

Effect of solar and artificial UV radiation on photosynthetic performance and carbonic anhydrase activity in intertidal macroalgae from southern Spain

Efecto de la radiación UV solar y artificial sobre la fotosíntesis y la actividad anhidrasa carbónica en macroalgas intermareales del sur de España

B Viñecla¹, F López-Figueroa²

¹ Ecology Area, Department of Plant Biology, Animal Biology and Ecology, University of Jaén, Faculty of Experimental Sciences (B3-158), Campus Las Lagunillas s/n, E-23071, Jaén, Spain. * E-mail: bvinecla@ujaen.es

² Ecology Area, Department of Ecology and Geology, University of Málaga, Faculty of Sciences, Campus Universitario de Teatinos s/n, E-29071, Málaga, Spain.

Abstract

The effect of UV radiation on photosynthetic rate and carbon uptake, estimated as carbonic anhydrase activity, was studied by incubating intertidal algae, *Fucus spiralis* (Phaeophyta) and *Ulva olivascens* (Chlorophyta), under both artificial and solar radiation. In these experiments, treatments excluding UV-B or UV-A + UV-B radiations were applied. Thalli of *U. olivascens* and *F. spiralis* showed completely different responses when exposed to artificial radiation and three different light treatments (PAR + UV-A + UV-B, PAR + UV-A, and only PAR). After exposure for 24 h, photosynthetic activity increased in *F. spiralis*, although the presence of UV-B slightly reduced the increase, whereas *U. olivascens* showed an inverse pattern, with decreasing photosynthetic rates in all the treatments and with the lowest decrease in the presence of UV-B radiation. Surprisingly, the presence of UV-B stimulated carbon uptake, though this effect was more clear in the case of *F. spiralis*, while a similar inhibitory effect of UV-A radiation was found in both species. Thalli of *U. olivascens* and *F. spiralis* were also exposed to solar radiation for daily and yearly periods. The photosynthetic rate was coupled to incident irradiance in *F. spiralis*, whereas in *U. olivascens* a significant decrease in the presence of both UV-A or UV-A + UV-B was found. A significant increase of carbon uptake in the presence of UV-B radiation was observed in *U. olivascens*, while no clear pattern was found in *F. spiralis* under any of the light treatments. During an annual cycle, carbon uptake in *U. olivascens* decreased in winter, compared with the initial levels, in the PAR and PAR + UV-A treatments. The high level of carbon uptake was maintained until the end of spring, when higher levels of incident energy might promote photoinhibition (in the presence of UV-B). The absence of a general response to UV radiation in the macroalgae studied may be due to their different photoprotection mechanisms, physiological-morphological characteristics, and acclimation to environmental conditions.

Key words: carbon uptake, carbonic anhydrase activity, intertidal macroalgae, photoinhibition, UV radiation.

Resumen

En este trabajo se estudió el efecto de la radiación UV sobre la tasa de fotosíntesis y la incorporación de C, estimada mediante la actividad anhidrasa carbónica, incubando algas intermareales, i.e., *Fucus spiralis* (Phaeophyta) y *Ulva olivascens* (Chlorophyta), bajo radiación solar y artificial. En los experimentos se aplicaron tratamientos de exclusión de la radiación UV-B o UV-A + UV-B. Los talos de *U. olivascens* y *F. spiralis* mostraron respuestas completamente diferentes cuando se expusieron a radiación artificial y tres tratamientos de luz (PAR + UV-A + UV-B, PAR + UV-A y sólo PAR). La tasa de fotosíntesis aumentó en *F. spiralis* tras 24 h de exposición aunque en presencia de radiación UV-B el aumento fue un poco menor. Por otro lado, *U. olivascens* mostró el patrón contrario, con un descenso de las tasas de fotosíntesis en todos los tratamientos aunque éste fue menor en presencia de radiación UV-B. Por el contrario, la incorporación de C se vio estimulada en presencia de UV-B, siendo este efecto más claro en el caso de *F. spiralis* mientras que, en presencia de radiación UV-A, se dio un efecto inhibitorio similar en ambas especies. También se expusieron talos de *U. olivascens* y *F. spiralis* a radiación solar en periodos diarios y anuales. Existió un acoplamiento de la tasa de fotosíntesis con la irradiancia incidente en *F. spiralis*, mientras que en *U. olivascens* se dio un descenso en presencia de radiación UV-A o UV-A + UV-B. En *U. olivascens* se observó un incremento significativo de la incorporación de C pero no se encontró un patrón claro en ninguno de los tratamientos de luz en *F. spiralis*. Durante un ciclo anual la incorporación de C en *U. olivascens* disminuyó en comparación con los valores iniciales en los tratamientos PAR y PAR + UV-A durante el invierno. Los altos valores de incorporación de C se mantuvieron hasta el final de la primavera cuando los elevados niveles de energía incidente podrían estimular la fotoinhibición en presencia de UV-B. La ausencia de una respuesta general a la radiación UV en las microalgas estudiadas podría deberse a sus diferentes mecanismos de fotoprotección, a sus características fisiológicas-morfológicas y a su aclimatación a las condiciones ambientales particulares.

Palabras clave: actividad anhidrasa carbónica, fotoinhibición, incorporación de C, macroalgas intermareales, radiación UV.

Introduction

Light is the main environmental factor controlling the physiological performance of macroalgae, both as source of energy and as environmental light signal (Häder and Figueroa 1997). Photosynthetic active radiation (PAR) supplies energy for nutrient uptake and carbon assimilation through photosynthesis. Specific wavelengths in the PAR and UV regions of the spectrum are environmental signals for many of these processes through the action of photomorphogenic photoreceptors (Rüdiger and López-Figueroa 1992, Dring *et al.* 1996, Gordillo *et al.* 2004). The role of UV-B, UV-A, blue, green, and red/far-red photoreceptors, involved in the control of nutrient assimilation (i.e., nitrogen incorporation), has been reported in algae (Quiñones and Aparicio 1990, Rüdiger and López-Figueroa 1992, Döhler *et al.* 1995, Braune and Döhler 1996). Nevertheless, research on the control of light quality on carbonic anhydrase activity, including UV radiation, is scarce (Gómez *et al.* 1998, Flores-Moya *et al.* 1998, Figueroa and Viñegla 2001, Viñegla *et al.* 2006).

Light shows strong fluctuations in both quantity and spectral quality (Kirk 1976, Häder and Figueroa 1997, Villafañe *et al.* 2003). In particular, UV radiation has been described as the promoter of several processes in macroalgae, such as altering pigment content (Figueroa *et al.* 1997, 2003b), the accumulation of photoprotecting pigments (Gómez *et al.* 1998, Karsten *et al.* 1999, Korbee *et al.* 2005), changing mobility and orientation patterns (Gerber and Häder 1993), and inhibiting growth (Altamirano *et al.* 2000a, b, 2003; Bañares *et al.* 2002). The increase in UV radiation as a consequence of stratospheric ozone layer depletion (Frederick *et al.* 1993) has subjected macroalgae to higher light stress, especially in midlittoral ecosystems (Häder and Figueroa 1997, Bischof *et al.* 2006). Several negative effects have been associated with UV radiation, including thymine formation in DNA (van de Poll *et al.* 2001, Roleda *et al.* 2006), photoinhibition of photosynthesis (Flores-Moya *et al.* 1998), and inhibition of nutrient uptake (Döhler *et al.* 1995). On the other hand, UV-B radiation can also have positive effects on photosynthesis in marine macrophytes well-acclimated to high irradiances (Flores-Moya *et al.* 1999, Figueroa *et al.* 2002) and on inorganic nitrogen uptake (Kumar *et al.* 1996).

In intertidal macroalgae, the relationship of carbon concentration mechanisms with light energy availability has been previously proposed, but not with inorganic carbon availability (Mercado *et al.* 1998). The interaction between both factors can lead to acclimation mechanisms of the photosynthetic apparatus that may have indirect effects on carbon concentration mechanisms (Mercado *et al.* 1998) and other physiological processes like nitrogen assimilation (Viñegla *et al.* 2006). In this sense, intertidal algae under moderate desiccation conditions present higher photosynthetic rates (Mercado *et al.* 1998) and carbon uptake (Flores-Moya *et al.* 1998). In any case, their

Introducción

La luz es el principal factor ambiental que controla la actividad fisiológica de las macroalgas, tanto como fuente de energía como señal lumínica (Häder y Figueroa 1997). La radiación fotosintéticamente activa (PAR) provee de energía para la incorporación de nutrientes y la asimilación de carbono a través de la fotosíntesis. Por otro lado, longitudes de onda específicas en las regiones de PAR y UV del espectro representan señales ambientales para muchos de estos procesos mediante la acción de fotorreceptores fotomorfogénicos (Rüdiger y López-Figueroa 1992, Dring *et al.* 1996, Gordillo *et al.* 2004). Diferentes autores han mostrado en algas el papel de los fotorreceptores de radiación UV-B, UV-A, azul, verde y rojo/rojo lejano, involucrados en el control de la asimilación de nutrientes, i.e., incorporación de nitrógeno (Quiñones y Aparicio 1990, Rüdiger y López-Figueroa 1992, Döhler *et al.* 1995, Braune y Döhler 1996). Sin embargo, existen pocos trabajos que aborden el control de la calidad de luz sobre la actividad anhidrasa carbónica (Gómez *et al.* 1998, Flores-Moya *et al.* 1998, Figueroa y Viñegla 2001, Viñegla *et al.* 2006).

La luz muestra grandes fluctuaciones en su cantidad y su calidad espectral (Kirk 1976, Häder y Figueroa 1997, Villafañe *et al.* 2003). En especial se ha descrito a la radiación UV como la que estimula diferentes procesos en microalgas como la alteración del contenido pigmentario (Figueroa *et al.* 1997, 2003b), la acumulación de pigmentos fotoprotectores (Gómez *et al.* 1998, Karsten *et al.* 1999, Korbee *et al.* 2005), cambios en los patrones de movilidad y orientación (Gerber y Häder 1993) o la inhibición del crecimiento (Altamirano *et al.* 2000a, b, 2003; Bañares *et al.* 2002). El aumento de la radiación UV como consecuencia de la disminución del grosor de la capa de ozono estratosférico (Frederick *et al.* 1993) ha sometido a las microalgas a un mayor estrés lumínico, especialmente en ecosistemas semilitorales (Häder y Figueroa 1997, Bischof *et al.* 2006). Se han descrito numerosos efectos negativos de la radiación UV, como la formación de dímeros de timina en el ADN (van de Poll *et al.* 2001, Roleda *et al.* 2006), la fotoinhibición de la fotosíntesis (Flores-Moya *et al.* 1998) o la inhibición de la incorporación de nutrientes (Döhler *et al.* 1995). Por otro lado, la radiación UV-B puede tener efectos positivos sobre la fotosíntesis de macrófitos marinos aclimatados a alta irradiancia (Flores-Moya *et al.* 1999, Figueroa *et al.* 2002) y sobre la incorporación de N inorgánico (Kumar *et al.* 1996).

Ya antes se ha propuesto la relación de los mecanismos de concentración de carbono con la disponibilidad de energía lumínica en microalgas intermareales, aunque no con la disponibilidad de carbono inorgánico (Mercado *et al.* 1998). La interacción entre ambos factores puede dar lugar a mecanismos de aclimatación del aparato fotosintético que pueden tener efectos indirectos sobre los mecanismos de concentración de carbono (Mercado *et al.* 1998) y otros procesos fisiológicos como la asimilación de N (Viñegla *et al.* 2006). En este sentido, las algas intermareales bajo condiciones de desecación moderada presentan mayores tasas fotosintéticas (Mercado *et al.* 1998) y

position on the coast implies that they will be subjected to higher levels of UV radiation with possible consequences on photoinhibition of photosynthesis or carbon uptake.

In this study, two intertidal macroalgae were exposed to artificial and natural radiation, and the short-term (24 h of continuous light or a daily cycle of solar radiation) and long-term (annual cycle under solar radiation) responses are discussed.

Material and methods

Plant material and preincubation conditions

The experiments presented herein were performed using clean, healthy thalli of the intertidal macroalgae *Fucus spiralis* and *Ulva olivascens*. In all cases the thalli were collected from the intertidal rocky shores of Tarifa in southern Spain (36°00' N, 05°36' W) and immediately transported to the laboratory at 4°C in darkness. In the laboratory, the thalli were preincubated for at least two days in natural aerated seawater at 17°C, under white light at a 12:12 h light:dark photoperiod and an irradiance of 21.7 W m⁻², with light provided by F20 W/CW fluorescent lamps (Osram, Germany).

Light treatments

Independently of the light source applied in every treatment (natural or artificial), the same light-quality treatments were applied in the three experimental setups used in this study: (1) PAR + UV-A + UV-B, hereafter called PAB; (2) PAR + UV-A, hereafter called PA; and (3) only PAR. To achieve these light treatments, different UV cut-off filters were located over the culture devices during the incubations as described by Figueroa *et al.* (1997): (1) Ultraphan 295 (Digefta GmbH, Germany), which excludes UV-C and provides the PAB treatment; (2) Folex 320 (Folex GmbH, Germany), which excludes UV-C and UV-B radiations, and provides the PA treatment; and (3) Ultraphan 395 (Digefta GmbH, Germany), which excludes UV-A, UV-B, and UV-C radiations, and provides the PAR treatment.

Irradiance under the different light treatments was measured using a Licor-1800 UW spectroradiometer (LiCor Inc., USA), equipped with a cosine-corrected planar sensor (2 π).

Carbon metabolism under short-term artificial radiation

Both algae (70–80 mg individual thallus for a total biomass of 50 g fresh weight) were acclimated for three days in 0.5-L, UV-opaque aerated aquaria with filtered natural seawater at 17°C and dim light conditions. After the acclimation period, the thalli were exposed for 24 h to artificial radiation. Photosynthetic active radiation (PAR, $\lambda = 400\text{--}700$ nm) was provided by True Light Plus lamps (DuroTest, USA), while UV-A ($\lambda = 315\text{--}400$ nm) and UV-B ($\lambda = 280\text{--}315$ nm)

de incorporación de carbono (Flores-Moya *et al.* 1998). En cualquier caso, su posición en la costa implica que se verán sometidas a mayores niveles de radiación UV, con posibles consecuencias en la fotoinhibición de la fotosíntesis o la incorporación de C.

En este trabajo se discuten las diferentes respuestas de *Fucus spiralis* L (Phaeophytae) y *Ulva olivascens* Dangeard (Chlorophytae) a la exposición a radiación artificial y natural, a corto (24 horas de luz continua o un ciclo diario de radiación solar) y largo plazo (ciclo anual bajo radiación solar).

Material y métodos

Material vegetal y condiciones de pre-incubación

Los experimentos presentados en este trabajo fueron realizados con talos sanos y limpios de las microalgas intermareales *Fucus spiralis* y *Ulva olivascens*. En todos los casos los talos fueron recogidos en la costa rocosa intermareal de Tarifa (sur de España) (36°00' N, 05°36' O) y transportados inmediatamente al laboratorio a 4°C y en oscuridad. En el laboratorio los talos fueron preincubados durante al menos dos días en agua de mar natural con aireación a 17°C, bajo luz blanca, con un fotoperiodo luz:oscuridad de 12:12 horas y una irradiancia de 21.7 W m⁻². La luz provenía de una lámpara fluorescente F20 W/CW (Osram, Alemania).

Tratamientos de luz

Independientemente de la fuente de luz aplicada en cada tratamiento (natural o artificial), se usaron los mismos tratamientos de calidad de luz en los sistemas experimentales empleados en este trabajo: (1) PAR + UV-A + UV-B, denominado PAB a partir de aquí; (2) PAR + UV-A, en adelante PA, y (3) sólo PAR. Para aplicar estos tratamientos de luz se situaron diferentes filtros que eliminan UV sobre los cultivos durante la incubación como lo han descrito Figueroa *et al.* (1997). Así, se emplearon: (1) un filtro Ultraphan 295 (Digefta GmbH, Alemania), que excluye la radiación UV-C, para lograr el tratamiento PAB, (2) un filtro Folex 320 (Folex GmbH, Alemania), que excluye UV-C y UV-B, para lograr el tratamiento PA, y (3) un filtro Ultraphan 395 (Digefta GmbH, Alemania), que excluye las radiaciones UV-A, UV-B y UV-C, para lograr el tratamiento PAR.

La irradiancia de los tratamientos de luz se midió con un espectrorradiómetro Licor-1800 UW (LiCor Inc., EE.UU.) equipado con un sensor plano con corrección de coseno (2 π).

Metabolismo del C bajo radiación artificial a corto plazo

Se aclimataron algas de las dos especies (70-80 mg por talo individual para una biomasa total de 50 g de peso fresco) durante tres días en acuarios opacos a UV con 0.5 L de agua de mar natural filtrada y con aireación. Las condiciones de cultivo fueron de 17°C de temperatura y luz tenue. Tras el periodo de

Table 1. Irradiance levels ($W m^{-2}$) and light doses ($kJ m^{-2}$) applied in the different experiments: (a) incubation under artificial radiation, (b) incubation under short-term solar radiation (June 1997), and (c) incubation under long-term solar radiation.

Tabla 1. Niveles de irradiancia ($W m^{-2}$) y dosis lumínica ($kJ m^{-2}$) aplicados en los diferentes experimentos presentados en este trabajo: (a) incubación bajo radiación artificial, (b) incubación bajo radiación solar a corto plazo (junio de 1997), y (c) incubación bajo radiación solar a largo plazo.

| | PAR (400–700 nm) | UV-A (315–400 nm) | UV-B (280–315 nm) |
|---|------------------|-------------------|-------------------|
| (a) Irradiance ($W m^{-2}$) | 74.26 | 4.29 | 0.54 |
| (b) Daily maximum irradiance ($W m^{-2}$) | 505.30 | 62.80 | 0.70 |
| Daily light dose ($kJ m^{-2}$) | 7508 | 321 | 10.5 |
| (c) Accumulated light dose ($MJ m^{-2}$) | | | |
| July 1997 | 33577 | 5133 | 97.6 |
| September 1997 | 18698 | 3041 | 47.7 |
| November 1997 | 9234 | 1327 | 11.2 |
| January 1998 | 13102 | 1360 | 12.0 |
| March 1998 | 25634 | 3902 | 57.7 |
| May 1998 | 30761 | 4682 | 69.3 |
| July 1998 | 49303 | 7038 | 22.3 |

radiations were provided by Q-Panel 340 (Q-Panel, USA) and TL40 W/12 (Philips, Netherlands) lamps, respectively. Irradiances for the three bands are shown in table 1.

Carbon metabolism under short-term solar radiation (daily cycle)

As described above, ca. 50 g FW of algal material from *F. spiralis* and *U. olivascens* were taken from the preincubation devices and acclimated for three days under solar radiation on the roof of the laboratory. This acclimation period was performed under controlled temperature conditions ($\sim 17^{\circ}C$) in order to avoid the likely effects of high midday temperature under full solar radiation. During this period each experimental set of thalli was covered with one of the cut-off filters, applied at random, in order to acclimate them to the light treatments. After the acclimation period, the physiological performance of the thalli was evaluated during a daily cycle with a 2-h periodicity, from 9:30 to 19:30 local time, in the three light treatments using the cut-off filters: PAB (PAR + UV-A + UV-B radiation), PA (PAR + UV-A radiation), and PAR (exclusion of UV radiation). See table 1 for light irradiance under the PAB, PA, and PAR treatments during the daily cycle.

Carbon metabolism under long-term solar radiation (annual cycle)

To evaluate the effect of solar radiation on the physiological performance of intertidal macroalgae, only *U. olivascens* thalli were used, since *F. spiralis* was not found during the summer season on the rocky shores sampled.

In this case a procedure slightly different from the one performed in the previous experimental setup (short-term solar radiation) was applied. Total carbonic anhydrase, as an

acclimatación, los talos fueron expuestos durante 24 horas a radiación artificial. La radiación fotosintéticamente activa (PAR, $\lambda = 400 - 700$ nm) se aplicó mediante una lámpara True Light Plus (DuroTest, USA), obteniéndose la radiación UV-A ($\lambda = 315 - 400$ nm) y UV-B ($\lambda = 280 - 315$ nm) de lámparas Q-Panel 340 (Q-Panel, USA) y TL40 W/12 (Philips, The Netherlands), respectivamente. Las irradiancias aplicadas en las tres bandas se muestran en la tabla 1.

Metabolismo del C bajo radiación solar a corto plazo (ciclo diario)

Como se describió anteriormente, aproximadamente 50 g de peso fresco de las algas *F. spiralis* y *U. olivascens* se sacaron de los sistemas de pre-incubación y se aclimataron durante tres días bajo radiación solar en el tejado del laboratorio. El periodo de acclimatación se desarrolló en condiciones controladas de temperatura (ca. $17^{\circ}C$) para evitar los efectos de la alta temperatura durante el mediodía bajo radiación solar. Durante este periodo cada sistema experimental de talos fue cubierto con uno de los filtros para eliminar luz, aplicados al azar, para aclimatar los talos a los tratamientos. Tras el periodo de acclimatación se evaluó la actividad fisiológica de los talos durante un ciclo diario con una periodicidad de 2 horas, desde las 9:30 a las 19:30, hora local, en los tres tratamientos aplicados con los filtros de corte: PAB (radiación PAR + UV-A + UV-B), PA (radiación PAR + UV-A) y PAR (exclusión de la radiación UV). En la tabla 1 se muestran los valores de irradiancia en los tratamientos PAB, PA y PAR durante el ciclo diario.

Metabolismo del C bajo radiación solar a largo plazo (ciclo anual)

Para evaluar el efecto de la radiación solar sobre la actividad fotosintética de las macroalgas intermareales sólo se

estimator of the carbon concentrating mechanism, was determined in thalli directly transported from the field to the laboratory, after a short acclimation period (2 h under dim light and 17°C) imposed to get the recovery from that period at 4°C. The rest of the thalli were preincubated in the laboratory as described above and, afterwards, exposed for three days to solar radiation and the three light treatments (PAB, PA, and PAR) on the laboratory roof, at a constant temperature of 17°C in aerated white trays. At the end of the exposure period, total carbonic anhydrase activity was measured at the same time of the day as the non-exposed (initial) samples.

The whole procedure described here was repeated for a whole annual cycle, from July 1997 to July 1998, in order to reveal the dependency of carbon concentration mechanisms on light quality (light treatments) and light dose (seasonal changes in solar irradiance). The light dose received by the thalli in this experiment is summarized in table 1.

Photosynthetic performance (O₂ evolution)

Net photosynthetic rate under saturating irradiance was determined in *F. spiralis* and *U. olivascens* by determining O₂ evolution in several photosynthesis vs irradiance curves. Thalli were exposed in a custom-made transparent Plexiglass chamber (10 mL volume) equipped with a stirrer device and a Clark-type oxygen electrode (YSI 5331, Yellow Springs Inc., USA), at a constant temperature of 17°C. Thalli (0.15 g FW) were incubated for 5 min under increasing irradiances from 0 to 1200 μmol quanta m⁻² s⁻¹. Net photosynthetic rate was determined as the slope of a constant O₂ evolution rate, which was observed after ca. 1–2 min from the shift in irradiance. Dark respiration was determined at the beginning of the procedure by incubating the thalli in darkness for 15 min.

Net photosynthetic rate under saturating irradiance was estimated from the fit of experimental O₂ evolution data vs irradiance according to the equation proposed by Jassby and Platt (1976):

$$\text{GPR} = \text{NPR}_{\text{max}} \times \tanh(\alpha E / \text{NPR}_{\text{max}}) + R_{\text{d}}$$

where GPR is the gross photosynthetic rate, NPR_{max} is the net photosynthetic rate under saturating irradiance, tanh is the hyperbolic tangent function, α is the photosynthetic efficiency, E is the incubation irradiance, and R_d is the respiration rate in darkness.

Relative electron transport rate (in vivo fluorescence parameters)

Relative electron transport rate (rETR) is a non-intrusive indirect estimator of photosynthetic performance (Büchel and Wilhelm 1993), and it is a good alternative to electron transport rate when it is difficult to calculate the absorbance of the

emplearon talos de *U. olivascens*, ya que no se encontraron talos de *F. spiralis* durante el periodo de verano en la costa rocosa en que se realizaron los muestreos.

En este caso se empleó un procedimiento ligeramente distinto al aplicado en el sistema experimental descrito anteriormente, a corto plazo bajo radiación solar. Así, la actividad anhidrasa carbónica total, considerada como un estimador del mecanismo de concentración de carbono, se determinó en talos directamente transportados desde la costa al laboratorio, inmediatamente después de un corto periodo de aclimatación (2 horas bajo luz tenue y 17°C) aplicado para permitir la recuperación de los talos del periodo a 4°C. El resto de los talos se pre-incubaron en el laboratorio como ya se ha descrito y, a continuación, se expusieron durante tres días a radiación solar y a los tres tratamientos de luz (PAB, PA y PAR) en el tejado del laboratorio, a una temperatura constante de 17°C en bandejas blancas con aeración. Al final del periodo de exposición se determinó la actividad anhidrasa carbónica en el mismo momento del día que en los talos no expuestos (iniciales).

Este procedimiento se repitió durante un ciclo anual completo, de julio 1997 a julio 1998, para poner de manifiesto la dependencia de los mecanismos de concentración de carbono respecto a la calidad (tratamientos de luz) y la dosis de luz (variaciones estacionales de la radiación solar). En la tabla 1 se muestran los valores de la dosis de luz recibida por los talos en este experimento.

Actividad fotosintética (evolución de O₂)

El valor de la tasa neta de fotosíntesis en condiciones de luz saturante se determinó en talos de *F. spiralis* y *U. olivascens* mediante la medida de evolución de O₂ en curvas fotosíntesis vs irradiancia. Los talos fueron expuestos a las diferentes irradiancias en una cámara de Plexiglas transparente hecha a medida (10 mL de volumen), equipada con agitación magnética y un electrodo de oxígeno tipo Clark YSI 5331 (Yellow Springs Inc., EE.UU.), a una temperatura constante de 17°C. Se incubaron 0.15 g de peso fresco durante 5 minutos en cada una de las irradiancias empleadas, de 0 a 1200 μmol de fotones m⁻² s⁻¹. La tasa neta de fotosíntesis se determinó como la pendiente de una tasa constante de evolución de O₂, alcanzada tras ca. 1–2 minutos desde el cambio de irradiancia. La respiración en oscuridad se determinó al comienzo del procedimiento incubando los talos en oscuridad durante 15 minutos.

Finalmente, la tasa neta de fotosíntesis bajo irradiancia saturante fue estimada a partir del ajuste de los datos experimentales de evolución de O₂ vs irradiancia, de acuerdo con la ecuación propuesta por Jassby y Platt (1976):

$$\text{TFB} = \text{TFN}_{\text{max}} \times \tanh(\alpha E / \text{TFN}_{\text{max}}) + R_{\text{d}}$$

donde TFB es la tasa de fotosíntesis bruta, TFN_{max} es la tasa de fotosíntesis neta bajo irradiancia saturante, tanh es la función tangente hiperbólica, α es la eficiencia fotosintética, E la

thalli. For the determination of rETR, *in vivo* induced chlorophyll *a* fluorescence of photosystem II was measured using a pulse amplitude modulated fluorometer PAM-2000 (Waltz GmbH, Germany), according to Schreiber *et al.* (1995), and rETR expressed as:

$$rETR = \Delta F/Fm' \times E \times 0.5$$

where $\Delta F/Fm'$ is the effective quantum yield of fluorescence of photosystem II and E is the incident irradiance. $\Delta F/Fm'$ was determined *in situ* under the incubation irradiance and calculated according to Krause and Weis (1991):

$$\Delta F/Fm' = (Fm' - Ft) / Fm'$$

where ΔF is the difference between Fm' , the maximal fluorescence in the light-adapted state, and Ft , the transitory fluorescence level in the excited state under the incubation irradiance, with a number of photosystem II reaction centres in reduced state.

The relation between electron transport rate and gross photosynthesis has been reported previously (Figueroa *et al.* 2003a, Cabello-Pasini and Figueroa 2005).

Total carbonic anhydrase activity

Total carbonic anhydrase (CA) activity was determined using the potentiometric method described by Haglund *et al.* (1992). Small pieces of thalli (ca. 10–20 mg FW) were washed with distilled water and placed in a 3-mL custom-made cuvette in the presence of an assay buffer (50 mM TRIS, 25 mM ascorbic acid, and 5 mM EDTA). The reaction was started by adding 1 mL of ice-cold CO_2 -saturated distilled water to the assay and the time taken for a linear drop in pH in the range of 8.5 to 7.5 was measured. Finally, one unit of relative enzymatic activity was defined as $(t_0/t_c) - 1$, where t_0 and t_c are the time taken for the pH change in the absence and presence of the thallus, respectively.

Statistical analysis

Data from rETR were calculated as the means of six independent measurements from each of three separate thalli. In the case of photosynthetic O_2 evolution and total CA activity, data were obtained from at least three separate thalli in every sampling time.

Data from the different light treatments were compared by a one-way ANOVA, whereas data from the same treatment at different times were compared by a repeated-measures ANOVA. The ANOVAs were followed by a Fisher LSD *post-hoc* test (Sokal and Rohlf 1995). The significance was tested at the $\alpha = 0.01$ level. ANOVA requirements of normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity (Bartlett's F test) were also checked at $\alpha = 0.01$.

irradiancia de incubación (energía incidente) y R_d la tasa de respiración en oscuridad.

Tasa relativa de transporte electrónico (parámetros de fluorescencia *in vivo*)

La tasa relativa de transporte electrónico (rTTE) es un estimador indirecto no destructivo de la actividad fotosintética (Büchel y Wilhelm 1993) y es una buena medida alternativa a la tasa de transporte electrónico cuando es difícil calcular la absorbancia de los talos. Para determinar rTTE se midió la fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II, inducida *in vivo* empleando un fluorímetro de amplitud modulada PAM-2000 (Waltz GmbH, Alemania) de acuerdo con el procedimiento descrito por Schreiber *et al.* (1995), expresando rTTE como:

$$rTTE = \Delta F/Fm' \times E \times 0.5$$

siendo $\Delta F/Fm'$ el rendimiento cuántico efectivo de fluorescencia del fotosistema II y E la irradiancia incidente. $\Delta F/Fm'$ fue determinado *in situ* bajo la irradiancia de incubación y calculado de acuerdo con Krause y Weiss (1991):

$$\Delta F/Fm' = (Fm' - Ft) / Fm'$$

siendo ΔF la diferencia entre Fm' , la fluorescencia máxima en el estado adaptado a luz, y Ft , el nivel transitorio de fluorescencia en el estado excitado bajo la irradiancia de incubación, con un determinado número de centros de reacción del fotosistema II en estado reducido.

La relación entre la tasa de transporte electrónico y la tasa de fotosíntesis bruta ya ha sido descrita en numerosas ocasiones (Figueroa *et al.* 2003a, Cabello-Pasini y Figueroa 2005).

Actividad anhidrasa carbónica total

La actividad anhidrasa carbónica (AC) total fue determinada mediante el método potenciométrico descrito por Haglund *et al.* (1992). Se lavaron pequeños trozos de talo (ca. 10-20 mg peso fresco) con agua destilada y se introdujeron en una cubeta de 3 mL en presencia de un tampón de ensayo (50 mM de TRIS, 25 mM de ácido ascórbico y 5 mM de EDTA). La reacción se inició añadiendo 1 mL de agua destilada a 4°C y saturada en CO_2 al medio de ensayo y midiendo a continuación el tiempo necesario para una caída lineal de pH en el rango de 8.5 a 7.5. Así, una unidad de actividad enzimática relativa (AER) se definió como $(t_0/t_c) - 1$, donde t_0 y t_c son los tiempos necesarios para el cambio de pH en ausencia y presencia del talo, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos de rTTE se calcularon como la media de 6 medidas independientes en tres talos distintos. En el caso de la evolución fotosintética de O_2 y la actividad AC total, los datos

Results

Carbon metabolism under short-term artificial radiation

Although the photosynthetic performance showed values in the same range for *F. spiralis* and *U. olivascens* after incubation for 24 h under artificial radiation, a different pattern was found in the light treatments. An increase in photosynthetic activity was observed in *F. spiralis* after the incubation, reaching a fourfold increase in the PA treatment. The lowest increase was found in the PAB treatment, which suggests an inhibitory effect of UV-B radiation that can be compensated in the presence of UV-A radiation. The opposite was found for *U. olivascens*, since the net photosynthetic rate values were lower, compared with the initial ones, after incubation under artificial radiation. In this case, the presence of UV radiation seems to be necessary to maintain the levels of photosynthetic performance under solar radiation since the values showed a 50% decrease in the PAB treatment, while a 75% and 83% decrease were found in the PA and PAR treatments, respectively.

On the other hand, total CA activity showed a similar pattern for both species although at different ranges of variation. Values of total CA activity were one order of magnitude higher in *F. spiralis* thalli than in those of *U. olivascens* (table 2), which may be reflecting different carbon concentrating mechanisms in both species, according to their distribution in the intertidal zone. After the incubation period under artificial radiation, there was an almost surprising stimulation of total CA activity in both species. In the case of *F. spiralis*, this increase was clearly higher in the PAB treatment, linking this stimulation of carbon uptake with that found for photosynthetic carbon assimilation. In the case of *U. olivascens*, a similar increase was found in the PAB and PAR treatments, probably due to the above-mentioned inhibition of photosynthetic activity.

Carbon metabolism under short-term solar radiation (daily cycle)

As described above, under artificial radiation a different response was found in both *F. spiralis* and *U. olivascens* when considering photosynthetic activity estimated from electron transport. Thus, rETR trends during the daily cycle in the three light treatments were coupled to incident irradiance in *F. spiralis* (fig. 1a), with significantly higher values around midday, compared with values from the initial and final periods of the day. This pattern was common for the three light treatments, since no significant differences were found among them for any moment of the day. Only marginal but not significant differences were found in the PA treatment at midday, showing slightly lower values compared with the PAB and PAR treatments. In *U. olivascens*, however, a significant decrease ($P < 0.01$) was found at 13:30 in the PA treatment and at 15:30 in

se obtuvieron de tres talos diferentes en cada momento de muestreo.

Los datos de los tratamientos de luz fueron comparados mediante un análisis de varianza de una vía, mientras que los datos del mismo tratamiento en diferentes momentos del tiempo se compararon mediante un análisis de la varianza de medidas repetidas. Tras los análisis de la varianza se aplicó a los datos la prueba *a posteriori* LSD de Fisher (Sokal y Rolf 1995). La significancia se comprobó a un nivel de $\alpha = 0.01$. Los requerimientos de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (test F de Bartlett) también fueron comprobados a un nivel de significancia $\alpha = 0.01$.

Resultados

Metabolismo del C bajo radiación artificial a corto plazo

A pesar de que la actividad fotosintética mostró valores en un rango similar para *F. spiralis* y *U. olivascens* tras la incubación durante 24 horas bajo radiación artificial, se encontró un patrón diferente bajo los tratamientos de luz. Tras el periodo de incubación se dio un aumento de la tasa de fotosíntesis en *F. spiralis*, alcanzando un valor cuatro veces mayor en el tratamiento PA. El menor incremento se encontró en el tratamiento PAB, lo que sugiere un efecto inhibitorio de la radiación UV-B que puede ser compensado en presencia de radiación UV-A. Sin embargo, en *U. olivascens* se encontró el patrón contrario, con menores tasas netas de fotosíntesis tras la incubación en comparación con las iniciales. En este caso, la presencia de radiación UV parece ser necesaria para mantener los niveles de actividad fotosintética bajo radiación solar, ya que se encontró un descenso del 50% en el tratamiento PAB mientras que en los tratamientos PA y PAR se dio un descenso de 75 y 83%, respectivamente.

Por otro lado, la actividad AC total mostró un patrón similar en ambas especies aunque en diferentes rangos de variación. En este sentido, los valores de actividad AC total fueron un orden de magnitud mayor en los talos de *F. spiralis* que en los de *U. olivascens* (tabla 2), lo que puede estar reflejando los diferentes mecanismos de concentración de carbono de ambas especies de acuerdo con su distribución en la zona intermareal. Después del periodo de incubación bajo radiación artificial se dio un aumento de la actividad AC total en ambas especies. Este aumento fue claramente mayor en el tratamiento PAB en el caso de *F. spiralis*, lo que permite relacionar esta estimulación de la incorporación de C con la encontrada para la asimilación fotosintética de C. En el caso de *U. olivascens* se dio un aumento similar en los tratamientos PAB y PAR, probablemente relacionado con la inhibición de la actividad fotosintética antes mencionada.

Metabolismo del C bajo radiación solar a corto plazo (ciclo diario)

Como se describió anteriormente bajo radiación artificial, al estimar la actividad fotosintética mediante la tasa de

Table 2. Net photosynthetic rate and total carbonic anhydrase (CA) activity determined in *Fucus spiralis* and *Ulva olivascens* before and after 24 h of exposure to artificial radiation and three light treatments: PAR + UV-A + UV-B (PAB); PAR + UV-A (PA); and only PAR, with exclusion of the UV band (PAR). Different letters in the same row indicate significant differences among the initial values and those measured after 24 h under the light treatments (one-way ANOVA and Fisher LSD *post-hoc* test, $P < 0.01$). Values in parentheses indicate the standard deviation of the data ($n = 3$ in all the cases).

Tabla 2. Tasa de fotosíntesis neta y actividad anhidrasa carbónica (AC) total determinadas en *Fucus spiralis* y *Ulva olivascens*, inicialmente y tras 24 h de exposición a radiación artificial y tres tratamientos de luz: PAR + UV-A + UV-B (PAB); PAR + UV-A (PA); y sólo PAR, con exclusión de la radiación UV (PAR). Diferentes letras en el mismo renglón indican diferencias significativas entre los valores iniciales y los medidos tras 24 h de exposición a los tratamientos de luz (ANOVA de una vía y prueba *a posteriori* LSD de Fisher, $P < 0.01$). Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar de los datos (en todos los casos $n = 3$).

| | Initial | 24-h exposure | | |
|---|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | PAB | PA | PAR |
| <i>Fucus spiralis</i> | | | | |
| Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 25.0 ^a (5.2) | 42.4 ^b (3.7) | 110.4 ^d (1.5) | 85.3 ^c (0.1) |
| Total CA activity (REA g^{-1} FW) | 255.2 ^a (132.6) | 682.5 ^b (0.9) | 186.5 ^a (10.4) | 329.2 ^a (83.7) |
| <i>Ulva olivascens</i> | | | | |
| Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol O}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) | 69.7 ^a (0.3) | 33.5 ^b (10.3) | 17.7 ^d (0.0) | 12.6 ^c (3.0) |
| Total CA activity (REA g^{-1} FW) | 16.8 ^a (4.1) | 91.7 ^b (54.5) | 18.5 ^a (5.3) | 95.3 ^b (12.8) |

the PAB treatment when compared to previous values around 11:30 (fig. 1b). This decrease was not completely recovered in the PA treatment, but a significant increase, reaching previous values, was found in the PAB treatment. Finally, in the absence of UV radiation (PAR treatment), only a marginal decrease in photosynthetic performance was found at midday.

When considering carbon uptake, no clear effect was found on *F. spiralis* until the end of the day, when a significant increase in total CA activity occurred simultaneously with the final decline in rETR. This increase was almost linear in the PA and PAR treatments, whereas in the PAB treatment a slight decrease was still found in the evening (fig. 2a).

Total CA activity determined in *U. olivascens* thalli showed a significant increase in the three light treatments, although the magnitude and moment when it occurred depended on the treatment (fig. 2b). The highest increase was found in thalli that had been exposed to UV, especially UV-B, radiation. The increase started at 13:00 in the PAB treatment, with levels of around 150 units of relative enzyme activity (REA) g^{-1} FW until 15:30. In the PA treatment, total CA activity only reached ca. 100 REA g^{-1} FW at 15:30. Finally, this level of total CA activity was also found in the PAR treatment, but only at the end of the day, at around 17:30.

To determine the possible coupling processes between energy transfer during the photosynthetic process and carbon uptake due to CA activity, a Pearson correlation coefficient was calculated between rETR and total CA activity data from the daily cycles, in the three light treatments and both species. While no significant correlation was found for *U. olivascens* in the PAB, PA, and PAR treatments, significant negative correlations were found for *F. spiralis* thalli in the PA and PAR treatments (PA: $r = -0.63$, PAR: $r = -0.51$, $P < 0.01$), whereas no significant correlation could be calculated in the PAB treatment.

transporte electrónico se encontró una respuesta diferente en *F. spiralis* y *U. olivascens*. Así, la evolución de la rTTE a lo largo del ciclo diario en los tres tratamientos de luz estuvo acoplada con la irradiancia incidente en *F. spiralis* (fig. 1a), con valores significativamente mayores en torno al mediodía, en comparación con los valores de los periodos inicial y final del día. Este fue un patrón común para los tres tratamientos de luz, dado que no se encontraron diferencias significativas entre éstos en ningún momento del día. Sólo se encontraron diferencias marginales en torno al mediodía en el tratamiento PA, en el que se encontraron valores ligeramente menores que los hallados en los tratamientos PAB y PAR. Sin embargo, en *U. olivascens* se dieron descensos significativos ($P < 0.01$) a las 13:30 h en el tratamiento PA y a las 15:30 h en el tratamiento PAB, cuando se compararon estos valores con los hallados a las 11:30 h (fig. 1b). Más aún, este descenso no se recuperó completamente en el tratamiento PA, mientras que en el tratamiento PAB sí se dio un aumento significativo, alcanzando los valores previos. Finalmente, en ausencia de radiación UV (tratamiento PAR) sólo se dio un descenso marginal de la actividad fotosintética al mediodía.

En el caso de la incorporación de C no se vio un efecto claro en *F. spiralis* hasta el final del día, cuando se produjo un aumento significativo de la actividad AC total simultáneamente con el descenso final de rTTE. Este incremento fue prácticamente lineal en los tratamientos PA y PAR, mientras que en el tratamiento PAB todavía se produjo un pequeño descenso al final de la tarde (fig. 2a).

Por otro lado, la actividad AC total medida en los talos de *U. olivascens* mostró un incremento significativo en los tres tratamientos de luz aunque su magnitud y el momento en que ocurrió dependió del tratamiento (fig. 2b). Así, el mayor incremento se produjo en talos que habían estado expuestos a radiación UV, especialmente radiación UV-B. Además, el

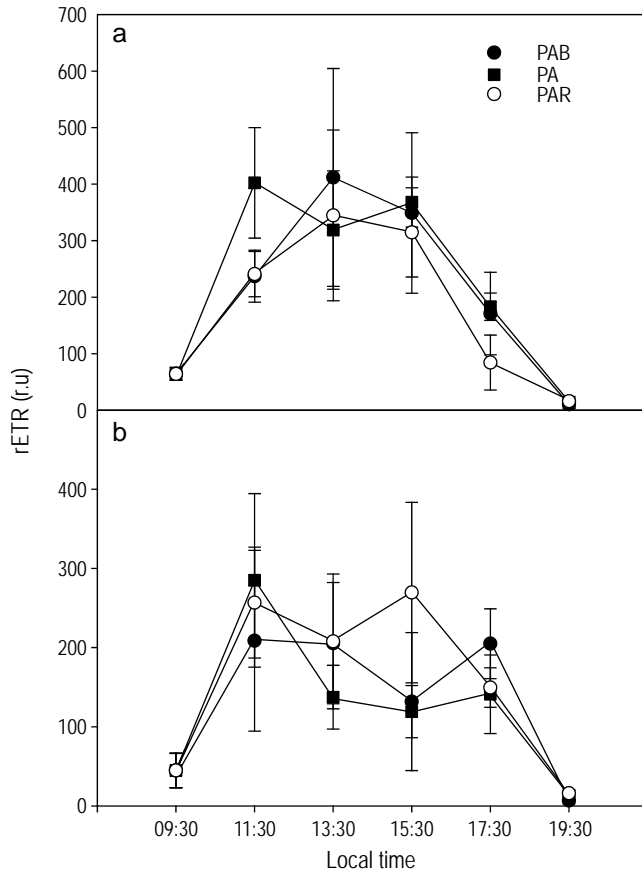


Figure 1. Daily evolution of relative electron transport rate (rETR) in thalli of *Fucus spiralis* (a) and *Ulva olivascens* (b) exposed to solar radiation and three light treatments: PAR + UV-A + UV-B radiation (PAB); PAR + UV-A, with exclusion of UV-B radiation (PA); and only PAR, with exclusion of the whole UV band (PAR). Error bars represent the standard deviation of the data ($n = 18$ for every sampling time).

Figura 1. Evolución diaria de la tasa relativa de transporte electrónico (rTTE) en talos de *Fucus spiralis* (a) y *Ulva olivascens* (b) expuestos a radiación solar y tres tratamientos de luz: radiación PAR + UV-A + UV-B (PAB); PAR + UV-A, con exclusión de radiación UV-B (PA); y sólo PAR, con exclusión de toda la banda de UV (PAR). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos ($n = 18$ para cada momento de medida).

Carbon metabolism under long-term solar radiation (annual cycle)

Carbon uptake in *U. olivascens* thalli showed a clear pattern on a yearly basis. Measurements of CA activity directly in the thalli collected from the field showed that the lowest values of total CA activity were found during the late spring and summer, suggesting that carbon uptake activity can be inhibited by incident irradiance (fig. 3a).

After three days of incubation under solar radiation the highest levels of total CA activity were found in the PAB treatment, especially during the winter season (fig. 3b). Total CA activity in the PAB treatment showed a 59% increase compared with the initial value, whereas a 62% and 72% decrease were found in the PA and PAR treatments, respectively. The high levels of total CA activity in the PAR treatment were

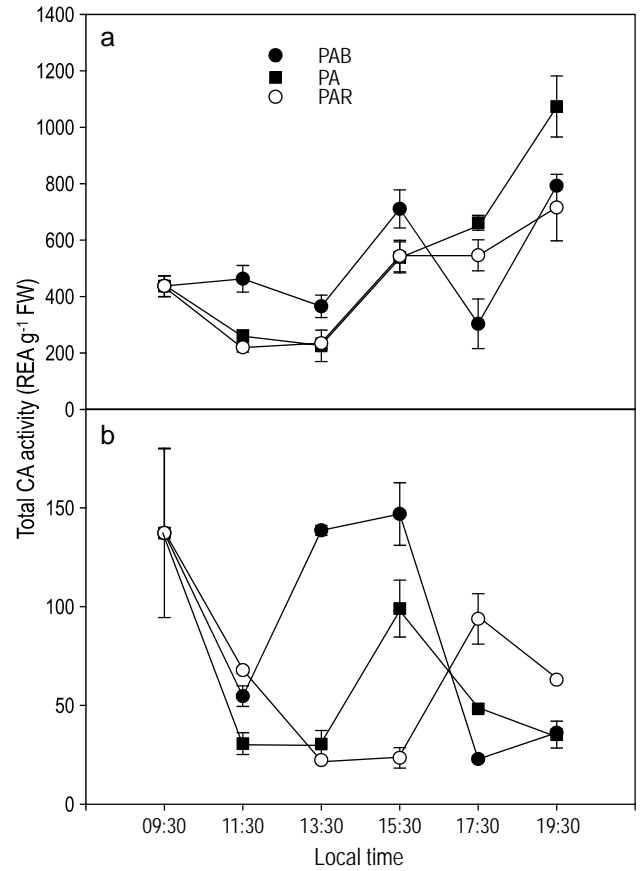


Figure 2. Variations in total carbonic anhydrase (CA) activity determined in *Fucus spiralis* (a) and *Ulva olivascens* (b) during a daily cycle. Thalli were exposed to three light treatments: PAR + UV-A + UV-B (PAB); PAR + UV-A (PA); and only PAR, with exclusion of UV radiation (PAR). The error bars represent the standard deviation of the data ($n = 3$ for every sampling time).

Figura 2. Valores de actividad AC total medidos en *Fucus spiralis* (a) y *Ulva olivascens* (b) durante un ciclo diario. Los talos fueron expuestos a tres tratamientos de luz: PAR + UV-A + UV-B (PAB); PAR + UV-A (PA); y sólo PAR, con exclusión de radiación UV (PAR). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos ($n = 3$ para cada momento de medida).

incremento comenzó a las 13:00 h en el tratamiento PAB con niveles en torno a 150 unidades enzimáticas relativas (UER) g⁻¹ peso fresco hasta las 15:30 h. En el caso del tratamiento PA, la actividad AC total sólo alcanzó 100 UER g⁻¹ peso fresco a las 15:30 h. Finalmente, este nivel de actividad AC total también se encontró en el tratamiento PAR pero sólo al final del día, en torno a las 17:30 h.

Para poner de manifiesto los posibles procesos de acoplamiento entre la transferencia de energía durante el proceso fotosintético y la incorporación de C debida a la actividad AC se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre los datos de rTTE y de actividad AC total del ciclo diario, en los tres tratamientos de luz y las dos especies. Mientras que para los tratamientos PAB, PA o PAR en *U. olivascens* no existió una correlación significativa, si se encontró una correlación negativa significativa para los talos de *F. spiralis* incubados en los tratamientos PA y PAR (PA: $r = -0.63$; PAR: $r = -0.51$; $P <$

maintained until the end of spring. Afterwards, due to the higher levels of incident energy, there most likely is a higher photoinhibition of the photosynthetic activity and subsequent lack of energy for the carbon concentrating mechanism.

The PA and PAR treatments showed a different time pattern. The highest decrease in total CA activity was found during winter, compared with the initial level, as mentioned above, and the highest levels were found at the beginning and end of the summer in the PA and PAR treatments, respectively.

The relationship between total CA activity and light dose during the experimental period is shown in figure 4. The same values of carbon uptake activity as in figure 3 are represented vs the light dose (summing up PAR, UV-A, and UV-B radi-

0.01), pero no fue posible calcular una correlación significativa para el tratamiento PAB.

Metabolismo del C bajo radiación solar a largo plazo (ciclo anual)

La incorporación de carbono en los talos de *U. olivacens* mostró un patrón muy claro durante el ciclo anual. Las medidas realizadas en los talos directamente traídos de la costa mostraron que los menores valores de actividad AC total se dieron al final de la primavera y el verano, lo que sugiere que la actividad de incorporación de C puede ser inhibida por la irradiación incidente (fig. 3a).

Después de los tres días de incubación bajo la radiación solar los mayores niveles de actividad AC total fueron encontrados en el tratamiento PAB, especialmente durante el invierno (fig 3b). Así, en el tratamiento PAB la actividad AC total mostró un 59% de incremento en comparación con el valor inicial mientras que en los tratamientos PA y PAR se encontró un descenso de 62 y 72%, respectivamente.

Los altos niveles de actividad AC total del tratamiento PAR se mantuvieron hasta el final de la primavera. De ahí en adelante, los elevados niveles de energía incidente podrían estar estimulando la fotoinhibición de la actividad fotosintética y la consecuente pérdida de energía para los mecanismos de concentración de carbono.

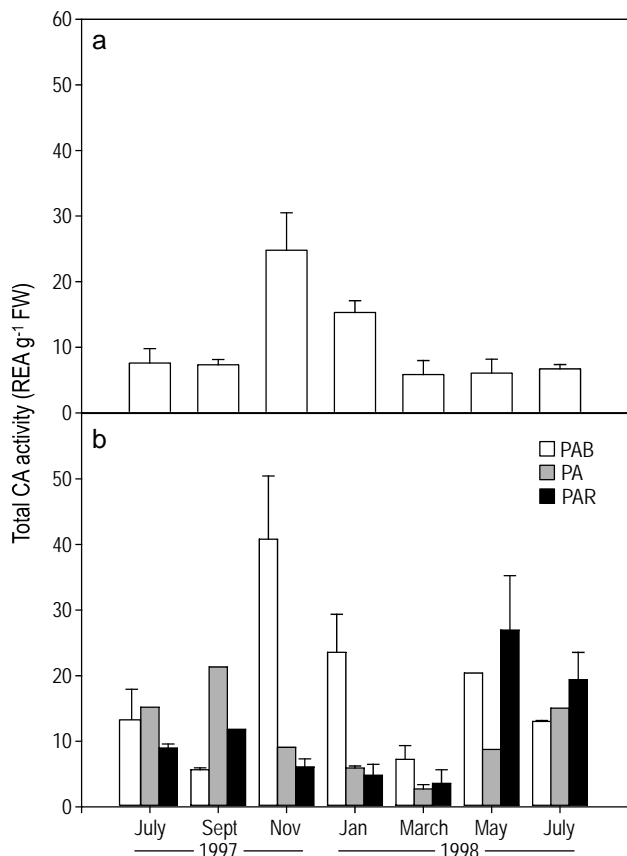


Figure 3. Levels of total carbonic anhydrase (CA) activity determined during a whole year in thalli of *Ulva olivascens* in non-incubated samples (a) and in samples incubated after collection in each season for three days (b) under solar radiation and three light treatments: PAR + UV-A + UVB (PAB); PAR + UV-A (PA); and only PAR, with exclusion of UV radiation (PAR). Error bars represent the standard deviation of the data ($n = 3$ for every sampling time).

Figura 3. Niveles de actividad anhidrasa carbónica (AC) total determinados durante un año completo en talos de *Ulva olivascens*, en muestras no incubadas (a) y en muestras incubadas durante tres días bajo radiación solar (b) y tres tratamientos de luz: PAR + UV-A + UV-B (PAB); PAR + UV-A (PA); y sólo PAR, con exclusión de radiación UV (PAR). Las barras de error indican la desviación estándar de los datos ($n = 3$ para cada momento de medida).

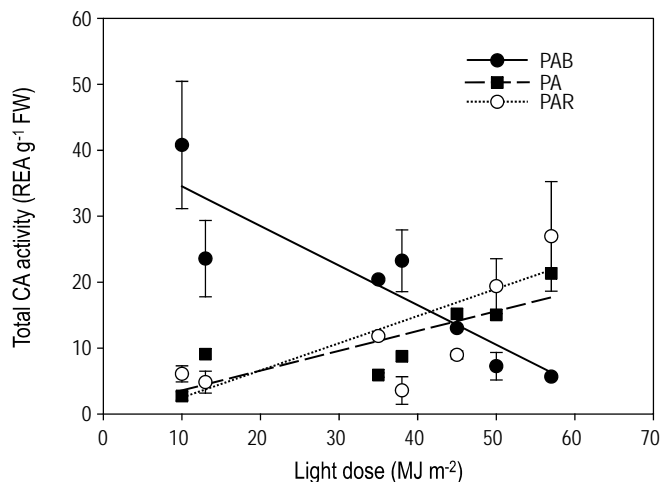


Figure 4. Linear dependency of total carbonic anhydrase (CA) activity, determined in *Ulva olivascens* thalli, on light dose received during three days of exposure to solar radiation and three light treatments: PAR + UV-A + UV-B radiation (PAB), exclusion of UV-B radiation (PA), and exclusion of the UV band (PAR). Error bars represent the standard deviation of the data ($n = 3$ for every sampling time).

Figura 4. Relación lineal entre la actividad anhidrasa carbónica (AC) total medida en talos de *Ulva olivascens* y la dosis de luz recibida durante tres días de exposición a radiación solar y tres tratamientos de luz: radiación PAR + UV-A + UV-B (PAB); con exclusión de UV-B (PA); y con exclusión de la radiación UV (PAR). Las barras de error representan la desviación estándar de los datos ($n = 3$ para cada momento de medida).

tion) received during the three-day period of exposure to solar radiation.

As shown in figure 3, UV-B radiation stimulates total CA activity but only at a low light dose. This stimulating effect is not only dependent on light quality but also on the amount of energy received since at high levels of UV-B radiation a higher inhibition of the activity was found, i.e., a significant and negative linear regression between total CA activity and light dose was observed (table 3). An inverse and almost identical relationship was found for the PA and PAR treatments, where the increase in dose promoted the increase in total CA activity, although not reaching the initial levels observed under UV-B radiation.

Discussion

Carbon nutrient metabolism under artificial radiation

The different responses to UV radiation shown by *F. spiralis* and *U. olivascens* in laboratory conditions can be explained by their acclimation to the natural conditions. The former species is located in the upper part of the intertidal, whereas the latter is located below it, between the lower tidal and subtidal zones. Thus, while *F. spiralis* may be subjected to different cycles of desiccation and rewetting (more or less intense depending on the time of year) and other environmental conditions that can consequently affect C availability (e.g., atmospheric CO₂ during desiccation periods at low tide), inorganic carbon uptake in *U. olivascens* would only depend on the amount of dissolved HCO₃⁻. In order to cope with this variable environment, *F. spiralis* thalli have optimized their carbon uptake mechanisms, particularly those related to external CA activity (Mercado *et al.* 1998), which might explain this different range of activity when compared to *U. olivascens*.

The depth zonation of *F. spiralis* and *U. olivascens* in the natural environment may also explain the different carbon concentrating mechanisms and carbon assimilation processes observed under artificial radiation. Previous ecophysiological studies indicate a good correlation between stress tolerance (i.e., UV radiation) and the vertical distribution of seaweeds (Hanelt 1998). In general, there is a relationship between species sensitivity to solar radiation stress and depth distribution (Maegawa *et al.* 1993, Bischof *et al.* 1998, Gómez *et al.* 2004).

Moreover, the environmental conditions present in the upper tidal zone also imply high irradiance levels during most of the day and during long periods of the year, especially along the southern coast of Spain. One would thus expect *F. spiralis* to have adapted to receive high levels of solar radiation, including the UV fraction. Jiménez *et al.* (1998) have shown that the extent of photoinhibition and recovery in different red macroalgae from southern Spain is related to the previous history of light exposure. Under artificial radiation, the reverse response was found in *F. spiralis* compared with *U. olivascens*, with a general decrease in photosynthetic activity in the latter in all the light treatments, which might be a signal of

Table 3. Pearson correlation coefficient determined between relative electron transport rate and total carbonic anhydrase activity data obtained for thalli of *Fucus spiralis* and *Ulva olivascens* during a daily cycle and three light treatments: PAR + UV-A + UV-B (PAB), PAR + UV-A (PA), and only PAR. Every comparison was performed using 18 data from six sampling moments and three independent measures at each moment (NS: not significant; * significant differences at $P < 0.01$).

Tabla 3. Coeficiente de correlación de Pearson calculado entre la tasa relativa de transporte electrónico (rTTE) y la actividad anhidrasa carbónica total en talos de *Fucus spiralis* y *Ulva olivascens* durante un ciclo diario de incubación y tres tratamientos de luz: PAR + UV-A + UV-B (PAB); PAR + UV-A (PA); y sólo PAR, con exclusión de la radiación UV (PAR). En cada comparación se incluyen 18 datos procedentes de 6 momentos de medida y tres medidas independientes en cada momento de tiempo. (NS: no significativo; *: significativo para una probabilidad $P < 0.01$).

| | Light treatment | | |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | PAB | PA | PAR |
| <i>Fucus spiralis</i> | -0.12 ^{NS} | 0.63* | -0.51* |
| <i>Ulva olivascens</i> | 0.02 ^{NS} | -0.29 ^{NS} | -0.46 ^{NS} |

En los tratamientos PA y PAR se encontró un patrón diferente ya que el mayor descenso de la actividad AC total se encontró durante el invierno, en comparación con los valores iniciales, y los mayores niveles de actividad se encontraron al comienzo y al final del verano en los tratamientos PA y PAR, respectivamente.

En la figura 4 se muestra la relación entre la actividad AC total y la dosis lumínica durante el periodo experimental. Se representan en este caso los valores de la actividad de incorporación de C representados en la figura 3, pero en este caso frente a la dosis de luz (sumando la radiación PAR, UV-A y UV-B) recibida durante el periodo de 3 días de exposición a radiación solar.

De forma similar a lo mostrado en la figura 3, la radiación UV-B estimula la actividad AC total pero únicamente a valores bajos de dosis. Este efecto estimulador no sólo depende de la calidad de luz sino también de la cantidad de energía recibida, ya que a altos niveles de radiación UV-B la inhibición de la actividad fue mayor, i.e., se observó una correlación lineal negativa y significativa entre la actividad AC total y la dosis de luz (tabla 3). Además, se encontró una relación inversa pero prácticamente idéntica en los tratamientos PA y PAR, donde el incremento de la dosis estimuló la actividad AC total, aunque sin alcanzar los valores iniciales observados bajo la radiación UV-B.

Discusión

Metabolismo del C bajo radiación artificial

Las diferentes respuestas encontradas en *F. spiralis* y *U. olivascens* en condiciones de laboratorio pueden ser explicadas por su aclimatación previa a las condiciones naturales. *Fucus spiralis* se localiza en la parte superior del intermareal mientras que *U. olivascens* se sitúa por debajo de la otra especie, entre la

photoinhibition. This inhibitory effect was lower in the presence of UV-B radiation, as has been previously reported by other authors (Bischof *et al.* 2002).

Carbon metabolism under short-term solar radiation (daily cycle)

Daily rhythms of variation in photosynthetic activity have been reported previously (Flores and Herrero 1994, Mori *et al.* 1996). In this study, a general photoinhibitory effect of solar radiation was found at midday, although it was higher in the absence of UV-B radiation (PA and PAR treatments). Bischof *et al.* (2002) have shown that photoinhibition was promoted during daily cycles under solar radiation, although this stimulation was higher in samples incubated under only PAR radiation than under the presence of UV radiation. Considering that in the field the normal situation is the presence of UV radiation and the exclusion of this band is an experimental manipulation, our results show that the presence of UV-B radiation, in a certain range of variation, may act as an environmental signal through which the carbon concentration mechanisms are activated in order to use the energy available during the middle part of the day.

Some authors have also shown that the dynamic photoinhibitory response may be related to acclimation responses to UV radiation (Häder *et al.* 1996, Figueroa *et al.* 1997, Flores-Moya *et al.* 1998, Figueroa *et al.* 2003a). The daily cycles described for *Rissoella verruculosa* (Flores-Moya *et al.* 1998) and *Plocamium cartilagineum* (Viñegla 2000, Figueroa and Viñegla 2001) are similar to those found for *F. spiralis* and *U. olivascens*, respectively. The location of *R. verruculosa* in the intertidal zone is analogous to that of *F. spiralis*, also subject to dry-rewetting cycles during the day. *Plocamium cartilagineum* is usually located in the subtidal zone or inside a rocky refuge, under dim light conditions. Taking into account these analogies, the location of algae in the intertidal zone and their exposure regime under full solar radiation might explain changes in photosynthetic performance.

If the energy generated in the photosynthetic process is coupled with the carbon concentrating mechanisms, the lack of activity during midday may be reflected in CA activity. The opposite must also occur under certain conditions, since the increase in photosynthetic electron transport at midday, dependent on previously assimilated carbon, must be a signal demanding new increases in carbon uptake, as has been previously shown (Viñegla *et al.* 2006). A similar increase in total CA activity in PAB and PA treatments has been shown for *Dasycladus vermicularis* (Gómez *et al.* 1998), as in the case of *U. olivascens*, with no effect of PAR radiation on the activity. This again suggests that the UV spectral band is an environmental signal that is not so intense in the field and is able to stimulate the activity in *U. olivascens* when exposed to solar radiation. This result is also in agreement with diurnal rhythms previously reported for other macroalgae such as *Ulva fenestrata* (Gao *et al.* 1992) and *Gracilaria tenuistipitata*

zona inferior del intermareal y la zona submareal. Así, mientras que *F. spiralis* puede verse sometida a diferentes ciclos de desecación y rehumedecimiento, más o menos intensos dependiendo de la época del año y otras condiciones ambientales que pueden, por tanto, afectar la disponibilidad de C (e.g., CO₂ atmosférico durante los periodos de desecación en marea baja), la incorporación de C inorgánico en *U. olivascens* podría depender únicamente de la cantidad de HCO₃⁻ disuelto. Para adecuarse a esta variable ambiental, los talos de *F. spiralis* han optimizado sus mecanismos de incorporación de C, particularmente los relacionados con la actividad AC externa (Mercado *et al.* 1998), lo que podría explicar el rango de actividad que presenta en comparación con el de *U. olivascens*.

La zonación respecto a la profundidad de *F. spiralis* y *U. olivascens* en el medio natural podría también explicar los diferentes mecanismos de concentración de C y los procesos de asimilación de C observados bajo radiación artificial. Estudios ecofisiológicos indican que existe una buena correlación entre la tolerancia al estrés, i.e., la radiación UV, y la distribución vertical de las macroalgas (Hanelt 1998). En general, existe una relación entre la sensibilidad de las especies al estrés por radiación solar y la distribución en profundidad (Maegawa *et al.* 1993, Bischof *et al.* 1998, Gómez *et al.* 2004).

Más aún, las condiciones ambientales presentes en la zona superior del intermareal implican también altos niveles de irradiancia durante la mayor parte del día y durante largos periodos del año, especialmente en la costa sur de España. En este sentido, es de esperar que *F. spiralis* esté adaptada a recibir altos niveles de radiación solar, incluyendo la fracción UV. En este sentido, Jiménez *et al.* (1998) han demostrado que los niveles de fotoinhibición y recuperación en diferentes macroalgas del sur de España están relacionados con su historia previa de exposición a la luz. Bajo radiación artificial se encontró una respuesta inversa en *F. spiralis* y *U. olivascens*, con un descenso generalizado en la actividad fotosintética en ésta última en todos los tratamientos de luz, lo que podría ser una señal de fotoinhibición. En cualquier caso, este efecto inhibitorio fue menor en presencia de radiación UV-B, como ha sido mostrado previamente por otros autores (Bischof *et al.* 2002).

Metabolismo del C bajo radiación solar a corto plazo (ciclo diario)

En diversas ocasiones se han descrito distintos ritmos diarios de variación de la actividad fotosintética (Flores y Herrero 1994, Mori *et al.* 1996). En este trabajo, durante el ciclo diario se encontró un efecto fotoinhibitorio general de la radiación solar al mediodía, aunque éste fue mayor en ausencia de radiación UV-B (tratamientos PA y PAR). Bischoff *et al.* (2002) mostraron que durante ciclos diarios bajo radiación solar se estimuló la fotoinhibición, aunque esta estimulación fue mayor en muestras incubadas bajo radiación PAR que en presencia de radiación UV. Dado que en el intermareal lo normal es la presencia de radiación UV y, la exclusión de esta banda no es sino una manipulación experimental, nuestros

(Lopes *et al.* 1997) from dim light environments. In the case of *F. spiralis*, there seems to be a well-coupled system in which the photosynthetic electron transport chain generates the energy necessary for the carbon concentrating mechanism. This would explain the delay in the stimulation of total CA activity in comparison with the rETR maximum. Thus, a sequential and interdependent process of carbon uptake, carbon assimilation, energy synthesis, and new carbon uptake appears to be taking place during a daily cycle.

The lack of correlation between rETR and total CA activity in *U. olivascens* (i.e., between photosynthetic energy synthesis and carbon uptake) is probably due to the inhibition of photosynthesis under full solar radiation, and the significant negative correlation found in *F. spiralis* in the PA and PAR treatments may be indicating this coupled sequential process. In the case of the PAB treatment, in *F. spiralis* a more complex process must be involved, since a mixed effect of light quality (light signal) and light quantity (energy) must be present. Thus, although the higher levels of total CA activity were found in the PAB treatment during most of the day (i.e., a response to the light signal associated with the presence of UV-B), a process dependent not only on light quality but also on light dose might explain the decrease in total CA activity in this treatment at the end of the day.

In *U. olivascens*, the increase in CA activity in the PA and PAR treatments, but not in the PAB treatment, suggests that there must be a relationship between the presence of UV radiation and its amount in each spectral band (UV-B or UV-A). Thus, the combination of both elements is what determines the daily modulation of the stimulation process. The probable alteration of this balance between light quality and quantity in the artificial radiation experiment might explain the lack of increase in the above-mentioned results after 24 h of exposure to artificial radiation.

Carbon metabolism under long-term solar radiation (annual cycle)

The yearly evolution of total CA activity in field plants indicates the inhibition of carbon concentration mechanisms during the periods of higher incident energy, either directly or through the inhibition of carbon assimilation and associated energy synthesis during the photosynthetic process (fig. 3a). This must be related to the presence of UV-B radiation in the solar spectrum received by the plants in the field, based on the ecological implications of the beneficial role of UV-B in marine plants well-acclimated to high irradiances (Flores-Moya *et al.* 1998, Figueroa *et al.* 2002). The long-term beneficial effect of UVB radiation contrasts with the short-term negative effects on photosynthesis (few hours or one day of exposure) observed in different *Ulva* species (Figueroa *et al.* 2003b). These results reveal the importance of temporal scales in photobiological studies (Villafañe *et al.* 2003). In the short term, UV-B radiation caused photoinhibition of photosynthesis and growth; however, increasing the exposure time acclimation

resultados muestran que la presencia de radiación UV-B, en cierto rango de variación, puede estar actuando como una señal ambiental a través de la cual se activan los mecanismos de concentración de carbono de manera que se emplee la energía disponible durante el periodo central del día.

Algunos autores también han mostrado que la respuesta de fotoinhibición dinámica puede estar relacionada con la aclimatación a la radiación UV (Häder *et al.* 1996, Figueroa *et al.* 1997, Flores-Moya *et al.* 1998, Figueroa *et al.* 2003). Los ciclos diarios descritos en *Rissoella verruculosa* (Flores-Moya *et al.* 1998) y *Plocamium cartilagineum* (Viñepla 2000, Figueroa y Viñepla 2001) son similares a los encontrados en este trabajo para *F. spiralis* y *U. olivascens*, respectivamente. En este sentido, la localización de *R. verruculosa* en la zona intermareal es análoga a la de *F. spiralis*, también sometida a ciclos de secado-rehumedecimiento a lo largo del día. De la misma forma, *P. cartilagineum* se localiza habitualmente en la zona submareal o dentro de refugios rocosos, en condiciones de luz tenue. Teniendo en cuenta estas analogías, la localización de las algas en la zona intermareal y su régimen de exposición a radiación solar podrían explicar los cambios en la actividad fotosintética.

Si la energía generada en el proceso fotosintético se acopla con los mecanismos de concentración de carbono, la ausencia de actividad durante el mediodía debería reflejarse en la actividad AC. También lo contrario debe ocurrir bajo ciertas condiciones, ya que el aumento del transporte fotosintético de electrones al mediodía, dependiente del carbono asimilado previamente, debe actuar como una señal de demanda de nuevos incrementos en la incorporación de C, como se ha demostrado previamente (Viñepla *et al.* 2006). Un aumento similar de la actividad AC total bajo tratamientos PAB y PA ha sido mostrado para *Dasycladus vermicularis* (Gómez *et al.* 1998), como en el caso de *U. olivascens* en el presente trabajo, mostrando incluso la ausencia de efecto de la radiación PAR sobre la actividad. Esto sugiere de nuevo que la banda espectral de UV es una señal ambiental que es capaz de estimular la actividad en *U. olivascens* cuando se expone a radiación solar. Este resultado también está de acuerdo con los ritmos diarios mostrados por otras macroalgas como *Ulva fenestrata* (Gao *et al.* 1992) y *Gracilaria tenuistipitata* (Lopes *et al.* 1997) de ambientes lumínicos suaves. En el caso de *F. spiralis* parece haber un sistema bien acoplado en el que la cadena fotosintética de transporte de electrones genera la energía necesaria para los mecanismos de concentración de carbono. Esto explicaría el retraso en la estimulación de la actividad AC total en comparación con el máximo de rTTE. Por tanto, un proceso secuencial e interdependiente de incorporación de C, asimilación de C, síntesis de energía y de nuevo incorporación de C parece tener lugar durante un ciclo diario.

La ausencia de correlación entre rTTE y la actividad AC total en *U. olivascens*, i.e., entre la síntesis de energía mediante la fotosíntesis y la incorporación de C, se debe probablemente a la inhibición de la fotosíntesis bajo radiación solar, y la correlación negativa significativa encontrada en *F. spiralis* en los

processes not only reduced photoinhibition but also increased photosynthesis and growth in *Ulva* species (Altamirano *et al.* 2000a, b; Figueroa *et al.* 2003b). The accumulation of UV-B absorbing compounds and increased antioxidant activity are included among the acclimation processes of *Ulva* species (Han and Han 2005). Beneficial effects of UV-B radiation on recovery of photosynthesis have also been found in the brown alga *Diclytota dichotoma* (Flores-Moya *et al.* 1999). UV radiation also stimulated the accumulation of UV screen substances in brown algae, including *Fucus* species, such as phenolic compounds (Pavia *et al.* 1997, Henry and van Alstyne 2004, Abdala-Díaz *et al.* 2006).

When thalli collected from the natural environment throughout the year were incubated under the PAB, PA, and PAR treatments, the responses seemed to depend not only on the dose but also on the quality of light, since the highest levels of total CA activity were found in the PAB treatment (fig. 3b). In fact, a more complex response is suggested, since light quality is the most important factor, acting as a light signal for carbon uptake and assimilation under low light doses. This would explain the high levels of total CA activity during autumn and winter in the PAB treatment. In summer, however, under higher levels of radiation, light dose associated with UV-B radiation becomes the most determining factor for the inhibition. This might be the reason for the enzyme activation in the PAR treatment during summer.

The linear response of total CA activity vs light dose (fig. 4) also indicates this dependency on light quality and intensity. In the PAB treatment, higher levels of activity were found under low dose levels, with decreasing levels of activity when the dose increased, whereas the opposite pattern was found in the PA and PAR treatments. In addition to the effect of light dose, it seems that UV radiation, especially UV-B, acts as an environmental trigger that can stimulate physiological processes in a sequential process where photosynthetic energy synthesis can be used in carbon concentrating mechanisms.

Although particular responses of stimulation of photosynthesis or carbon uptake under UV-B radiation were determined in both species under low dose conditions, no general response to this kind of radiation was found probably because of specific morphological and physiological characteristics of the thalli and photoprotective mechanisms. The relationship between morphology and response to UV radiation has been discussed in several works (Bañares *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2004, 2005; Bishof *et al.* 2006).

Acknowledgements

This work was supported by the European Union (project ENV4-CT96-0188) and the Spanish Ministry of Education and Science (project AGL2005-02655).

References

Abdala-Díaz RT, Cabello-Pasini A, Pérez-Rodríguez E, Conde-Álvarez RM, Figueroa FL. 2006. Daily and seasonal variations of

tratamientos PA y PAR puede estar indicando el acoplamiento de este proceso secuencial. En el caso del tratamiento PAB en *F. spiralis* debe estar presente un proceso más complejo, ya que debe estar presente el efecto mezclado de la calidad (señal lumínica) y la cantidad de luz (energía). Por tanto, aunque se encontraran altos niveles de actividad AC total en el tratamiento PAB durante la mayor parte del día, i.e., una respuesta a la señal lumínica asociada a la presencia de UV-B, un proceso que dependa no sólo de la calidad de luz sino también de la dosis podría explicar el descenso de la actividad AC total en el tratamiento PAB al final del día.

En *U. olivascens*, la combinación de ambos elementos, la presencia de radiación UV y su cantidad en cada banda espectral, es lo que está determinando la modulación diaria del proceso de estimulación. La probable alteración del balance entre la calidad de luz y su cantidad en el experimento de radiación artificial, podría explicar la ausencia de incremento en los resultados mencionados anteriormente tras 24 h de exposición a radiación artificial.

Metabolismo del C bajo radiación solar a largo plazo (ciclo annual)

La evolución anual de la actividad AC total en plantas traídas del intermareal indica la inhibición de los mecanismos de concentración de C durante los periodos de mayor energía incidente, tanto directamente como a través de la inhibición de la asimilación de C y la síntesis de energía asociada durante la fotosíntesis (fig. 3a). Esto debe estar relacionado con la presencia de radiación UV-B en el espectro de radiación recibido por las plantas en el campo, de acuerdo con las implicaciones ecológicas del papel benéfico de la radiación UV-B en plantas bien aclimatadas a intensa irradiancia (Flores-Moya *et al.* 1998, Figueroa *et al.* 2002). El efecto benéfico a largo plazo de la radiación UV-B contrasta con sus efectos negativos sobre la fotosíntesis a corto plazo (pocas horas o un día de exposición) observado en diferentes especies de *Ulva* (Figueroa *et al.* 2003b). Estos resultados señalan la importancia de la escala temporal en los estudios fotobiológicos (Villafañe *et al.* 2003). A corto plazo la radiación UV-B provocó la fotoinhibición de la fotosíntesis y el crecimiento, pero aumentar el tiempo de exposición no sólo redujo la fotoinhibición sino que además aumentó la fotosíntesis y el crecimiento en distintas especies de *Ulva* (Altamirano *et al.* 2000 a, b, Figueroa *et al.* 2003b). Entre los procesos de aclimatación en las especies de *Ulva* se incluyen la acumulación de compuestos que absorben UV-B y un aumento de la actividad antioxidante (Han y Han 2005). También se han encontrado efectos beneficiosos de la radiación UV-B sobre la recuperación de la fotosíntesis en algas pardas como *Diclytota dichotoma* (Flores-Moya *et al.* 1999). La radiación UV también estimuló la acumulación de sustancias pantalla frente al UV en algas pardas, incluyendo especies de *Fucus*, como los compuestos fenólicos (Pavia *et al.* 1997, Henry y van Alstyne 2004, Abdala-Díaz *et al.* 2006).

- optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* 148: 459–465.
- Altamirano M, Flores-Moya A, Figueroa FL. 2000a. Long-term effect of natural sunlight under various ultraviolet radiation conditions on growth and photosynthesis of intertidal *Ulva rigida* (Chlorophyceae) cultivated *in situ*. *Bot. Mar.* 43: 119–126.
- Altamirano M, Flores-Moya A, Conde F, Figueroa FL. 2000b. Growth seasonality, photosynthetic pigments and C and N content in relation to environmental factors: A field study on *Ulva olivascens* (Ulvales, Chlorophyta). *Phycologia* 39: 50–58.
- Altamirano M, Flores-Moya A, Figueroa FL. 2003. Effects of UV radiation and temperature on growth germlings of three species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Aquat. Bot.* 75: 9–20.
- Bañares E, Altamirano M, Figueroa FL, Flores-Moya A. 2002. Influence of UV radiation on growth of sporelings of three nongelliculate coralline red algae from southern Iberian Peninsula. *Phycol. Res.* 50: 23–30.
- Bischof K, Hanelt D, Wienke C. 1998. UV-radiation can affect depth-zonation of Antarctic macroalgae. *Mar. Biol.* 131: 597–605.
- Bischof K, Peralta G, Krabs G, van de Poll WH, Pérez-Llorens JL, Breeman AM. 2002. Effects of solar UV-B radiation on canopy structure of *Ulva* communities from southern Spain. *J. Exp. Bot.* 53: 2411–2421.
- Bischof K, Gómez I, Molis M, Hanelt D, Karsten U, Lüder U, Roleda MY, Zacher, K, Wienke C. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5: 141–166.
- Braune W, Döhler G. 1996. Impact of UV-B radiation on ¹⁵N-ammonium and ¹⁵N-nitrate uptake by *Haematococcus lacustris* (Volvocales). II. The influence of a recovery period. *J. Plant Physiol.* 149: 349–357.
- Büchel C, Wilhelm C. 1993. *In vivo* analysis of slow chlorophyll induction kinetics in algae: Progress, problems and perspectives. *Photochem. Photobiol.* 58: 137–148.
- Cabello-Pasini A, Figueroa FL. 2005. Effect of nitrate concentration on the relation between photosynthetic oxygen evolution and electron transport rate in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 41: 1169–1177.
- Döhler G, Hagmeier E, David C. 1995. Effects of solar and artificial UV irradiation on pigments and assimilation of ¹⁵N ammonium and ¹⁵N nitrate by macroalgae. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 30: 179–187.
- Dring MJ, Wagner A, Boeskov J, Lüning K. 1996. Sensitivity of intertidal and subtidal red algae to UVA and UVB radiation, as monitored by chlorophyll fluorescence measurements: Influence of collection depth and season and length of irradiation. *Eur. J. Phycol.* 31: 293–302.
- Figueroa FL, Viñegla B. 2001. Effects of solar UV radiation on photosynthesis and enzyme activities (carbonic anhydrase and nitrate reductase) in marine macroalgae from southern Spain. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74: 237–249.
- Figueroa FL, Salles S, Aguilera J, Jiménez C, Mercado J, Viñegla B, Flores-Moya A, Altamirano M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 81–90.
- Figueroa FL, Jiménez C, Viñegla B, Pérez-Rodríguez E, Aguilera J, Flores-Moya A, Altamirano M, Lebert M, Häder DP. 2002. Effects of solar UV radiation on photosynthesis of the marine angiosperm *Posidonia oceanica* from southern Spain. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230: 59–70.
- Figueroa FL, Conde-Álvarez R, Gómez I. 2003a. Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynthesis Res.* 75: 259–275.
- Al incubarse mediante los tratamientos PAB, PA y PAR los talos recolectados en el intermareal a lo largo del año, la respuesta pareció depender no sólo de la dosis sino también de la calidad de luz, ya que los mayores niveles de actividad AC total se encontraron en el tratamiento PAB (fig. 3b). De hecho, es posible sugerir una respuesta más compleja, ya que la calidad de luz es el factor más importante, actuando como una señal lumínica para la incorporación y asimilación de C en condiciones de baja dosis de luz. Esto explicaría los altos niveles de actividad AC total durante el otoño y el invierno en el tratamiento PAB. Sin embargo, durante el verano, con altos niveles de radiación, la dosis de luz asociada a la radiación UV-B se convierte en el factor determinante de la inhibición. Esta podría ser la razón de la activación enzimática en el tratamiento PAR durante el verano.
- De la misma manera, la respuesta lineal de la actividad AC total frente a la dosis de luz (fig. 4) indica también esta dependencia de la calidad y la intensidad de luz. Así, los mayores niveles de actividad se encontraron en el tratamiento PAB con bajos niveles de dosis, disminuyendo la actividad a medida que aumentaba la dosis, mientras que en los tratamientos PA y PAR se encontró el patrón contrario. Además del efecto de la dosis de luz, parece que la radiación UV, especialmente UV-B, actúa como un detonador ambiental que puede estimular los procesos fisiológicos en un proceso secuencial donde la síntesis fotosintética de energía puede ser usada en los mecanismos de concentración de carbono.
- Aunque se han mostrado respuestas de estimulación de la fotosíntesis o la incorporación de C bajo radiación UV-B en las dos especies estudiadas en condiciones de baja dosis, no se ha hallado una respuesta general a este tipo de radiación, probablemente debido a las características fisiológicas y morfológicas específicas de los talos y sus mecanismos fotoprotectores. La relación entre la morfología y la respuesta a la radiación UV ha sido ya discutida previamente en varios trabajos (Bañares *et al.* 2002; Gómez *et al.* 2004, 2005; Bishof *et al.* 2006).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el proyecto de la Unión Europea ENV4-CT96-0188 y por el Ministerio de Educación y Ciencia español (proyecto AGL2005-02655).

- Figueroa FL, Nygard C, Ekelund N, Gómez I. 2003b. Photobiological characteristics and photosynthetic UV responses in two *Ulva* species (Chlorophyta) from southern Spain. *J. Photochem. Photobiol.* 72: 35–44.
- Flores E, Herrero A. 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation. In: Bryant DA (ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp. 417–517.
- Flores-Moya A, Gómez I, Viñegla B, Altamirano M, Pérez-Rodríguez E, Maestre C, Caballero RM, Figueroa FL. 1998. Effects of solar radiation on the endemic Mediterranean red alga *Rissoella verruculosa*: Photosynthetic performance, pigment content and the activities of enzymes related to nutrient uptake. *New Phytol.* 139: 673–683.

- Flores-Moya A, Hanelt D, Figueroa FL, Altamirano M, Viñepla B, Salles S. 1999. Involvement of solar UV-B radiation in recovery of inhibited photosynthesis in the brown alga *Dictyota dichotoma* (Hudson) Lamouroux. J. Photochem. Photobiol. 49: 129–135.
- Frederick JE, Soulen PF, Diaz SB, Smolskaia I, Booth CR, Lucas T, Neuschuler D. 1993. Solar ultraviolet irradiance observed from South Argentina: September 1999 to March 1991. J. Geophys. Res. 98: 88–91.
- Gao Y, Smith GJ, Alberte RS. 1992. Light regulation of nitrate reductase in *Ulva fenestrata* (Chlorophyceae). I. Influence of light regimes on nitrate reductase activity. Mar. Biol. 112: 691–696.
- Gerber S, Häder DP. 1993. Effects of solar radiation on motility and pigmentation of 3 species of phytoplankton. Env. Exp. Bot. 33(4): 515–521.
- Gómez I, Pérez-Rodríguez E, Viñepla B, Figueroa FL, Karsten U. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* from southern Spain. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 47: 46–57.
- Gómez I, Figueroa F, Ulloa N, Morales V, Lovengreen C, Huovinen C, Hess S. 2004. Patterns of photosynthesis in 18 species of intertidal macroalgae from southern Chile. Mar. Ecol. Prog. Ser. 270: 103–116.
- Gómez I, Ulloa N, Oréstegui M. 2005. Morpho-functional patterns of photosynthesis and UV sensitivity in the kelp *Lessonia nigrescens* (Laminaria, Phaeophyta). Mar. Biol. 148: 231–240.
- Gordillo FJL, Segovia M, Figueroa FL. 2004. Cyclic AMP levels in several macroalgae and their relation to light quantity and quality. J. Plant Physiol. 161: 211–217.
- Häder DP, Figueroa FL. 1997. Photoecophysiology of marine macroalgae. Photochem. Photobiol. 66: 1–14.
- Häder DP, Lebert M, Mercado J, Aguilera J, Salles S, Flores-Moya A, Jiménez C, Figueroa FL. 1996. Photosynthetic oxygen production and PAM fluorescence in the brown alga *Padina pavonica* measured in the field under solar radiation. J. Phycol. 32: 614–620.
- Haglund K, Björk M, Ramazanov Z, García-Reina G, Pedersén M. 1992. Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic-carbon assimilation in the red alga *Gracilaria tenuistipitata*. Planta 187: 275–281.
- Han Y-S, Han T. 2005. UV-B induction of UV-B protection in *Ulva pertusa* (Chlorophyta). J. Phycol. 41: 523–530.
- Hanelt D. 1998. Capability of dynamic photoinhibition in Arctic macroalgae is related to their depth distribution. Mar. Biol. 131: 361–369.
- Henry BE, van Alstyne KL. 2004. Effects of UV radiation on growth and phlorotannins in *Fucus gardneri* (Phaeophyceae) juveniles and embryos. J. Phycol. 40: 527–533.
- Jassby AD, Platt T. 1976. Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. Limnol. Oceanogr. 21: 540–547.
- Jiménez C, Figueroa FL, Salles S, Aguilera J, Mercado J, Viñepla B, Flores-Moya A, Lebert M, Häder DP. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis and photoinhibition in red macrophytes from an intertidal system of southern Spain. Bot. Mar. 41: 329–338.
- Karsten U, Bischof K, Hanelt D, Tüg H, Wiencke C. 1999. The effect of UV radiation on photosynthesis and UV screen substances in the endemic Arctic macroalga *Devalarea ramentacea* (Rhodophyta). Physiol. Plant. 105: 58–66.
- Kirk JTO. 1976. Light and Photosynthesis in the Aquatic Ecosystems. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 152 pp.
- Korbee N, Figueroa FL, Aguilera J. 2005. Effect of light quality on the accumulation of photosynthetic pigments, proteins and mycosporine-like amino acids in the red alga *Porphyra leucosticta* (Bangiales, Rhodophyta). J. Photochem. Photobiol. 80: 71–78.
- Krause GH, Weis E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 313–349.
- Kumar A, Sinha RP, Häder DP. 1996. Effect of UV-B on enzymes of nitrogen metabolism in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. J. Plant Physiol. 148: 86–91.
- Lopes PF, Oliveira MC, Colepicolo P. 1997. Diurnal fluctuation of nitrate reductase activity in the marine red alga *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta). J. Phycol. 33: 225–231.
- Maegawa M, Kunieda M, Kida W. 1993. The influence of ultraviolet radiation on the photosynthetic activity in several red algae from different depths. Jap. J. Phycol. 41: 207–214.
- Mercado JM, Gordillo FJ, Figueroa FL, Niell FX. 1998. External carbonic anhydrase and affinity to inorganic carbon in intertidal macroalgae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 221: 209–220.
- Mori T, Binder B, Johnson CH. 1996. Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93: 10183–10188.
- Quiñones MA, Aparicio PJ. 1990. Flavin type action spectrum of nitrate utilization by *Monoraphidium brauni*. Photochem. Photobiol. 51: 689–692.
- Pavia H, Cervin G, Lindgren A, Aberg P. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 157: 139–146.
- Roleda MY, Wiencke C, Hanelt D. 2006. Thallus morphology and optical characteristics affect growth and DNA damage by UV radiation in juvenile Arctic *Laminaria* sporophytes. Planta 223: 407–417.
- Rüdiger W, López-Figueroa F. 1992. Yearly review: Photoreceptors in algae. Photochem. Photobiol. 55: 949–954.
- Schreiber U, Endo T, Mi H, Asada K. 1995. Quenching analysis of chlorophyll fluorescence by saturation pulse method: Particular aspects relating to the study of eukaryotic algae and cyanobacteria. Plant Cell Physiol. 36: 873–882.
- Sokal PR, Rohlf FJ. 1995. Biometry. WH Freeman ed., San Francisco, 880 pp.
- Van de Poll WH, Eggert A, Buma AGJ, Breeman AM. 2001. Effects of UV-B induced DNA damage and photoinhibition of growth of temperate marine red macrophytes: Habitat-related differences in UV-B tolerance. J. Phycol. 37: 30–37.
- Villafañe V, Sunfbäck C, Figueroa FL, Helbling W. 2003. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by ultraviolet radiation. In: Helbling W, Zagarese H (eds.), UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems. Comprehensive Series in Photosciences, pp. 357–397.
- Viñepla B. 2000. Efecto de la radiación ultravioleta sobre las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del carbono y el nitrógeno en microalgas y fanerógamas marinas. Ph.D. thesis, Universidad de Málaga, Málaga, 302 pp.
- Viñepla B, Segovia M, Figueroa FL. 2006. Effect of artificial UV radiation on carbon and nitrogen metabolism in the macroalgae *Fucus spiralis* L. and *Ulva olivascens* Dangeard. Hydrobiologia 560: 31–42.

Recibido en diciembre de 2008;
aceptado en enero de 2009.