermis de *T. testudinum*. Por ejemplo, un aumento del grosor de la epidermis podría favorecer el desarrollo de cristales de oxalato de calcio pudiendo aumentar su tamaño y/o número dentro de la célula. A pesar de que todavía son muchas las incógnitas sobre la presencia de estos cristales, sí se puede argumentar que pudieron haber contribuido al éxito evolutivo de *Thalassia testudinum*.

Por otro lado, retomando la consideración sobre el 17% de la incertidumbre obtenida en la asociación entre la capacidad para absorber luz y la variación del contenido de pigmentos por unidad de área, se infiere que la variación de la absorptancia puede ser explicada por la variabilidad morfológica diferencial del grosor de hoja, de su densidad, del grosor de epidermis y por el efecto de los cristales de oxalato de calcio en favorecer el esparcimiento múltiple dentro del tejido foliar. En el análisis alométrico también se observó que la morfología foliar *inmadura* de los pastos marinos podría explicar el hecho de que este estudio hubiera encontrado unos valores para la eficiencia de absorción de luz de las hojas poco pigmentadas 23% por debajo de los previstos a partir de estudios basados en hojas maduras. Por un lado, la hoja inmadura estructuralmente puede llegar a ser extraordinariamente delgada y muy poco pigmentada, pero además no ha desarrollado todavía los cristales de oxalato de calcio dentro de sus células epidérmicas, que son imperceptibles o muy pequeños. Este estudio permitió observar un patrón de maduración de los cristales de la base y hasta el ápice de la hoja. El desarrollo se inicia en la zona inmadura, donde existen unos cristales todavía muy pequeños, pero que van aumentando significativamente de tamaño a medida que la hoja madura, por lo que se observan más claramente hacia el ápice de la hoja. Los resultados obtenidos permiten sugerir que los cristales se desarrollan en función del proceso de maduración de la hoja, tanto desde la perspectiva de los pigmentos como de la morfología, y que su mejor efecto se observa cuando han

completado su desarrollo (segmentos maduros), a altas densidades de pigmentos, en donde ayudarían a contrarrestar el empaquetamiento de los pigmentos fotosintéticos. Poco se sabe sobre la importancia de estos cambios en el tamaño del cristal sobre la variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de las hojas. Y tampoco se dispone hasta ahora de mucha información sobre otras posibles fuentes de variación del tamaño de los cristales de oxalato de calcio dentro de las hojas de *Thalassia testudinum*. Sin embargo, estos resultados sugieren que más importante incluso que el grosor de la hoja o de la epidermis para mejorar la absorción de luz a través de alargar el paso óptico o de reducir el empaquetamiento de los pigmentos, podría ser la presencia de cristales de oxalato de calcio en las células de la epidermis, lo que ayudaría todavía más a aumentar la dispersión de luz dentro del tejido foliar.

Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad estructural de los organismos que han recolonizado el ambiente marino dentro de un grupo aparentemente simple como los pastos marinos. La diversidad morfológica y estructural que se ha ido generando a través de la evolución natural, ha seleccionado estrategias adecuadas que permiten a los organismos ser competitivos y exitosos en un nuevo ambiente lumínico como es en este caso, el acuático, con características muy diferentes al campo lumínico terrestre.

IX. Conclusiones.

1. Los pigmentos dentro de las hojas de *Thalassia testudinum* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, sufren el efecto paquete, debido a que la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos decae no linealmente al aumentar tanto su sección transversal, como el contenido de pigmentos por unidad de volumen y de peso foliar. Sin embargo, las hojas más pigmentadas son capaces de contrarrestar el efecto paquete ya que sufren proporcionalmente un menor empaquetamiento (factor de escala >-1).

2. La variable más importante que afectó negativamente la eficiencia de absorción de luz, fue el grosor de la epidermis, junto con el contenido de pigmentos por unidad de volumen. Ya que el sólo aumento de la epidermis puede reducir el empaquetamiento de los pigmentos, al mantener en los mismos niveles o reducir la concentración de pigmentos por unidad de volumen.

3. El análisis de la respuesta fotoaclimatativa confirma que el dosel de la pradera ejerce un fuerte control sobre el campo lumínico foliar, pero que este control es mucho mayor en las praderas más someras con altas densidades de biomasa foliar. En este análisis se observa un máximo de disponibilidad de luz en la pradera C, que es intermedia, y dos gradientes lumínicos de atenuación de luz respecto a ella: el primero controlado por el dosel y la biomasa foliar de las praderas, C, B, A; y el segundo controlado por la atenuación de luz en la columna de agua, C, D, F, E. El efecto más claro de la luz sobre la variación de la respuesta fotoaclimatativa se observa dentro de cada pradera y sobre una misma hoja, en el patrón de reducción de la densidad de pigmentos y de la capacidad de absorción de luz hacia la zona apical, la más iluminada del dosel.

4. En la respuesta fotoaclimatativa el grosor de la epidermis es el descriptor morfológico más fuertemente regulado por la luz. La variación del grosor de la epidermis fue el único descriptor que se ajustó a los dos gradientes lumínicos descritos en el punto 3, pues aumentó tanto en profundidad asociado al aumento de la atenuación de luz en la columna de agua, como asociado al

aumento de la autosombra de las hojas dentro del dosel. La pradera C, presentó los menores valores del grosor de la epidermis.

5. En función del grosor de hoja se encontraron dos patrones opuestos de variación a la luz disponible, en el primero se observó una disminución entre praderas del grosor promedio de la hoja asociada a la disminución de la irradiancia en la superficie del dosel con la profundidad, y segundo, una disminución del grosor a lo largo de la hoja, asociada al aumento de la irradiancia dentro de cada pradera en las partes altas de dosel. El grosor máximo que alcanza una hoja podría estar determinado por la luz, pero probablemente participen en su regulación también otros factores ambientales y/o intrínsecos a la planta.

6. Las hojas de *T. testudinum* presentaron tres tipos morfológicos en relación a su desarrollo ontogénico (análisis alométrico) y respuesta fotoaclimatativa. El Tipo I, inmaduro, caracterizado por un mayor grosor de hoja, menor densidad y menor contenido de pigmentos por unidad de peso. Tipo II, maduro, aclimatado a baja luz, caracterizado por un mayor contenido de pigmentos y con valores similares o ligeramente menores del grosor y densidad de la hoja. Tipo III, maduro, aclimatado a mayores valores de irradiancia, y caracterizado por una clara disminución de su contenido en pigmentos, grosor, y un aumento de la densidad de hoja con respecto al Tipo II. El Tipo I no tiene, probablemente, un papel relevante en la producción de la planta, mientras que el segundo y tercero son fundamentales para su desempeño fotosintético. El coeficiente específico de absorción se mantiene constante a lo largo de la hoja cuando ya ha expresado una respuesta fotoaclimatativa (Tipo II y III), mientras que el Tipo I, muestra los mayores valores de la eficiencia de absorción de luz.

7. Los cristales de oxalato de calcio dentro de los protoplastos de las hojas de *T. testudinum* mejoraron la eficiencia de absorción de luz comparados con los protoplastos de *Syringodium filiforme*. Así mismo, la estructura foliar pluricelular de *T. testudinum* mejoró también la eficiencia de absorción de luz de los pigmentos, en comparación con lo observado en la suspensión de protoplastos de *T. testudinum*. Estos resultados ofrecen evidencias para sustentar la hipótesis de que los cristales de oxalato de calcio en el reino vegetal, pueden

jugar un papel muy importante en la regulación de las propiedades ópticas de las hojas.

8. La comparación entre segmentos poco pigmentados ya sea inmaduros morfológicamente o maduros, sugiere que más importante incluso que el grosor de la hoja o de la epidermis para mejorar la absorción de luz, podría ser la presencia de cristales de oxalato de calcio colocados en dos planos (adaxial y abaxial), dentro de la hoja, dejando el aerénquima y los *lacunae* entre ellos.

X. Referencias.

- Agustí, S. 1991a. Allometric scaling of light absorption and scattering by phytoplankton cells. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48:763-767.
- Agustí, S. 1991b. Light environment within dense algal population: cell size influences on self-shading. *J. Plankton Research.* 13(4):863-871.
- Alcoverro, T., Duarte, C.M. & Romero J. 1995. Annual growth dynamics of *Posidonia oceanica*: contribution of large-scale versus local factors to seasonality. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120:203-210.
- Balestri, E. & Cinelli, F. 2001. Isolation and cell wall regeneration of protoplasts from *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa*. *Aquat. Bot.* 70:237-242.
- Björkman, O. 1981. Responses to different quantum flux densities. En: Lange, O.L. Nobel, P.S., Osmond, C.B. Ziegler, H. *Encyclopedia of plant physiology* vol. 12A. Springer-Verlag, Berlin.
- Björkman, O. & Demmig, B. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta.* 170:489-504.
- Blankenship, R.E. 2002. *Molecular mechanisms of photosynthesis.* Blackwell science. New York.
- Boardman N.K. 1977. Comparative photosynthesis of sun and shade plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28:355-377.
- Bouropoulos, N., Weiner, S. & Addadi, Lia. 2001. Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: morphology and in vitro interactions of crystal-associated macromolecules. *Chem. Eur. J.* 7(9):1881-1888.
- Callahan, H. & Pigliucci, M. 2002. Shade-induced plasticity and its ecological significance in wild populations of *Arabidopsis thaliana*. *Ecology.* 83(7):1965-1980.

- Carranza-Edwards, A., Gutiérrez-Estrada, M. & Rodríguez-Torres, R. 1975. Unidades morfo-tectónicas continentales de las costas mexicanas. An. Centro Cienc. Mar y Limnol. UNAM. México 2(1):81-88.
- Cayabyab N.M. & Enríquez S. 2007. Leaf photoacclimatory responses of the tropical seagrass *Thalassia testudinum* under mesocosm conditions: a mechanistic scaling-up study. New Phytol. 176:108-123.
- Cebrián J., Enríquez S., Awing N., Duarte C.M., Vermaat, J., & Fortes, M. 1999. Epiphyte accrual on *Posidonia oceanica* (L) Delile leaves: its implications on light absorption. Botanica Marina. 42:123-128.
- Clark, B.M., Clair, L.L.S., Mangelson, N.F., Rees, L.B., Grant, P.G. & Bench, G.S. 2001. Characterization of mycobiont adaptations in the foliose lichen *Xanthoparmelia chlorochroa* (Parmeliaceae). Ame. J. Botany. 88(10):1742-1749.
- Collier, C.J., Lavery, P.S., Masini, R.J. & Ralph, P.J. 2007. Morphological, growth and meadow characteristics of the seagrass *Posidonia sinuosa* along a depth-related gradient of light availability. Mar. Ecol. Prog. Ser. 337:103-115.
- Colombo-Pallota, M.F., García-Mendoza, E. & Ladah, L.B. 2006. Photosynthetic performance, light absorption, and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) blades from different depths. J Phycol. 42:1225-1234.
- Coronado, C., Candela, J., Iglesias-Prieto, R., Sheinbaum, J., López, M. & Ocampo-Torres, F.J. 2007. On the circulation in the Puerto Morelos fringing reef lagoon. Coral Reefs. 26:149-163.
- Cummings, M.E. & Zimmerman R.C. 2003. Light harvesting and the package effect in the seagrass *Thalassia testudinum* Banks ex König and *Zostera marina* L.: optical constraints on photoacclimation. Aquat. Bot. 75:261-274.
- Dalla-Via, J., Sturmbauer, C., Schönweger, G., Sötz, E., Mathekowitsch, S., Stifter, M., Rieger, R. 1998. Light meadow structure in *Posidonia oceanica*: ecomorphological and functional correlates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 163:267-278.

- Dawes, C.J. 1998. Biomass and photosynthetic responses to irradiance by a shallow and deep water population of *Thalassia testudinum* on the west coast of Florida. Bull. Mar. Sc. 62(1): 89-96.
- De la Lanza, E.G (compiladora). 1991. Oceanografía de mares mexicanos. AGT Editor, S.A. Primera edición. México, D.F.
- den Hartog, C. 1970. The sea-grasses of the world. North Holland, Amsterdam.
- Dennison, W.C. & Alberte, R.S. 1985. Role of daily light period in the depth distribution of *Zostera marina* (eelgrass). Mar. Ecol. Prog. Ser. 25:51-61.
- Dennison, W.C. & Alberte, R.S. 1986. Photoadaptation and growth of *Zostera marina* L. (eelgrass) transplant along a depth gradient. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 98:265-282.
- Dennison, W.C. 1987. Effects of light on the seagrass photosynthesis, growth and depth distribution. Aquat. Bot. 27:15-26.
- Dennison, W.C. 1990. Chlorophyll content. 83-85. En: Seagrass research methods. Ed.: Phillips, R.C. & McRoy, P. UNESCO. Paris.
- Dobbs, F.C., Zimmermann, R.C., Drake, L.A. 2004. Occurrence of intracellular crystals in leaves of *Thalassia testudinum*. Aquat. Bot. 80:23-28.
- Durako, M.J. 2007. Leaf optical properties and photosynthetic leaf absorptances in several Australian seagrasses. Aquat. Bot. 87:83-89.
- Duysens, L.N.M. 1956. The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. Biochim. Biophys. Acta 19:1-2.
- Enríquez, S., Agustí, S. & Duarte C.M. 1992. Light absorption by seagrass *Posidonia oceanica* leaves. Mar. Ecol. Prog. Ser. 86:201-204.
- Enríquez, S., Agustí, S. & Duarte C.M. 1994. Light absorption by marine macrophytes. Oecologia. 98:121-129.

- Enrriquez, S., Duarte C.M., Sand-Jensen, K. & Nielsen, S.L. 1996. Broad-scale comparison of photosynthetic rates across phototrophic organisms. *Oecologia*. 108:197-206.
- Enrriquez, S., Merino, M. & Iglesias-Prieto, R. 2002. Variations in the photosynthetic performance along the leaves of the tropical seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar. Biol.* 140:891-900.
- Enrriquez, S. & Sand-Jensen, K. 2003. Variation in Light absorption properties of *Mentha aquatica* L. as a function of leaf form: implications for plant growth. *Int. J. Plant. Sci.* 164(1):125-136.
- Enrriquez, S., Marbà, N., Cebrian, J. & Duarte, C.M. 2004. Annual variation in leaf photosynthesis and leaf nutrient content of four Mediterranean seagrasses. *Bot. Mar.* 47:295-306.
- Enrriquez S. 2005a. Importancia del esparcimiento múltiple en la fotosíntesis. II Encuentro: "Participación de la mujer en la ciencia". 19, 20 Mayo 2005, en León, Guanajuato (México). Memoria en extenso. ISBN 968-9241-01-X.
- Enrriquez, S. 2005b. Light absorption efficiency and the package effect in the leaves of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 289:141-150.
- Enrriquez, S. & Pantoja-Reyes, N. 2005. Form- function analysis of the effect of canopy morphology on leaf self-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Oecologia*. 145:235-243.
- Enrriquez, S., Méndez, E.R. & Iglesias-Prieto, R. 2005. Multiple scattering on coral skeleton enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol. Oceanogr.* 50(4):1025-1032.
- Falkowski, P.G. & Dubinsky, Z. 1981. Light-shade adaptation of *Stylophora pistillata*, a hermatypic coral from the Gulf of Eilat. *Nature*. 289:172-174.
- Falkowski, P.G., Owens, T.G., Ley, A.C. & Mauzerall, D.C. 1981. Effects of growth irradiance levels on the ratio of reaction centers in two species of marine phytoplankton. *Plant Physiol.* 68:969-973.

- Falkowski, P.G. & LaRoche, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27:8-14.
- Falkowski, P.G. & Raven, J.A. 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell Science.
- Franceschi, V.R. & Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:41-71.
- Friedmann, E.I., Roth, W.C. & Turner, J.B. 1972. Calcium oxalate crystals in the aragonite-producing green algae *Penicillus* and related genera. *Science.* 177:891-893.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía. UNAM. México.
- Horton P., Ruban A.V. & Walters R.G. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47:655-684.
- Huner, N.P.A., Öquist, G. & Sarhan, F. 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in plant science.* 3(6):224-230.
- Geider, R.J. & Osborne, B.A. 1992. Algal photosynthesis. Chapman and Hall. New York.
- Iglesias-Prieto R. & Trench, K.R. 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. & Trench, K.R. 1997a. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellate. II. Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. *Marine Biology* 130:23-33.
- Iglesias-Prieto R. & Trench, K.R. 1997b. Photoadaptation, photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses. *Proc. 8th Int. Coral reef Sym.* 2:1319-1324.

- Iglesias-Prieto R., Beltrán, V.H., LaJeunesse, T.C., Reyes-Bonilla, H. & Thomé, P.E. 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. & Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pfl.* 167:191-194.
- Jurik, T.W. 1986. Temporal and spatial patterns of specific leaf weight in successional northern hardwood tree species. *Amer. J. Bot.* 73(8):1083-1092.
- Kirk, J.T.O. 1975. A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. I. General treatment of pigment cells. *New Phytol.* 75:11-20.
- Kirk, J.T.O. 1976. A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. III. Cylindrical and spheroidal cells. *New Phytol.* 77:341-358.
- Kirk, J.T.O. 1994. *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems.* Cambridge University Press. Great Britain.
- Knapp, A. & Carter, G.A. 1998. Variability in leaf optical properties among 26 species from a broad range of habitats. *American J. Bot.* 85(7):940-946.
- Kuo, J. & den Hartog, C. 2006. Seagrass morphology, anatomy and ultrastructure. In: Larkum, A.W.D., Orth, R.J. & Duarte, C.M. 2006. *Seagrasses: biology and conservation.* Springer. Netherlands.
- Kuo, J. & McComb, A.J. 1989. Seagrass taxonomy, structure and development (6-73). En: *Biology of seagrasses. A treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region.* Aquatic Plant Studies 2.Ed: Larkum, A.W.D., McComb, A.J. & Shepherd, S.A. Elsevier. New York.
- Lambers, H., Chapin III F.S. & Pons, T.L. 1998. *Plant physiological ecology.* Springer-Verlag. New York.

- Li, X., Zhang, D., Lynch-Holm, V.J., Okita, T.W. & Franceschi, V.R. 2003. Isolation of a crystals matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiol.* 133:549-559.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophyll *a* and *b* leaf extracts in different solvents. *Biochem Sc. Trans.* 603:591-592.
- Major, K.M. & Dunton, K.H. 2000. Photosynthetic performance in *Syringodium filiforme*; seasonal variations in light harvesting characteristics. *Aquat. Bot.* 68:249-264.
- Major, K.M. & Dunton, K.H. 2002. Variations in light-harvesting characteristics of the seagrass, *Thalassia testudinum*: evidence for photoacclimation. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 275:173-189.
- Masini, R.J., Cary, J.L., Simpson, C.J. & McComb, A.J. 1995. Effects of light and temperature on the photosynthesis of temperate meadow-forming seagrass in the West Australia. *Aquat. Bot.* 49:239-254.
- Merino, I.M. y Otero, D.L. 1991. Atlas ambiental costero, Puerto Morelos, Quintana Roo. Ferrándiz, S.A. México.
- Merino, I.M. 1992. Afloramiento en la Plataforma de Yucatán: estructura y fertilización. Tesis Doctoral. Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México.
- Morel, A. & Bricaud, A. 1981. Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep-Sea Research.* 28A(11):1375-1393.
- Mullet, J.E. 1988. Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 39:475-502.
- Nakata, P.A. & McConn, M.M. 2000. Isolation of *Medicago truncatula* mutants defective in calcium oxalate crystals formation. *Plant Physiol.* 124:1097-1104.

- Nakata, P.A. 2002. Calcium oxalate crystals morphology. Trends in Plant Science. 7(7):324.
- Nakata, P.A. 2003. Advances in our understanding of calcium oxalate crystals formation and function in plants. Plant Science. 164:901-909.
- Niklas, K.J. 1994. Plant allometry: the scaling of form and process. The University of Chicago Press, Chicago.
- Nolasco-Montero, C. & Carranza-Edwards, A. 1988. Estudio sedimentológico regional de playas de Yucatán y Quintana Roo, México. Anal. Inst. Cienc. Mar y Limnol. 15(2):49-66.
- Olesen, B., Enríquez, S., Duarte, C., & Sand-Jensen K. 2002. Depth-acclimation of photosynthesis, morphology and demography of *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* in the Spanish Mediterranean Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 236:89-97.
- Olivé, I., Cayabyab, N., Legaria, L. & Enríquez, S. 2005. Photoacclimatory responses of *Thalassia testudinum* to a depth gradient and its implications on ecosystem structure. Trabajo presentado en la Reunión Internacional: Advancing the science of limnology and oceanography, ASLO. Santiago de Compostela, España, del 19 al 24 de junio.
- Osborne, B.A. & Geider, R.J. 1989. Problems in the assessment of the package effect in five small phytoplankters. Marine Biology. 100:151-159.
- Pirc, H. 1986. Seasonal aspects of the photosynthesis in the *Posidonia oceanica*: influence of depth, temperature and light intensity. Aquat. Bot. 26:203-212.
- Poorter, L., Oberbauer, S.F. & Clark, D.B. 1995. Leaf optical properties along a vertical gradient in a tropical rain forest canopy in Costa Rica. Ame. Journal of Botany. 82(10):1257-1263.
- Ramus, J. 1978. Seaweed anatomy and photosynthetic performance: the ecological significance of light guides, heterogeneous absorption and multiple scatter. J. Phycol. 14:352-362.

- Ramus, J. 1990. A form-function analysis of photon capture for seaweeds. *Hydrobiologia*. 204/205:65-71.
- Raven, J.A. 1986. Evolution of plant life form. In: Givnish. On the economy of plant form and function. Cambridge University Press. Cambridge.
- Rühle, W. & Wild A. 1979. The intensification of the absorbance changes in leaves by light-dispersion. *Planta*. 146:551-557.
- Runcie J.W. & Durako, M.J. 2004. Among-shoot variability and leaf-specific absorbance characteristics affect dial estimates of in situ electron transport of *Posidonia australis*. *Aquat. Bot.* 80:200-209.
- Ruiz-Rentería, F., van Tussenbroek, B.I. & Jordán-Dahlgren, E. 1998. CARICOMP. Caribbean coral reef, seagrass and mangroves sites (57-66). Ed. Kjerfve. B. UNESCO. Paris.
- Shibata, K. 1959. Spectrophotometry of translucent biological materials-opal glass transmission method. *Methods Biochem. Anal.* 7:77-109.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* New York. W.H. Freeman and Company.
- Sukenik, A., Bennett, J., Mortain-Bertrand, A. & Falkowski, P.G. 1990. Adaptation of the photosynthetic apparatus to irradiance in *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiol.* 92:891-898.
- Sultan, S. E. 2000. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in plant science.* 5 (12):537-542.
- Sultan, S. E. 2003. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evol. and Development* 5(1):25-33.
- Sultan, S. E. 2004. Promising directions in plant phenotypic plasticity. *Perspectives in Plant Ecol. Evol. and Systematic.* 6/4:227-233.
- Terashima I. & Saeki T. 1983. Light environment within a leaf. I. Optical properties of

paradermal sections of *Camellia* leaf with special reference to differences in the optical properties of palisade and spongy tissues. *Plant Cell Physiol.* 24(8):1493-1501.

Terashima I. & Saeki T. 1985. A new model for leaf photosynthesis incorporating the gradients of light environment and of photosynthetic properties of chloroplasts within a leaf. *Annals of Botany.* 56:489-499.

Terashima I. & Inoue, Y. 1984. Comparative of photosynthetic properties of palisade tissue and spongy tissue chloroplasts of *Camellia japonica* L.: Functional adjustment of the photosynthetic apparatus to light environment within a leaf. *Plant Cell Physiol.* 25:555-563.

Terashima I. & Inoue, Y. 1985. Vertical gradient in photosynthetic properties of spinach chloroplasts dependent on intra-leaf light environment. *Plant and Cell Physiol.* 26:781-785.

Thorhaug, A., Richardson, A.D. & Berlyn, G.P. 2006. Spectral reflectance of *Thalassia testudinum* (Hydrocharitaceae) seagrass: low salinity effects. *Am. J. Bot.* 93(1):110-117.

Tomlinson P.B. 1980. Leaf morphology and anatomy in seagrasses. In: Phillips R.C., McRoy, C.P. (Eds.) *Handbook of seagrass biology: an ecosystem perspective.* Garland STPM Press, New York.

Vogelmann, T.C. 1993. Plant tissue optics. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 44:231-251.

Vogelmann, T.C. & Björn, L.O. 1986. Plants as light traps. *Physiol. Plantarum* 68:704-708.

Vogelmann, T.C. & Martin, G. 1993. The functional significance of palisade tissue: penetration of directional versus diffuse light. *Plant, Cell Environ.* 16:65-72.

Vogelmann, T.C., Nishio, J.N. & Smith, W.K. 1996. Leaves and light capture: light propagation and gradients of carbon fixation within a leaves. *Trends in plant*

science. 1(2):65-70.

Volk, G.M., Lynch-Holm, V.J., Kostman, T.A., Goss, L.J. & Franceschi, V.R. 2002. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biol.* 4:34-45.

Wang, L. & Jacques, S.L. 1992. Monte Carlo modeling of light transport in multilayered tissues in standard C. Reporte Técnico, Laser Biology Research Laboratory, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center.

Williams, W.A., Jones, M.B. & Demment, M.W. 1990. A concise table for path analysis statistics. *Agron. J.* 82:1022-1024.

Zimmerman, R.C., Reguzzoni, J.L. & Alberte, R.S. 1995. Eelgrass (*Zostera marina* L.) transplants in San Francisco Bay: role of light availability on metabolism, growth and survival. *Aquat. Bot.* 51:67-86.

IX. Anexo.

11.1 Lista de Figuras.

Figura 1. Estructura de la molécula de clorofila <i>a</i> , formada por un anillo tetrapirrólico cerrado y un segmento del grupo fitol.	4
Figura 2. Sección transversal óptica de la hoja bifacial típica de plantas terrestres <i>Mentha aquatica</i> (a) y de la hoja del pasto marino tropical <i>Thalassia testudinum</i> (b).	5
Figura 3. Comparación del empaquetamiento de los pigmentos, en función de la absorción de células enteras y rotas de dinoflagelados en cultivo, <i>Symbiodinium pilosum</i> .	7
Figura 4. Variación del coeficiente específico de absorción (a^*_{680}) en función de la variación de la densidad de clorofila <i>a</i> , para hojas de <i>Thalassia testudinum</i> , <i>Mentha aquatica</i> , para 12 pastos marinos y <i>Posidonia oceanica</i> , <i>Cymodosea nodosa</i> , <i>Zostera marina</i> y <i>Zostera noltii</i> .	15
Figura 5. Ubicación de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, Q. Roo.	21
Figura 6. Ubicación de los sitios seleccionados en la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Se muestra el poblado de Puerto Morelos y la Unidad Académica de la UNAM.	23
Figura 7. Variabilidad entre praderas de la altura del dosel.	24
Figura 8. Variabilidad de la irradiancia relativa a) en la superficie del dosel, y b) dentro del dosel de cada pradera.	25
Figura 9. Variabilidad de la atenuación de luz dentro del dosel <i>versus</i> la densidad de haces.	26
Figura 10. Arreglo óptico del espectrofotómetro Aminco (DW2), controlado por el sistema colector de datos Olis, mostrando la posición de la hoja en la celda.	29
Figura 11. a) Arreglo óptico: sensor de luz plano corregido por coseno, muestra (hoja) y lámpara, midiendo b) la luz transmitida sin hoja, E_0 , y c) con hoja, E_T .	31
Figura 12. Validación del método alternativo (sensor de luz), comparándolo	

con determinaciones en el espectrofotómetro (intervalo de confianza= 0.95%).	34
Figura 13. Variabilidad de la a) absorptancia, b) coeficiente específico de absorción, c) densidad de pigmentos, d) concentración de pigmentos, e) contenido de pigmentos, f) grosor de hoja, g) densidad de hoja, h) peso específico, i) grosor de la epidermis, y j) grosor del sistema lacunar.	41
Figura 14. Variabilidad de la absorptancia en función de la densidad de pigmentos.	42
Figura 15. Diagrama de rutas que describe la relación entre la sección transversal de pigmentos o pigmentos por unidad de área con los pigmentos por unidad de peso, grosor de hoja y contenido de peso por unidad de volumen (densidad de hoja).	46
Figura 16. Diagrama de rutas que describe la relación entre la capacidad de absorción de luz o absorptancia, A_{PAR} , con los pigmentos por unidad de peso, grosor de hoja y contenido de peso por unidad de volumen (densidad de hoja).	47
Figura 17. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función de la densidad de pigmentos.	49
Figura 18. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función de la a) concentración de pigmentos por unidad de volumen y del b) grosor de la epidermis.	51
Figura 19. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función del a) contenido de pigmentos por unidad de peso y del b) peso específico, LMA.	53
Figura 20. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función del a) grosor de hoja y la b) densidad de hoja (contenido de peso por unidad de volumen).	55
Figura 21. Comparación de la variabilidad de la capacidad de absorción de luz (absorptancia, %) versus densidad de clorofila $a + b$ de los datos de este estudio con los reportados por Enríquez, 2005b.	58
Figura 22. Comparación del efecto de la variabilidad del grosor de hoja (a) y la densidad de hoja (b) sobre la relación absorptancia vs. los pigmentos por unidad de peso.	61
Figura 23. Tipos de segmentos de hojas presentes durante el crecimiento o trayectoria ontogénica de las hojas del pasto marino <i>Thalassia testudinum</i> .	66

Figura 24. Comparación de la variabilidad de la eficiencia de absorción de luz (coeficiente específico de absorción) <i>versus</i> densidad de clorofila <i>a + b</i> de los datos de este estudio con los reportados por Enríquez, 2005b.	68
Figura 25. Variabilidad del coeficiente específico de absorción en función de la clorofila <i>a + b</i> por unidad de área, separando los segmentos inmaduros de los maduros.	69
Figura 26. Variabilidad entre praderas a la altura del dosel y en promedio dentro del dosel (a) y a lo largo de la hoja (b) de la irradiancia relativa en la superficie del dosel.	79
Figura 27. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la densidad de pigmentos.	80
Figura 28. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del cociente carotenoides / clorofila <i>a</i> .	82
Figura 29. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la razón molar <i>a / b</i> .	83
Figura 30. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la absorptancia.	84
Figura 31. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del coeficiente específico de absorción.	85
Figura 32. Variabilidad entre praderas (a) y valores promedios del grosor de hoja mostrando una reducción exponencial con la profundidad.	87
Figura 33. Variabilidad a lo largo de la hoja (a) y máximos-mínimos del grosor de hoja (b).	88
Figura 34. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del grosor de epidermis.	89
Figura 35. Variabilidad del grosor de la epidermis en función de la irradiancia dentro del dosel.	90
Figura 36. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del área específica.	91
Figura 37. Valores máximos y mínimos del área específica.	92

Figura 38. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la densidad de hoja.	93
Figura 39. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) de la concentración de pigmentos.	95
Figura 40. Variabilidad entre praderas (a) y a lo largo de la hoja (b) del contenido de pigmentos.	97
Figura 41. a) Comparación de la irradiancia superficial vs. la irradiancia promedio en las seis praderas, b) Niveles de irradiancia relativa dentro del dosel de cada pradera: zona apical, intermedia y base.	102
Figura 42. Variabilidad del grosor de epidermis en función de la irradiancia dentro del dosel de cada pradera.	115
Figura 43. Modelo de la respuesta fotoaclimatativa de las hojas de <i>T. testudinum</i> , determinado en este estudio.	118
Figura 44. Presencia de cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas (corte paradermal) de las hojas de <i>Thalassia testudinum</i> .	124
Figura 45. Cristal de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas de las hojas de <i>Thalassia testudinum</i> .	125
Figura 46. Presencia de cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas (corte paradermal) de las hojas de <i>Thalassia testudinum</i> , colectadas en la pradera A.	125
Figura 47. Cortes transversales de las hojas de <i>Thalassia testudinum</i> (a) y <i>Syringodium filiforme</i> (b, c), describiendo las diferencias en su anatomía interna.	126
Figura 48. Protoplastos de a) <i>Thalassia testudinum</i> , b) <i>Syringodium filiforme</i> .	127
Figura 49. Comparación de la variabilidad de la eficiencia de absorción de luz de la clorofila a de los protoplastos de <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i> .	128
Figura 50. Comparación de la variabilidad de la eficiencia de absorción de luz de la clorofila a de los protoplastos de <i>T. testudinum</i> y <i>S. filiforme</i> versus el tejido foliar pluricelular de <i>T. testudinum</i> .	130
Figura 51. Forma y tamaño de los cristales de oxalato de calcio dentro de las células epidérmicas del pasto marino <i>Thalassia testudinum</i> , reportado por	135

Dobbs *et al.*, 2004.

Figura 52. Modelo de la variación morfológica de las hojas de *T. testudinum*.

144

11.2 Lista de Tablas.

Tabla 1. Características morfológicas de las praderas seleccionadas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos.	24
Tabla 2. Características de las hojas blanqueadas y su valor de absorptancia.	32
Tabla 3. Valores de correlación de Pearson en función de la sección transversal de pigmentos (pigmentos por unidad de área).	44
Tabla 4. Valores de correlación de Pearson en función de la capacidad de absorción de luz o absorptancia.	46
Tabla 5. Probabilidades asociadas a la densidad de pigmentos [$mg\ m^{-2}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	80
Tabla 6. Probabilidades asociadas al cociente carotenoides / clorofila <i>a</i> , de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	82
Tabla 7. Probabilidades asociadas a la razón molar <i>a</i> / <i>b</i> , de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	83
Tabla 8. Probabilidades asociadas a la absorptancia [%], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	84
Tabla 9. Probabilidades asociadas al coeficiente específico de absorción [$m^{-2}\ mg^{-1}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	86
Tabla 10. Probabilidades asociadas al grosor de hoja [μm], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	87
Tabla 11. Probabilidades asociadas al grosor de epidermis [μm], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	89
Tabla 12. Probabilidades asociadas al área específica [$cm^2\ gPS^{-1}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	91
Tabla 13. Probabilidades asociadas a la densidad de hoja [$mg\ cm^{-3}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	94
Tabla 14. Probabilidades asociadas a la concentración de pigmentos [$\mu g\ cm^{-3}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.	95

Tabla 15. Probabilidades asociadas al del contenido de pigmentos [$mg\ gPS^{-1}$], de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. 97

Tabla 16. Descriptores morfológicos de los protoplastos (células sin pared celular) de *T. testudinum* y *S. filiforme*. 127

11.3 Método de extracción de protoplastos (preparación de reactivos).

Solución antioxidante.

Acido ascórbico 0.1M

Medio pre-plasmólisis estéril.

Se diluyó Sorbitol (7.28g) en agua de mar estéril a 35.5% (100ml) y se ajustó el pH a 7.8. Posteriormente, se adicionó Cloruro de Calcio (CaCl_2 , 0.0555g). La mezcla se esterilizó en autoclave (Yamato SE 300) durante 20 minutos a 121°C.

Preparación de la mezcla de enzimas.

Se diluyó Sorbitol (3.06g) en 42ml de agua de mar (Sea salts) estéril a 36% y se ajustó el pH a 5.8. Posteriormente, se agregó celulasa (1%), pectinasa (1.5%) y hemicelulasa (0.5%).

Solución de lavado.

Se diluyó Sorbitol (10.92g) en 195ml de agua de mar natural filtrada y esterilizada, se ajustó el pH a 7.8 y en seguida se adicionó Cloruro de Calcio (CaCl_2 , 0.222g) y Sacarosa (6g).

Gradiente de Ficoll.

Se preparó un gradiente de 0, 30 y 35% de Ficoll diluidos en solución de lavado.

Todos los reactivos empleados en la extracción de protoplastos son productos de la Compañía Sigma-Aldrich, excepto el ácido ascórbico que es de Baker.