



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Mérida

Departamento de Recursos del Mar

Ecofisiología de las macroalgas *Dictyota ciliolata* y *Halimeda scabra* presentes en el Caribe Mexicano

Tesis que presenta

Mtra. Daily Zúñiga Ríos

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de Ciencias Marinas

Director de Tesis

Dr. Daniel Robledo Ramírez

Mérida, Yucatán

Junio 2021

COMITÉ SINODAL

Dra. Yolanda Freile Pelegrín - Dpto. Recursos del Mar. CIVESTAV.

Dra. Susana Enríquez Domínguez - Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (Puerto Morelos) ICML-UNAM.

Dr. Jesús Ernesto Arias González - Dpto. Recursos del Mar. CIVESTAV.

Dr. David Sergio Valdés Lozano - Dpto. Recursos del Mar. CIVESTAV.

RESUMEN

Los géneros de macroalgas marinas *Dictyota* y *Halimeda* están considerados entre las macroalgas más abundantes en los arrecifes de coral del Caribe, por lo que el estudio ecofisiológico de las especies *H. scabra* M. Howe y *D. ciliolata* Sonder ex Kutzing contribuirá al entendimiento de las respuestas de estos géneros a diferentes factores ambientales. El documento está estructurado en tres capítulos, en el capítulo I se evaluó la variación estacional anual de los principales parámetros ecofisiológicos de ambas especies en las dos estaciones (lluvias y secas) características del área. Se realizaron determinaciones de fotosíntesis, respiración, pigmentos fotosintéticos, biomasa, y contenidos de carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas en base al porcentaje de peso seco, así como del contenido de carbonatos de la especie calcificada. Se encontró que *H. scabra* presenta una biomasa similar en ambas estaciones (lluvias y Secas), mientras que la de *D. ciliolata* disminuye significativamente durante la estación de lluvias. El contenido de pigmentos fue característico de cada grupo taxonómico, e incrementó durante la estación de secas. La interacción estaciones por especie de la fotosíntesis fue similar, mientras que la respiración fue superior en la estación de lluvias. Los carbohidratos y las proteínas presentaron comportamientos opuestos, siendo los primeros más elevados durante la estación de secas. Los carbonatos de *Halimeda* disminuyeron durante la estación de lluvias. Aunque no fue un resultado esperado, se describe por primera vez la germinación del gametofito de *D. ciliolata* con una prolongación basal septada y pelos feofíceos.

En el capítulo II se evaluaron los efectos interactivos de la temperatura, el pH y los nutrientes sobre el rendimiento fotosintético de la macroalga tropical calcificante *Halimeda scabra*. La absorción de bicarbonato (HCO_3^-) por la especie se evaluó mediante la abundancia natural de isótopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en tejidos de algas, y la incorporación del isótopo $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ en productos fotosintéticos. Adicionalmente se evaluó la posible actividad de la enzima anhidrasa carbónica (AC) sobre la fotosíntesis mediante la utilización de los inhibidores Acetazolamida, AZ y Etoxizolamida, EZ. Se encontró una interacción significativa de los factores ambientales (temperatura, pH y nutrientes) sobre la fotosíntesis bruta (P_{gross}). Los mayores valores de P_{gross} fueron alcanzados con la temperatura más elevada, el pH más básico y con el nivel de nutrientes alto y en el tratamiento control (sin adición de nutrientes), a 33°C de temperatura y el pH más bajo (7.5). La abundancia natural de isótopos estables de carbono, $\delta^{13}\text{C}$, indicó que la especie utiliza ambas formas de carbono inorgánico (C_i), CO_2 y HCO_3^- . La incorporación del isótopo ^{13}C en el aspartato en tres tratamientos de fotoperíodos validó la

absorción de HCO_3^- y sugirió actividad de fotosíntesis C4. El inhibidor de la actividad de la AC extracelular AZ, no mostró efecto sobre la fotosíntesis mientras que EZ (inhibidor de la actividad de la AC intracelular) provocó una inhibición del 22% de la fotosíntesis.

En el capítulo III se estudió la absorción de bicarbonato en *Dictyota ciliolata* mediante la abundancia natural de isótopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en tejidos de muestras de campo. También se investigó la posible presencia de un Mecanismo de Concentración de Carbono (MCC) basado en una enzima anhidrasa carbónica AC) mediante el efecto de inhibidores de la actividad de la enzima AC sobre la fotosíntesis máxima (P_{max}). Los monosacáridos se determinaron por Cromatografía de Alta Resolución de Intercambio Iónico con Detección Amperométrica de Pulso HPLC-PAD. Se encontró un valor de $\delta^{13}\text{C} = -20.4\text{‰}$ por lo que la especie utiliza ambas formas de carbono inorgánico (C_i) como fuentes de carbono para la fotosíntesis (HCO_3^- y CO_2). El inhibidor AZ no mostró efecto sobre la fotosíntesis por lo que no se evidenció la actividad una enzima AC externa. El inhibidor de la AC intracelular EZ causó un 58.2% de inhibición sobre la P_{max} , resaltando la importancia de la enzima sobre la fotosíntesis. Se identificaron diez monosacáridos característicos de las algas pardas (Manitol, Ramnosa (Rha), Arabinosa (Ara), Glucosamina (GlcN), Galactosa (Gal), Glucosa (Glc), Manosa (Man), Xilosa (Xyl), Fructosa (Fruc) y ácido Glucurónico (GlcA) siendo este uno de los primeros estudios que describen la composición de monosacáridos en *D. ciliolata*.

ABSTRACT

Marine macroalgae genera *Dictyota* and *Halimeda* are considered among the most abundant macroalgae in the Caribbean coral reefs, so the ecophysiological study of the species *H. scabra* M. Howe and *D. ciliolata* Sonder ex Kutzing will contribute to the understanding of the responses of these genera to different environmental factors. The document is structured in three chapters, in the chapter I the seasonal variation of the main ecophysiological parameters of both species were characterized during two distinctive seasons of the area (dry and rainy). Photosynthesis, photosynthetic pigments, biomass, and carbohydrate, protein, lipid and ash contents, as well as the carbonate content of the calcified species were evaluated. It was found that *H. scabra* has similar biomass in both seasons (rainy and dry), while of *D. ciliolata* decreased significantly during the rainy season. Pigment content was characteristic of each taxonomic group and increased during the dry season. Seasons - species interactions of photosynthesis were similar, while respiration was higher in the rainy season in both species. Carbohydrates and proteins

showed an opposite performance, being the first highest during the dry season. *Halimeda* carbonates decreased during the rainy season. Although it was not an expected result, the germination of the gametophyte of *D. ciliolata* is described for first time with a septate basal extension and phaeophyceal hairs.

In the chapter II the interactive effects of temperature, pH and nutrients levels on the photosynthetic performance of the calcifying tropical macroalgae *Halimeda scabra* were evaluated. The absorption of bicarbonate (HCO_3^-) by the species was evaluated by the natural abundance of stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) in algae tissues, and the incorporation of the isotope $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ in photosynthetic products. Finally, the possible activity of the carbonic anhydrase enzyme (AC) on photosynthesis was evaluated using the inhibitors Acetazolamide, AZ and Ethoxzolamide, EZ. A significant interaction of environmental factors (temperature, pH and nutrients) on gross photosynthesis (P_{gross}) was found. The highest P_{gross} values were reached with the highest temperature, the most basic pH and with the high nutrient level and in the control treatment (no added nutrients), at temperature of 33°C and the lowest pH (7.5). The natural abundance of stable isotopes of carbon, $\delta^{13}\text{C}$, indicated that the species uses both forms of inorganic carbon (C_i), CO_2 and HCO_3^- and suggested a MCC. The incorporation of the ^{13}C isotope in aspartate in three photoperiod treatments validated HCO_3^- absorption and suggested C4 photosynthesis activity. The inhibitor of extracellular AC activity AZ showed no effect on photosynthesis while EZ (inhibitor of intracellular AC activity) caused a 22% inhibition of photosynthesis.

In the chapter III the HCO_3^- uptake by the species *Dictyota ciliolata* was studied by the natural abundance of carbon stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$) in tissues. The possible presence of a carbon concentration mechanism (CCM) relied on an external carbonic anhydrase enzyme was investigated by the effect of inhibitors of AC enzyme activity on maximum photosynthesis (P_{max}). Monosaccharides were determined by High-Resolution Ion Exchange Chromatography. We found that *D. ciliolata* uses both forms of inorganic carbon (HCO_3^- and CO_2) as a carbon source for photosynthesis ($\delta^{13}\text{C} = -20.4\text{‰}$). The AZ inhibitor showed no effect on photosynthesis while the EZ intracellular CA inhibitor caused 58.2% inhibition over P_{max} , highlighting the importance of the enzyme on photosynthesis. Ten characteristic monosaccharides of brown algae (Mannitol, Rhamnose (Rha), Arabinose (Ara), Glucosamine (GlcN), Galactose (Gal), Glucose (Glc), Mannose (Man), Xylose (Xyl), Fructose (Fruc) and Glucuronic acid (GlcA) were identified, being this one of the first studies describing its composition in *D. ciliolata*.

DEDICATORIA

A mi hija Anita

A mis padres y hermanos

A la memoria del Dr. Pedro Alcolado

A Dios por mostrarme el camino

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Daniel Robledo Ramírez, por aceptarme como su estudiante, por sus oportunos consejos, enseñanzas y por la revisión de todos los materiales presentados, mi eterno agradecimiento.

Al Dr. Rafael Alaiza por animarme a iniciar el doctorado.

A los sínodos Dra. Yolanda Freile, Dra. Susana Enríquez, Dr. David Valdés y Dr. Jesús Arias por valiosas sus sugerencias.

Al CONACYT por la Beca doctoral N° 704918/593231 y al proyecto Fomix-Conacyt por el apoyo otorgado para los muestreos (FOMIX-YUC-2014-C17-247043).

Al Dr. Román Vásquez Elizondo por su valiosa contribución.

Al Dr. Hugo Skyol Pliego Cortés por la determinación de los monosacáridos.

A la Dra. E. Serviere-Zaragoza por el análisis isotópico en tejidos.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Ficología, Dr. Edgar Caamal, Mtra. Crescencia Chávez, Lic. Víctor Ávila Velázquez, a la Dra. Erika Vázquez y al Dr. Emanuel por su apoyo en todo momento.

A mis compañeros de estudios del CINVESTAV Mérida Elena de la Guardia, Hugo, Beto, Ana, Felaco, Lulú, Adrián, Nayén y Daniela por su amistad y apoyo en muestreos y determinaciones de laboratorio.

Dr. David Valdés por su contribución en la preparación de soluciones madre de los inhibidores de AC y al Laboratorio de Química del Departamento de Recursos del Mar del CINVESTAV por la determinación de nutrientes.

A la Dra. Beatriz Martínez – Daranas y Dra. Ana María Suárez por su inspiración.

A TODOS MUCHAS GRACIAS

Tabla de contenido

COMITÉ SINODAL.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES.....	1
Limitación de la fotosíntesis en ambientes acuáticos	2
Mecanismos para la absorción de bicarbonato en autótrofos marinos	2
Funciones de la enzima Anhidrasa carbónica (AC).....	3
Fotorrespiración	3
Mecanismos de Concentración de CO ₂ (MCC)	4
Efectos interactivos de los principales factores ambientales del cambio climático sobre la fotosíntesis de las macroalgas	6
Justificación	9
Hipótesis de trabajo	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos.....	10
CAPÍTULO 1.....	11
Caracterización de los principales parámetros ecofisiológicos de dos macroalgas abundantes en Xcalacoco, Quintana Roo, México	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT	12
1.1. Introducción	13
1.2. Materiales y métodos.....	15
1.2.1. Material colectado y mantenimiento	15
1.2.2. Descripción de especies	16
1.2.3. Biomasa	16
1.2.4. Mediciones de fotosintéticas	16
1.2.5. Determinación de pigmentos fotosintéticos	17
1.2.6. Composición química.....	17
1.2.7. Análisis estadísticos	18
1.3. Resultados	18
1.3.1. Descripción de especies	18

1.3.2. Biomasa	23
1.3.3. Fotosíntesis y respiración	24
1.3.4. Pigmentos fotosintéticos	25
1.3.5. Composición química	26
1.4. Discusiones.....	27
1.5. Conclusiones	31
CAPÍTULO 2.....	33
Respuestas fotosintéticas de <i>Halimeda scabra</i> (Chlorophyta, Bryopsidales) al efecto interactivo de la temperatura, el pH y los nutrientes	33
RESUMEN.....	34
ABSTRACT	34
2.1. Introducción	35
2.2. Materiales y Métodos.....	38
2.2.1. Material biológico y condiciones de mantenimiento	38
2.2.2. Mediciones fotosintéticas	39
2.2.3. Absorción de bicarbonato, HCO ₃ ⁻	41
2.2.4. Abundancia natural del isótopo estable de carbono δ ¹³ C en tejidos de muestras de campo ...	41
2.2.5. Absorción e incorporación del isótopo estable ¹³ C en productos resultantes de la fotosíntesis	41
2.2.6. Análisis espectroscópico de ¹³ C Resonancia Magnética Nuclear (¹³ C-RMN)	42
2.2.7. Ensayos de inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)	42
2.2.8. Análisis estadísticos	42
2.3. Resultados	43
2.3.1. Respuestas fotosintéticas al efecto interactivo de la temperatura, el pH y los nutrientes.....	43
2.3.2. Utilización de bicarbonato	44
2.3.3. inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)	46
2.4. Discusiones.....	46
2.5. Conclusiones	50
CAPÍTULO 3.....	51
Absorción de bicarbonato y composición de monosacáridos en <i>Dictyota ciliolata</i> Sonder ex Kutzing	51
RESUMEN.....	52
ABSTRACT	52
3.1. Introducción	53
3.2. Materiales y métodos.....	55
3.2.1. Material biológico y condiciones de mantenimiento	55
3.2.2. Absorción de bicarbonato (HCO ₃ ⁻).....	56
3.2.3. Ensayos de inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)	56
3.2.4. Composición de monosacáridos.....	57

3.2.5. Análisis estadísticos	58
3.3. Resultados	58
3.3.1. Absorción de HCO_3^-	58
3.3.2. Inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)	58
3.3.3. Monosacáridos	59
3.4. Discusiones.....	60
3.5. Conclusiones	62
CONCLUSIONES E IMPLICACIONES ECOLÓGICAS	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
SUPLEMENTOS	82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Variación estacional de la fotosíntesis y la respiración de <i>H. scabra</i> y <i>D. ciliolata</i>	32
Tabla 2.	Variación estacional del contenido de pigmentos fotosintéticos	33
Tabla 3.	Composición química estacional	34
Tabla 4.	Composición de monosacáridos de <i>D. ciliolata</i>	52
Tabla 5.	Abundancia natural de isótopos estables de carbono $\delta^{13}\text{C}$ en especies de <i>Dictyota</i>	68
Tabla S1:	Diseño de experimento para probar el efecto interactivo de la temperatura, el pH y los niveles de nutrientes sobre la fotosíntesis bruta de <i>H. scabra</i>	69
Tabla S2	Resultados del ANOVA de tres vías y de la prueba de comparaciones múltiples Post hoc Newman-Keuls para detectar diferencias significativas entre tratamientos y niveles	100
Tabla S3.	Comparación de parámetros ecofisiológicos evaluados en <i>H. scabra</i> y <i>D. ciliolata</i>	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación del sitio de colecta en Xcalacoco, Quintana Roo, México	24
Figura 2.	Hábito de <i>D. ciliolata</i>	27
Figura 3.	Ejemplares de <i>D. ciliolata</i> en cultivo	28
Figura 4.	Reproducción asexual por fragmentación vegetativa en <i>D. ciliolata</i>	28
Figura 5.	Características reproductivas de <i>D. ciliolata</i>	29
Figura 6.	Desarrollo de los gametofitos	30
Figura 7.	<i>H. scabra</i> . A. Aspecto general. B. utrículos terminados en puntas	31
Figura 8.	Variación estacional de la biomasa por especies	32
Figura 9.	Efecto interactivo de la temperatura, el pH y los nutrientes sobre la P_{gross} de <i>H. scabra</i>	52
Figura 10.	Espectro de RMN de la incorporación del $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ en productos fotosintéticos de <i>H. scabra</i> en diferentes tratamientos en luz y oscuridad	54
Figura 11.	Efecto de dos inhibidores de la enzima anhidrasa carbónica sobre la P_{max} de <i>H. scabra</i>	53
Figura 12.	Efecto de dos inhibidores de la enzima anhidrasa carbónica sobre la fotosíntesis máxima de <i>D. ciliolata</i>	67

INTRODUCCIÓN GENERAL Y ANTECEDENTES

Durante décadas los ecólogos han tratado de entender cómo los procesos biológicos, químicos y físicos regulan la abundancia, distribución y producción de los organismos acuáticos (Falkowski y Kiefer 1985). La comprensión de la abundancia de las macroalgas y los factores que influyen es un aspecto importante del valor ecológico, ambiental, estético y socioeconómico de los arrecifes (Chung *et al.* 2007). Las especies pertenecientes a los géneros *Dictyota* J.V. Lamouroux (Phaeophyceae) y *Halimeda* J.V.Lamouroux (Ulvophyceae) se encuentran entre las macroalgas más abundantes en los arrecifes de coral del Caribe (Littler *et al.* 1987, Shulman y Robertson 1996, McClanahan y Muthiga 1998, Lirman y Biber 2000, Williams y Polunin 2001, Alcolado *et al.* 2003, Geraldés 2003, McClanahan *et al.* 2004, Zuñiga-Ríos *et al.* 2012, Olsen *et al.* 2015, Zuñiga-Ríos *et al.* 2016), probablemente por ser las que mejor se adaptan a las condiciones regionales.

Son necesarios más estudios que aclaren cómo y por qué algunos organismos fotosintéticos son capaces de realizar la fotosíntesis mejor que otros en condiciones sub y supra-óptimas, así como la tolerancia a un tipo de estrés y a la combinación de factores de estrés en el medio ambiente (Beadle y Long 1985). La temperatura es uno de los principales factores que controlan el metabolismo y por ende la tasa fotosintética (Davison 1991, Pedersen *et al.* 2004, Bruno *et al.* 2015). De acuerdo con Baggini *et al.* (2014) la temperatura es probablemente el factor fundamental que rige el ciclo estacional de *Dictyota*, donde el incremento en el tamaño de los talos, la biomasa y la reproducción se producen durante la estación de invierno (secas), mientras que las temperaturas extremadamente altas del verano parecen exceder los límites para el crecimiento y la persistencia de los macrotalos. Altas temperaturas e irradiancias han sido correlacionadas con la abundancia de *Dictyota pulchella* Hörnig & Schmetter durante el verano (Lirman y Biber 2000, Ferrari *et al.* 2012). Mientras que la abundancia de *Halimeda opuntia* Linnaeus ha estado más asociada a los incrementos de la temperatura que a las interacciones entre la temperatura y la irradiancia (Ferrari *et al.* 2012). Según Walaku (2006) las especies de *Halimeda* manifiestan mayor crecimiento relativo con la temperatura alta y en zonas con pH alto que favorecen la calcificación.

Limitación de la fotosíntesis en ambientes acuáticos

La fotosíntesis en ambientes acuáticos está expuesta a una mayor limitación por la disponibilidad de carbono que en los ecosistemas terrestres (Madsen y Sand-Jensen 1991, Enríquez y Rodríguez-Román 2006). Esta limitación es causada en primer lugar por la lenta difusión de los gases y solutos en el agua mar (CO_2 y el HCO_3^-) que es más baja que en el aire en un orden de magnitud de 4 a 5 (Raven 1984, Enríquez y Rodríguez-Román 2006); y en segundo lugar debido al hecho de que a pH marino la mayor parte del carbono inorgánico está en forma de un ion bicarbonato, que no es fácilmente asimilable por los organismos (Falkowski y Raven 1997, Enríquez y Rodríguez-Román 2006). En el agua de mar normal (pH 8.1 – 8.3, salinidad 35 psu, y temperatura de 5 a 25°C), la mayoría del carbono inorgánico disuelto (CID) (~90%) se encuentra en forma de bicarbonato (HCO_3^- 2.0 – 2.2 mM) seguido por el CO_3^{2-} con ~9%, y el CO_2 con ~1% (10.2 - 18.8 μM) (Raven 1984, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Zou *et al.* 2011). La abundancia de las diferentes formas de C_i en el agua de mar está en función del pH. A pH inferior a 6 el CO_2 es el más abundante, en pH entre 6 y 9 predomina el HCO_3^- y en pH superior a 9 el CO_3^{2-} es el más abundante (Falkowski y Raven 1997).

Mecanismos para la absorción de bicarbonato en autótrofos marinos

El CO_2 y el HCO_3^- son las únicas formas de C_i que pueden ser utilizadas como fuente de carbono para la fotosíntesis, de ellas el CO_2 puede penetrar fácilmente por difusión a través de la pared celular de las algas, mientras que el HCO_3^- (por ser una molécula grande con carga negativa) no puede pasar a través de la doble capa lipídica de la membrana plasmática (Larkum *et al.* 1989, Fernández *et al.* 2014) y necesita de mecanismos de transporte específicos para ingresar a la célula. En autótrofos marinos han sido propuestos tres mecanismos para la adquisición del HCO_3^- (1) deshidratación extracelular del HCO_3^- en CO_2 catalizada por una enzima anhidrasa carbónica (AC) localizada en la pared celular de la mayoría de las algas (Bowes 1969, Smith y Bidwell 1987, Bjork *et al.* 1992). (2) absorción directa de HCO_3^- mediante una proteína de intercambio aniónico localizada en el plasmanema; este mecanismo fue sugerido por una relativa insensibilidad a la acetazolamida en condiciones de pH alto (Beer *et al.* 2002) y un incremento de la fotosíntesis neta a pH alto (Carlberg *et al.* 1990, Larsson *et al.* 1990, Axelsson *et al.* 1991, Larsson y Axelsson 1999). De esta manera, el HCO_3^- se acumula interiormente y requiere de una AC interna para ser convertido a CO_2 (Fernández *et al.* 2014). (3) absorción activa de C_i por medio de una ATPasa (Raven y Lucas 1985, Mercado *et al.* 1998, Giordano *et al.* 2005, Fernández *et al.* 2014).

Funciones de la enzima Anhidrasa carbónica (AC)

La anhidrasa carbónica son una familia de enzimas que catalizan la conversión reversible del HCO_3^- a CO_2 (Badger y Price 1994), y en general, en las algas han sido encontradas tanto dentro de la célula (cloroplastos y citoplasma) como externamente en la membrana celular (Tsuzuki y Miyachi 1989, Invers *et al.* 1999) y pueden actuar como un MCC para el mantenimiento de la fotosíntesis (Enríquez y Schubert 2014). La AC externa facilita la conversión extracelular del HCO_3^- en CO_2 , facilitando la difusión de este último (Cook *et al.* 1986). La AC interna tiene diferentes funciones dependiendo de su localización (Sültemeyer 1998, Fernández *et al.* 2018). La AC citosólica ayuda a mantener el equilibrio entre las concentraciones de C_i y el pH interno para evitar cualquier fuga de CO_2 fuera de la célula cuando el gradiente de concentración es mayor dentro de la célula (Fernández *et al.* 2014, Fernández *et al.* 2018). La AC mitocondrial limita la fuga potencial de CO_2 del citosol al medio (Raven 2001, Fernández *et al.* 2018). La AC del cloroplasto es responsable del suministro de CO_2 al sitio activo de Rubisco (Badger y Price 1994, Fernández *et al.* 2018). Por tanto, las AC son esenciales en el proceso fotosintético permitiendo, el rápido suministro de CO_2 a la enzima ribulosa1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Surif and Raven 1989; Raven 1995), y para otras reacciones metabólicas como la fotorrespiración, calcificación, y homeostasis de pH intracelular (Badger 2003; Hofmann *et al.* 2013; Bi y Zhou 2016, Fernández *et al.* 2018). La actividad de la AC ha sido ampliamente documentada (Borowitzka y Larkum 1976, Holbrook *et al.* 1988, Reiskind *et al.* 1988, Giordano y Maberly 1989, Reiskind y Bowes 1991, Badger y Price 1994, Beer y Rehnberg 1997, Invers *et al.* 1999, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Moulin *et al.* 2011).

Fotorrespiración

Durante la fotosíntesis, el CO_2 es fijado (Carboxilación) por la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa-oxigenasa (Rubisco) en el Ciclo Fotosintético de Reducción de Carbono (PCRC) también conocido como Ciclo Calvin-Benson-Bassham (Falkowski *et al.* 2000, Raven y Beardall 2015). La Rubisco, es muy abundante en los cloroplastos, constituyendo más del 16% de su proteína total. Grandes cantidades están presentes porque la Rubisco es una enzima lenta con una velocidad catalítica máxima es de solo 3 s^{-1} (Berg *et al.* 2002, Almeraya y Sánchez 2015). Cuando hay suficiente CO_2 en el medio, la Rubisco lo fija eficientemente, integrándolo al ciclo de Calvin-Benson-Bassham (carboxilación). Sin embargo, cuando la concentración de CO_2 es baja en relación con la concentración de O_2 , esta enzima cataliza una reacción con el O_2 . Esta

reacción da comienzo a un proceso que ocurre en los peroxisomas y en las mitocondrias y que se conoce como fotorrespiración por el que se forman compuestos intermedios que consumen ATP, y producen CO₂ y agua (Bowes *et al.* 1971, Reiskind *et al.* 1989, Berg *et al.* 2002, Beardall *et al.* 2003).

Actuando como oxigenasa, se genera una molécula de 2-fosfoglicolato y una molécula de 3-fosfoglicerato. La molécula de 3-fosfoglicerato se incorpora al PCRC. La molécula de 2-fosfoglicolato (no ingresa al PCRC) y es desfosforilada a través de la enzima fosfoglicolato fosfatasa (Bowes *et al.* 1971, Reiskind *et al.* 1989), por lo que, se metaboliza en un ciclo que se completa en tres compartimentos celulares, cloroplasto, peroxisoma y mitocondria, el cual recicla el C del 2-fosfoglicolato a 3-fosfoglicerato que, a su vez, es metabolizado en el PCRC. Este proceso recibe el nombre de Ciclo fotosintético C2 de oxidación del carbono y actúa como un sistema de reciclado para recuperar el C perdido durante la fotorrespiración por la reacción de oxigenación de la Rubisco (Giordano *et al.* 2005).

Durante mucho tiempo se ha considerado a la fotorrespiración como un proceso completamente negativo que provoca una reducción de la eficiencia con incremento de los costos metabólicos en la fijación de carbono por pérdida de ATP (Bowes *et al.* 1971, Reiskind *et al.* 1989, Beardall *et al.* 2003, Giordano *et al.* 2005). Sin embargo, recientemente está siendo contemplado como un proceso auxiliar de la fotosíntesis (Bauwe *et al.* 2012), ya que ha sido encontrado que el flujo de carbono fotorespiratorio-fotosintético acelera el flujo de electrones en el PSII (Timm *et al.* 2012), lo cual es importante para mantener la actividad fotosintética en condiciones de elevada concentración de oxígeno en el cloroplasto, lo cual ocurre mayormente a P_{max} . De esta manera, aunque existe pérdida de ATP y poder reductor en el ciclo de Calvin-Benson-Bassham la fotosíntesis no se detiene por falta de CO₂. El precio de perder eficiencia en el proceso fotosintético y producir compuestos que necesitan ser metabolizados por la mitocondria y el peroxisoma con mayores costos de ATP, es contrarestando con reducción del daño por luz o colapso del aparato fotosintético por falta de suficiente carbono. Este mecanismo es conocido como parte de la capacidad de fotoprotección del proceso fotosintético.

Mecanismos de Concentración de CO₂ (MCC)

Como la Rubisco está menos de la mitad de saturada bajo los niveles actuales de CO₂ en el agua de mar (Giordano *et al.* 2005), muchas algas y plantas superiores han adquirido mecanismos que promueven la acumulación intracelular de CO₂ y permiten que los organismos fotosintéticos reduzcan el efecto de la limitación de carbono al incrementar la concentración de

CO₂ en la proximidad de la Rubisco (Mecanismos de Concentración de CO₂, MCC) (Badger 1987, Badger y Andrews 1987, Giordano *et al.* 2005, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Cornwall *et al.* 2015).

La mayoría de las algas marinas pueden adquirir el CO₂ requerido como sustrato para la Rubisco a través de la absorción activa de CO₂ y/o HCO₃⁻ (Badger y Price 1994, Giordano *et al.* 2005, Hurd *et al.* 2009). La actividad de los MCC, en muchos casos, ha estado asociada al uso directo o indirecto de HCO₃⁻ (Sand-Jensen y Gordon 1984, Reiskind *et al.* 1988, Holbrook *et al.* 1988, Giordano y Maberly 1989, Reiskind y Bowes 1991, Maberly 1990, Beer y Rehnberg 1997, Invers *et al.* 1999, 2001; Enríquez y Rodríguez-Román 2006). Aunque existe mucha diversidad en los MCC (Shevela *et al.* 2013), algunos de ellos son soportados por la β-carboxilación, la cual facilita alternativas metabólicas a la carboxilación del carbono inorgánico y hacen una importante contribución a los MCC (Bowes 1985, Raven y Osmond 1992, Enríquez y Rodríguez-Román 2006). Ejemplo de ello son las plantas C4 y CAM (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas) que fueron descritos por primera vez en plantas terrestres. En las algas existe gran plasticidad en el uso de vías alternativas de carboxilación (metabólica), y aunque no existe especialización estructural, el mecanismo es esencialmente el mismo con la formación de un ácido dicarboxílico de 4C (Giordano *et al.* 2005).

Las plantas C4 han evolucionado a partir de los ancestros de C3 al agregar especialización estructural y bioquímica que les permite concentrar CO₂ alrededor del sitio activo de Rubisco (Hatch 1987, Badger *et al.* 1998). Por lo que constituyen una solución evolutiva facilitada por el proceso de β-carboxilación. Este mecanismo involucra una etapa de carboxilación adicional previa a la catalizada por la Rubisco, e incorpora el C_i del ambiente externo a un portador C3 para formar un compuesto intermedio de 4C que se descarboxila en la proximidad de la Rubisco, proporcionando CO₂ al sitio activo de la enzima (Badger y Price 1994). Se denomina C4 porque el primer producto es un ácido dicarboxílico de 4C (Giordano *et al.* 2005). En altas proporciones de CO₂/O₂ las plantas C4 aparentemente tienen una desventaja con respecto a las plantas C3 debido al gasto de energía adicional necesario para concentrar el CO₂ (Shevela *et al.* 2013). Las plantas C4 presentan un MCC activo, que se relaciona principalmente con la utilización eficiente de HCO₃⁻, mediante una reacción de carboxilación inicial, catalizada por la PEPC que utiliza HCO₃⁻ como sustrato de C_i (Badger y Price 1994).

Las plantas CAM son otro ejemplo de solución evolutiva. El mecanismo CAM de concentración de CO₂ fue descrito inicialmente en plantas crasuláceas de donde toma el nombre. Las plantas

CAM presentan dos fases separadas en el tiempo. Durante la noche acumulan ácidos orgánicos, vía PEPC fundamentalmente oxalato y malato que se almacena en la vacuola resultando de ello una acidificación nocturna, durante el día estos ácidos son descarboxilados y el CO_2 es nuevamente fijado por la Rubisco (Badger y Price 1994, Giordano *et al.* 2005). Mecanismos CAM han sido sugeridos en las Ochrophyta de mares templados *Ascophyllum nodosum* y *Fucus vesiculosus* (Giordano y Maberly 1989, Raven y Osmond 1992), pero hasta el momento no ha sido encontrado en ninguna macroalga tropical.

La mayoría de las macroalgas marinas tropicales utilizan HCO_3^- como fuente de C_i para la fotosíntesis (Koch *et al.* 2013) mediante una AC que puede actuar como un MCC. La presencia de MCCs también han sido demostrados en *Halimeda* (Price *et al.* 2011), *Lobophora variegata* y *Padina sanctae-crucis* (Enríquez y Rodríguez-Román 2006). Actividad C4 ha sido propuesta en *Udotea flabellum*, con una carboxilación inicial por la PEPCK (Sand-Jensen y Gordon 1984, Reiskind *et al.* 1988, Reiskind y Bowes 1991). Mientras que en *Dictyota guineensis* (Holbrook *et al.* 1988) existe cierta evidencia de mecanismo C4, pero no es concluyente, ya que la distinción se basó únicamente en las altas actividades de PEPC y PEPCK en relación con la Rubisco (Koch *et al.* 2013).

Efectos interactivos de los principales factores ambientales del cambio climático sobre la fotosíntesis de las macroalgas

Las respuestas de las macroalgas arrecifales al incremento de CO_2 es diversa. Las algas que no poseen MCC, podrían estar más estimuladas por la elevación de la $p\text{CO}_2$ que aquellas que si poseen MCC altamente eficientes, aunque las que utilizan HCO_3^- también podrían beneficiarse al regular sus MCC por debajo de la $p\text{CO}_2$ elevada porque dichos MCC implican una alta demanda de energía (Wu *et al.* 2008). Alta $[\text{CO}_2]$ puede beneficiar la fotosíntesis de las plantas C3 porque la enzima de carboxilación inicial en la fotosíntesis, Rubisco, no está saturada de sustrato a la $[\text{CO}_2]$ actual, debido al hecho de que el O_2 atmosférico puede disminuir la fijación del CO_2 (Bowes y Ogren 1972, Koch *et al.* 2013). En contraste, las enzimas de carboxilación inicial en la fotosíntesis de C4 no se afectan por el O_2 (Bowes y Ogren 1972). En plantas C4, la PEPC citosólica inicia un mecanismo de concentración de CO_2 (MCC) que proporciona $[\text{CO}_2]$ saturante en la proximidad de la Rubisco, como resultado, la fotosíntesis se satura en la $[\text{CO}_2]$ atmosférico actual y se minimiza la foto respiración (Bowes 1993, Bowes *et al.* 2002). En consecuencia, las especies C4 muestran una respuesta de productividad mucho menor al aumento de $[\text{CO}_2]$ y la temperatura que las especies C3 (Koch *et al.* 2013).

Más difícil de predecir son las especies calcificantes, ya que ha sido demostrado que sus respuestas son especie-específica, como ejemplo la fotosíntesis *Padina sanctae-crucis* está limitada al pH normal del agua de mar y se ha sugerido la presencia de un MCC (Enríquez & Rodríguez-Román 2006). De acuerdo con Cornwall *et al.* (2012), las diferencias en los mecanismos de absorción de carbono entre las macroalgas calcificantes desempeñan un papel importante en sus respuestas al aumento de $p\text{CO}_2$. Algunas especies de *Halimeda* absorben HCO_3^- directamente (Borowitzka y Larkum 1976) y no dependen de una AC externa (De Beer y Larkum 2001). Esta habilidad es probablemente una ventaja en condiciones de alto CO_2 , pero no está claro si todas las especies tienen esta habilidad. Las diferencias en los MCC podrían explicar por qué algunas especies son menos sensibles que otras al elevado CO_2 . En algunas especies de *Halimeda* los efectos del incremento de $p\text{CO}_2$ son diversos. El incremento de la $p\text{CO}_2$ no mostró efecto sobre la tasa de calcificación de *H. opuntia* (Price *et al.* 2011), *H. maculosa* (Sinutok *et al.* 2011, Comeau *et al.* 2013) y *H. cylindracea* (Sinutok *et al.* 2011). Mientras que en *H. minima* (Comeau *et al.* 2013) y *H. incrassata* (Meyer *et al.* 2016) se encontró un decrecimiento de la calcificación con el incremento del CO_2 . En Ochrophyta, Johnson *et al.* (2012) documentaron un incremento en la cobertura de *Padina australis* asociado a una disminución en el contenido de CaCO_3 en los sitios naturalmente afectados por el aumento de CO_2 en Papua, Nueva Guinea, en comparación con sitios no afectados.

Revisiones recientes suponen que la acidificación del océano podría incrementar la productividad de las macroalgas debido a los efectos beneficiosos del aumento del carbono inorgánico disuelto (CID) (Harley *et al.* 2012, Brodie *et al.* 2014, Celis-Plá *et al.* 2015). Sin embargo, ha sido hallado que los incrementos de CO_2 provocan disminución de la cobertura de algas calcificantes e incremento de algas pardas (Baggini *et al.* 2014). Las Ochrophyta se benefician de los incrementos de CO_2 , si suficientes nutrientes están disponibles (Johnson *et al.* 2012, Celis-Plá *et al.* 2015). El crecimiento de macroalgas en altas concentraciones de CO_2 produce cambios inesperados en mecanismos fisiológicos no ligados directamente a su fijación fotosintética, aunque sí al uso de otros recursos como los nutrientes (Mercado 2002).

El incremento en la cobertura de algas pardas en sitios con alto CO_2 ha sido relacionado con la combinación del aumento de DIC para la fotosíntesis de especies con ineficientes CCM, y a la disminución del pastoreo (Calosi *et al.* 2013, Celis-Plá *et al.* 2015). Las respuestas de los organismos calcificantes al CO_2 están influenciadas por la disponibilidad de nutrientes (Russell *et al.* 2009, Holcomb *et al.* 2010, Chauvin *et al.* 2011, Findlay *et al.* 2011). El enriquecimiento de nutrientes inorgánicos por sí solo estimula varios aspectos de la fisiología de *H. opuntia*, pero el

enriquecimiento de nutrientes a una elevada concentración de CO₂ incrementa la biomasa de *Dictyota* sp. y reduce la de *H. opuntia* (Hofmann *et al.* 2015). Campbell *et al.* (2016) estudiaron el efecto individual y combinado de la temperatura y la acidificación sobre la fotosíntesis, la respiración y la calcificación en tres especies de *Halimeda* (*H. incrassata*, *H. opuntia* y *H. simulans*), demostrando que, en estas especies, el calentamiento del océano puede mitigar los efectos negativos de la acidificación. Los elementos anteriores indican el efecto interactivo de estos factores, por lo que algunos autores sugieren estudiar las respuestas ecológicas y fisiológicas de las algas al efecto interactivo de CO₂, temperatura y nutrientes (Szman 2001, Mercado 2002, Stengel *et al.* 2014).

Aunque el CO₂, como un factor aislado, puede inducir respuestas fisiológicas, sigue siendo difícil determinar las consecuencias finales de la acidificación de los océanos (AO) sin considerar otros parámetros abióticos que varían entre las dimensiones espaciales y temporales (Campbell *et al.* 2016). La mayoría de las investigaciones sobre los efectos del cambio global en los arrecifes de coral se centran en uno o pocos factores de estrés (Pendleton *et al.* 2016), principalmente en el efecto del cambio climático (la temperatura y acidificación del océano), sobre la calcificación de algas coralinas y algunas especies de *Halimeda* (Baggini *et al.* 2014, Hofmann *et al.* 2014). Poco se sabe acerca de cómo las especies de arrecifes o comunidades responderán a los efectos interactivos de múltiples factores de estrés (Franklin y Foster 1997, Gordillo *et al.* 2001, Bischof *et al.* 2006, Häder *et al.* 2007, Johnson *et al.* 2014). Las futuras estrategias de investigación deberán abordar las respuestas de los organismos a la interacción de múltiples factores ambientales (Russell *et al.* 2012, Pendleton *et al.* 2016). Son particularmente necesarios estudios que combinen escenarios de acidificación de los océanos con otros factores tales como la temperatura, la luz y la disponibilidad de nutrientes, ya que los cambios en estos parámetros están ocurriendo simultáneamente con los cambios en la química del carbonato en el agua de mar (Zou *et al.* 2011, Harley *et al.* 2012, Hofmann *et al.* 2014). Estudios sobre el efecto interactivo es esencial para entender el futuro de los ecosistemas marinos (Baggini 2014).

Justificación

La temperatura media del planeta ha aumentado en 0.85°C (entre 0.65 y 1.06°C), y se espera que para el período 2016 - 2035 se incremente entre 0.3°C y 0.7°C, y el pH del océano ha decrecido en 0.1 (un aumento de 26% de concentración de iones hidrógeno) (IPCC 2013). Mientras que el intenso desarrollo de las zonas costeras ha evidenciado enriquecimiento de nutrientes de origen antropogénico en ecosistemas costeros (Mutchler *et al.* 2007, Hernández-Terrones *et al.* 2015). Aparejado a estos cambios, la abundancia de macroalgas en los arrecifes de coral, dentro de las que se encuentran las especies de los géneros *Halimeda* y *Dictyota* está muy extendida (Kramer *et al.* 2015, McClanahan *et al.* 2004, Olsen *et al.* 2015). Sin embargo, las respuestas de las macroalgas a los efectos interactivos de diversos factores es especie-específica (Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Price *et al.* 2011, Sinutok *et al.* 2011, Comeau *et al.* 2013, Comeau *et al.* 2013, Meyer *et al.* 2016) y dependen en gran medida de la forma de *Ci* que utilizan como fuente de carbono para la fotosíntesis y de la presencia y el tipo de MCC. Los resultados de este trabajo permitirán caracterizar las respuestas ecofisiológicas a estos factores de dos especies pertenecientes a géneros claves en los arrecifes de coral y contribuirán a predecir sus respuestas ante posibles escenarios futuros de cambios globales.

Hipótesis de trabajo

- “La biomasa, fotosíntesis y composición química de *H. scabra* y *D. ciliolata* varían estacionalmente con valores máximos durante el verano.”
- “El incremento interactivo de tres factores ambientales (temperatura, CO₂ y nutrientes) favorece la fotosíntesis de *H. scabra*, la cual absorbe bicarbonato y los incorpora en los productos de la fotosíntesis”.
- “*D. ciliolata* utiliza HCO₃⁻ como fuente de carbono para la fotosíntesis facilitado por la acción de una enzima anhidrasa carbónica”.

Objetivo General

Evaluar aspectos ecofisiológicos de macroalgas pertenecientes a dos géneros abundantes en los arrecifes de coral del Caribe que contribuyan al entendimiento de su abundancia y futuras respuestas al cambio climático.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar la variación estacional de los principales parámetros ecofisiológicos de dos especies pertenecientes a géneros de macroalgas abundantes en los arrecifes de coral y zonas bajas del Caribe Mexicano.
2. Evaluar el efecto interactivo de la temperatura, el pH y relaciones de nutrientes sobre las respuestas fotosintéticas de *H. scabra*.
3. Determinar la absorción de bicarbonato mediante la abundancia natural de isótopos estables de carbono en tejidos ($\delta^{13}\text{C}$) y la incorporación del isótopo estable ^{13}C en los productos resultantes de la fotosíntesis.
4. Evaluar la actividad de la enzima anhidrasa carbónica mediante el efecto de inhibidores sobre la fotosíntesis.
5. Identificar los principales monosacáridos en *D. ciliolata* por ser los primeros receptores del carbono fotosintético.

CAPÍTULO 1

Caracterización de los principales parámetros ecofisiológicos de dos macroalgas abundantes en Xcalacoco, Quintana Roo, México



RESUMEN

Se caracterizó variación estacional de los principales parámetros ecofisiológicos de *H. scabra* M. Howe y *D. ciliolata* Sonder ex Kutzing, dos macroalgas abundantes en zonas bajas de Xcalacoco, Quintana Roo, Caribe Mexicano. En las dos estaciones (lluvias y secas) características del área se realizaron determinaciones de fotosíntesis, respiración, pigmentos fotosintéticos, biomasa, y contenidos de carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas en base al porcentaje de peso seco, así como el contenido de carbonatos de la especie calcificada. Se encontró que *H. scabra* presenta una biomasa similar en ambas estaciones (lluvias y secas), mientras que la de *D. ciliolata* disminuye significativamente durante la estación de lluvias. El contenido de pigmentos fue característico de cada grupo taxonómico, e incrementó durante la estación de secas. La interacción estaciones por especie de la fotosíntesis fue similar, mientras que la respiración fue superior en la estación de lluvias. Los carbohidratos y las proteínas presentaron comportamientos opuestos, siendo los primeros más elevados durante la estación de secas. Los carbonatos de *Halimeda* disminuyeron durante la estación de lluvias. Aunque no fue un resultado esperado, se describe por primera vez la germinación del gametofito de *D. ciliolata* con una prolongación basal septada y pelos feofíceos.

ABSTRACT

The seasonal variation of the main ecophysiological parameters of *H. scabra* and *D. ciliolata*, two abundant macroalgae in Xcalacoco, Quintana Roo, Mexican Caribbean were characterized. During two distinctive seasons of the area (dry and rainy), photosynthesis, photosynthetic pigments, biomass, and carbohydrate, protein, lipid and ash contents, as well as the carbonate content of the calcified species were evaluated. It was found that *H. scabra* has similar biomass in both periods, while of *D. ciliolata* decreases significantly during the rainy season. Pigment content was characteristic of each taxonomic group and increased during the dry season. Seasons - species interactions of photosynthesis were similar, while respiration was higher in the rainy season. Nutrient contents did not depend on the season - species interaction, except for ashes. Carbohydrates and proteins showed an opposite performance, being the first highest during the dry season. *Halimeda* carbonates decreased during the rainy season. Although it was not an expected result, the germination of the gametophyte of *D. ciliolata* is described for first time with a septate basal extension and phaeophyceal hairs.

1.1. Introducción

Las algas marinas bentónicas son organismos fotosintéticos importantes en los ecosistemas costeros y estuarinos (Hanisak 1983). Presentan diferencias morfológicas y una gran diversidad en relación con el contenido de pigmentos, productos de almacenamiento y componentes de la pared celular, entre otros (Van den Hoek *et al.* 1995, Martins *et al.* 2016). Las especies pertenecientes a los géneros, *Dictyota*, *Lobophora* (Ochrophyta) y *Halimeda* (Chlorophyta) se encuentran entre las más frecuentes en los arrecifes de coral del Caribe (Shulman y Robertson 1996, McClanahan y Muthiga 1998, Lirman y Biber 2000, Williams y Polunin 2001, Beach *et al.* 2003, McClanahan *et al.* 2004, Olsen *et al.* 2015), posiblemente por ser las que mejor se adaptan a los factores ambientales locales y sus variaciones estacionales. Las especies del género *Dictyota* Lamouroux son comunes en zonas tropicales, subtropicales y templadas, lo que indica que pueden colonizar diversos nichos (De Clerck y Coppejans 1999, Gauna *et al.* 2013). *Halimeda* es un grupo de macroalgas verdes calcificantes sifonadas ampliamente distribuidas en aguas tropicales. Por su alta tasa de crecimiento son consideradas como competidores exitosos en muchos arrecifes (Vroom *et al.* 2003, Sinutok *et al.* 2008, Mayakun *et al.* 2012).

La fuerte variación estacional en las macroalgas está principalmente relacionada con las fluctuaciones estacionales de los factores ambientales como la temperatura, la luz, los nutrientes, el movimiento del agua y las mareas (Baggini *et al.* 2014, Ateweberhan *et al.* 2005), las que a su vez se ven reflejadas en sus respuestas metabólicas (fotosíntesis, tasas de crecimiento) y niveles de constituyentes (Robledo y Freile-Pelegrín 2005, Anantharaman *et al.* 2010). Ha sido documentado que algunas especies de *Halimeda* y *Dictyota* incrementan su abundancia durante el verano (Lirman y Biber 2000, Ferrari *et al.* 2012). Sin embargo, Diaz-Pulido y Garzon-Ferreira (2002) encontraron una correlación inversa en la abundancia de *Dictyota* con la temperatura en el Caribe Colombiano.

Las tasas de producción de biomasa en los organismos fotoautótrofos, generalmente referida como “standing stock”, son un reflejo de las tasas de crecimiento y desarrollo, gobernadas principalmente por procesos fisiológicos y bioquímicos (Edding *et al.* 2006), y dependen en gran medida de la estación, la estructura de la población y diversos factores ecológicos (Thakur *et al.* 2008). La fotosíntesis es el principal proceso vinculado con la producción de biomasa en los vegetales, y su medición puede ser considerada representativa de tal proceso (Edding *et al.* 2006, Walaku 2006). Según Beadle y Long (1985) son necesarios más estudios que aclaren

cómo y por qué algunas plantas son capaces de realizar la fotosíntesis mejor que otras en condiciones sub y supra-óptimas.

Aunque es conocido que los requerimientos de luz para la fotosíntesis están relacionados con el grupo taxonómico (Richardson *et al.* 1983), también se ha encontrado que los parámetros fotosintéticos son altamente dependientes de la morfología del talo. Las especies delgadas y filamentosas tienen mayor capacidad fotosintética y mayor contenido de pigmento que las especies con talos calcificados, ramificados o coriáceos (Johansson y Snoeijs 2002). De forma general el contenido de pigmentos accesorios aumenta en condiciones de poca luz acompañado de un aumento del tamaño de la antena que amplifica la capacidad de absorción de luz y viceversa. En mucha luz una antena más pequeña ayuda a evitar la fotoinhibición y el fotodaño debido a la sobreexcitación por alta luz principalmente cerca de la superficie del agua o con marea baja (Hanelt y Figueroa 2012).

No todas las especies responden de la misma manera a los cambios estacionales de temperatura. Los efectos de la temperatura en las macroalgas tropicales se han inferido principalmente de la aparición de picos estacionales en la biomasa como los encontrados en Dictyotales (Anantharaman *et al.* 2010). Las variaciones estacionales en la temperatura del agua y la disponibilidad de nutrientes también pueden afectar el crecimiento, la reproducción y la supervivencia de las macroalgas y, en consecuencia, su distribución y desarrollo estacional (Lüning 1990). Durante la fotosíntesis, usando luz y nutrientes, las algas producen lípidos, proteínas y carbohidratos (Juneja *et al.* 2013), que son los componentes bioquímicos más importantes (Khairy y El-Shafay 2013). Las cantidades relativas de estos productos metabólicos se ven afectados por las especies, el área geográfica y la estación del año (Jensen 1993, Anantharaman *et al.* 2010), por lo que están estrechamente relacionados con las condiciones ambientales como nutrientes, cantidad e intensidad de la luz solar; niveles de CO₂; pH; temperatura; y las relaciones biológicas (Juneja *et al.* 2013).

La mayoría de los parámetros ambientales varían según la estación y los cambios en las condiciones ecológicas pueden estimular o inhibir la biosíntesis de varios nutrientes (Lobban *et al.* 1985). Las propiedades nutricionales de las algas marinas son poco conocidas y normalmente se evalúan a partir de la composición química (Mabeau y Fleurence 1993, Anantharaman *et al.* 2010). En general, las algas contienen 90% de agua; y, por tanto, la composición química generalmente es evaluada en función del peso seco. Los carbohidratos se consideran la fracción principal y pueden alcanzar hasta el 50%, las proteínas pueden variar

entre el 3% y el 15%, y los lípidos entre el 1% y el 3% (Fleurence 1999, El-Shenody *et al.* 2019). En este estudio se trazó como hipótesis que “La biomasa, fotosíntesis y composición química de *H. scabra* y *D. ciliolata* varían estacionalmente con valores máximos durante el verano.” En este sentido realiza una caracterización del comportamiento estacional de los principales parámetros ecofisiológicos en dos especies de macroalgas abundantes en los arrecifes de coral y zonas bajas del Caribe Mexicano.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Material colectado y mantenimiento

Para caracterizar las variaciones ecofisiológicas estacionales, *H. scabra* y *D. ciliolata* fueron colectadas in Xcalacoco, Quintana Roo, México (20.660035 N, -87.034655 W) (Fig. 1) donde crecen sobre sustrato rocoso entre 0.50 y 2.0 m de profundidad. En el área existen dos estaciones: una temporada de secas de noviembre a mayo, y una temporada de lluvias de junio a octubre. En la primera, la temperatura superficial media del agua de mar es de ~24°C, mientras en la segunda estación, coincidente con el verano, las temperaturas más altas ocurren en agosto con una máxima media mensual de ~30°C pudiendo presentarse valores superiores. La media anual de la temperatura superficial del agua de mar es de ~28°C (Robledo y Freile-Pelegrín 2005, Álvarez-Cadena *et al.* 2007, Rodríguez-Martínez *et al.* 2010, Scheufen *et al.* 2017). La irradiancia diurna se incrementa progresivamente de enero a mayo y declina de julio a diciembre (Scheufen *et al.* 2017). La zona se caracteriza además por las descargas submarinas de agua hacia el ambiente costero (Crook *et al.* 2012, Hernández-Terrones *et al.* 2015) lo cual constituye una ruta para el transporte de nutrientes (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , SRP, SRSi) y otros contaminantes desde la tierra al ambiente marino (Hernández-Terrones *et al.* 2015) confirmando un comportamiento en pulsos a los nutrientes (que pueden ser particularmente altos en algunos sitios), la salinidad y el pH. El último con importantes variaciones desde 7.0 a 8.5 (Hernández-Terrones *et al.* 2015).

Las muestras fueron colectadas con ayuda de una espátula en las dos estaciones durante los meses de febrero de 2018 y julio de 2018 y se trasladaron al laboratorio en neveras refrigeradas. Se limpiaron con abundante agua de mar y cepillo de cerdas finas para eliminar epifitas. Posteriormente se aclimataron a las condiciones del cuarto de cultivo de algas del Laboratorio de Ficología del CINVESTAV Mérida en acuarios con agua de mar de la localidad

con recambios diarios de 1/3 del agua, saturación de luz con lámparas fluorescentes, fotoperiodos de 12:12 horas luz-oscuridad, temperatura de 24°C, y burbujeo constante de aire.

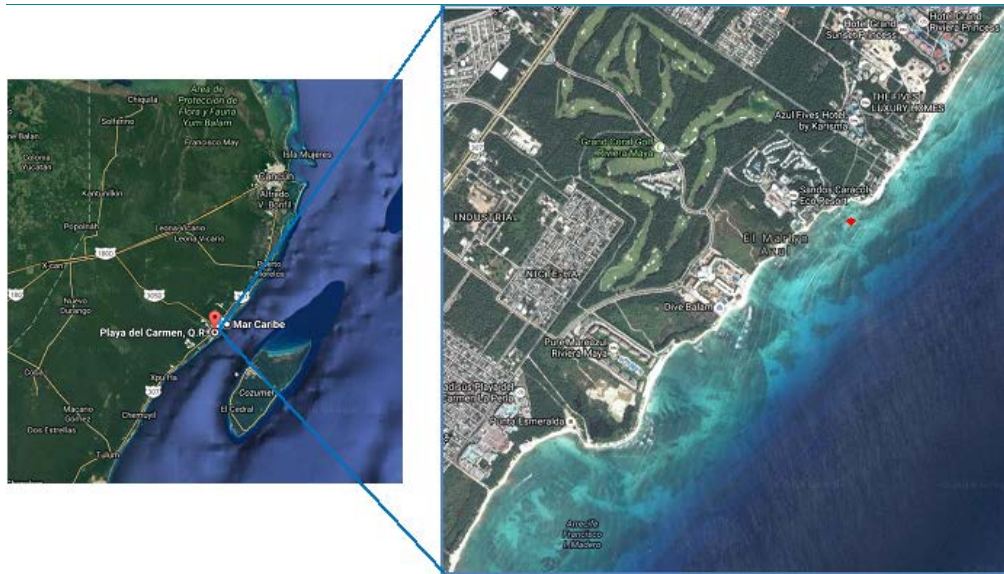


Fig.1. Ubicación del sitio de colecta en Xcalacoco, Quintana Roo, México.

1.2.2. Descripción de especies

La determinación específica de *Dictyota ciliolata* Sonder ex Kutzing se realizó siguiendo el criterio de De Clerck (2003) y Wysor y De Clerck (2003). Mientras que para *Halimeda scabra* M. Howe se siguieron los criterios de Howe (1905) y Hillis-Colinvaux (1980). La descripción de las especies se realizó sobre la base de observaciones cualitativas realizadas *in situ* y durante su mantenimiento en acuarios en laboratorio.

1.2.3. Biomasa

Las evaluaciones estacionales de biomasa *in situ* se efectuaron con un cuadrante 10 cm² de lado ($n = 10$) lanzado al azar cada un metro. La biomasa se expresó en g PS m².

1.2.4. Mediciones de fotosintéticas

La fotosíntesis se analizó por el método de las botellas claro-oscuras siguiendo la evolución del oxígeno vs la irradiancia (Thomas 1988) usando un Oxímetro YSI 5000 con sonda BOD YSI 5905 (YSI Incorporated Yellow Springs, Ohio, USA). Para minimizar el efecto de la lesión, los talos fueron cortados y pesados 24 horas previas a las mediciones de oxígeno. Fragmentos

apicales de 0.1 g de peso fresco se colocaron en botellas de DBO de 60 ml conteniendo el agua de mar de los sitios de colecta. Para evaluar cada tratamiento se usaron siete botellas ($n = 7$), más una botella adicional con agua de mar, sin tejidos, utilizada como blanco. Cada tratamiento fue evaluado en días separados y con diferentes fragmentos de tejidos de algas. Las algas fueron expuestas durante una hora a cada una de irradiancias seleccionadas (0, 100, 170, 200, 272, 436, 770 $\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$), generadas con una lámpara de halógeno de 500 W, y reducidas con mallas oscuras. Entre cada medición las botellas fueron rellenadas y agitadas. Las mediciones de las irradiancias se efectuaron con un sensor esférico conectado a un Data-Logger LI-COR LI-1500 (LI-COR, Nebraska USA). Todas las evaluaciones fotosintéticas se realizaron con el agua de mar de los sitios de colecta previamente filtrada con bomba de vacío, esterilizada por autoclave y a la temperatura media promedio de los meses de Febrero (24°C) y Agosto (30°C) previamente citadas, por ser estos donde se presentan las temperaturas extremas en cada temporada. Las temperaturas fueron mantenidas con un recirculador de agua (Cole-Parmer® Polystat® Refrigerated Recirculator, USA). La fotosíntesis máxima (P_{max}) se determinó como el promedio de las tres producciones de oxígeno más altas a irradiancia de saturación; eficiencia fotosintética (α) mediante la pendiente inicial de la curva, determinada por regresión de las primeras intensidades de irradiancias evaluadas; Irradiancia de saturación (I_k) como el cociente de P_{max}/α , y la respiración oscura (R_d) como el consumo de oxígeno en total oscuridad. Al final de cada evaluación se determinó el peso seco, por lo que los resultados se expresaron como mg de oxígeno por g peso seco h^{-1} en 300 ml.

1.2.5. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos se determinaron a partir de muestras de algas de 1 g de peso fresco ($n = 10$), las que fueron maceradas con nitrógeno líquido. Posteriormente se añadió 5 ml de acetona al 80% y se centrifugaron por 20 minutos a 3000 rpm. Las absorbancias del sobrenadante fueron leídas en espectrofotómetro Shimadzu UV-1601.

1.2.6. Composición química

La cuantificación de carbohidratos se realizó por el método colorimétrico propuesto por Dubois *et al.* (1956) a partir de muestras de 5 mg de alga seca y molida ($n = 6$). Mientras que las proteínas se cuantificaron según Lowry *et al.* (1951) a partir de 10 mg de alga seca y molida ($n = 6$). La extracción de lípidos se realizó con diclorometano/metanol (1:1; v/v) durante 24 h en maceración simultánea de tejidos utilizando agitación mecánica. El contenido de lípidos fue evaluado por el método gravimétrico y expresado como porcentaje de peso seco (Peralta-

García *et al.* 2016). El contenido de cenizas ($n = 6$) se determinó a partir de 1 g de peso seco colocado en mufla por 4 horas a 500°C. Se determinó además la variación estacional de la cantidad de carbonato de calcio de *H. scabra*, para lo cual 30 muestras de 1 g fueron pesadas y descalcificadas con HCL 1 N por 12 horas. Posteriormente fueron secadas a 60°C durante 24°C y pesadas. La diferencia en el peso se consideró como la cantidad de carbonato (Martone 2010, Johnson *et al.* 2012, Newcomb *et al.* 2018).

1.2.7. Análisis estadísticos

La comparación de las variaciones estacionales de la biomasa, fotosíntesis, *Chl a*, carotenos, carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas, se realizó mediante un ANOVA bifactorial, donde el primer factor fue la estación del año con dos niveles (secas y lluvias) y el segundo la especie con dos niveles. Las variaciones estacionales de *Chl b*, *Chl c* y carbonatos se analizaron mediante la prueba *t-student* con un nivel de significación de 0.05. Previo a los análisis se comprobó la homogeneidad de varianza y la normalidad mediante las pruebas de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov y Lilliefors respectivamente y se aplicaron transformaciones cuando fueron necesarias. Todos los análisis fueron realizados con el programa Statistica™ 7.

1.3. Resultados

1.3.1. Descripción de especies

Dictyota ciliolata Sonder ex Kutzing

Dominio: Eukaryota

Reino: Chromista

Phylum: Ochrophyta

Clase: Phaeophyceae

Subclase: Dictyotophycidae

Orden: Dictyotales

Familia: Dictyotaceae

Tribu: Dictyoteae

Género: *Dictyota* J.V.Lamouroux, 1809

Presenta un crecimiento erecto con talos ligeramente enrollados, dicotomía mayormente isótomas, aunque se presentan anisótomas en talos jóvenes y en algunas ramas de adultos. Bandas en forma de cilios, no siempre visibles a simple vista. Márgenes dentados, a veces

lisos. Disco basal filamentoso con rizoides. Célula apical prominente y una sola hilera de células medulares grandes, bordeadas por una hilera de células periféricas pequeñas (Fig. 2).

Durante el mantenimiento en acuario, después de una semana, sus márgenes se llenaron de proliferaciones que formaron nuevos individuos (Fig. 3). Se observó además reproducción asexual por fragmentación, donde los nuevos fragmentos dieron lugar a nuevos individuos (Fig. 4) y sexual con alternancia de generaciones isomórficas, esporofito con esporas agrupadas en tetrasporangios solitarios distribuidos por toda la superficie del talo y gametofitos con gametos agrupados en soros no recubiertos (Fig. 5).

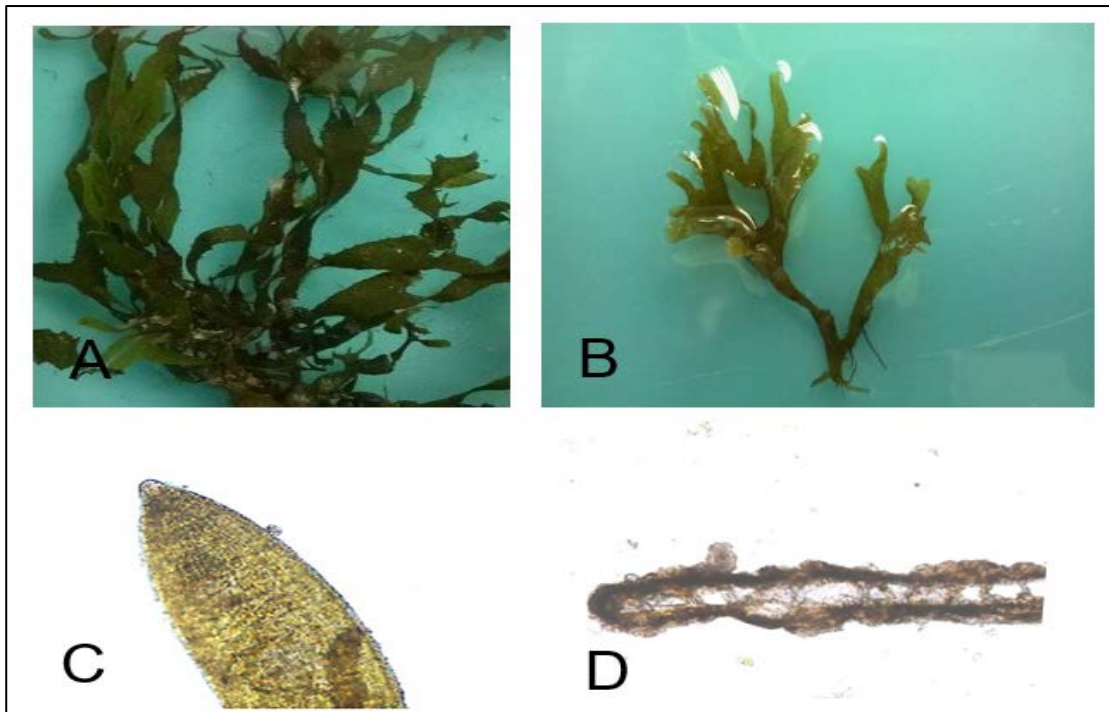


Fig. 2. Hábito de *D. ciliolata*. A. Ejemplar adulto. B. Talo joven de con dicotomías isótomas y anisótomas. C. Detalle del ápice con célula apical prominente (Aumento 40x). D. Corte transversal al talo mostrando una hilera de células medulares grandes, rodeadas por una hilera de células corticales pequeñas. Fotos: Crescencia Chávez.

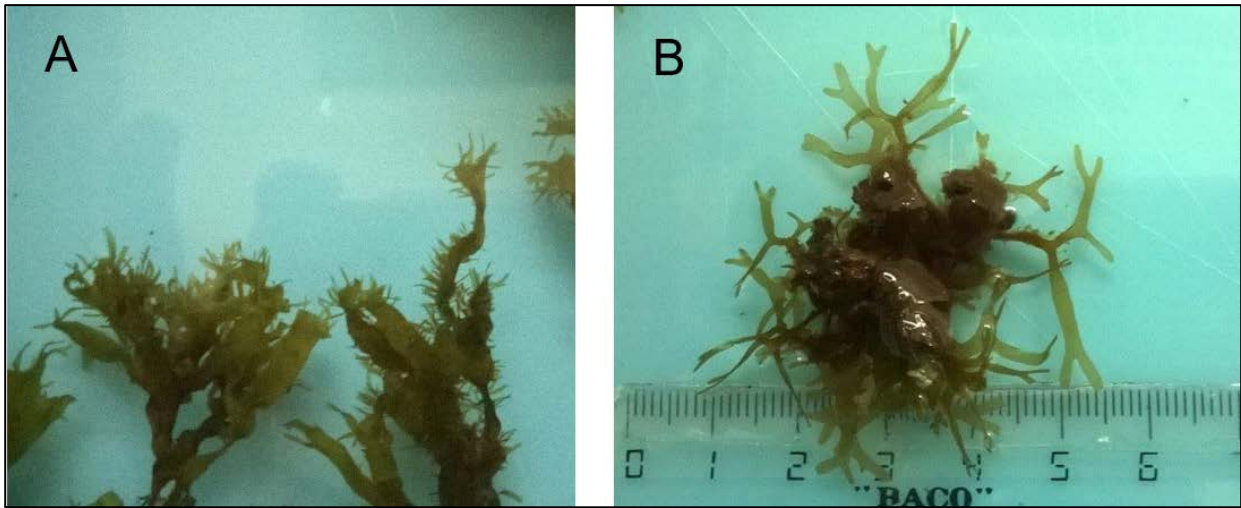


Fig. 3. Ejemplares de *D. ciliolata* en cultivo. A. Abundancia de proliferaciones (9 días de cultivo). B. Diferenciación en nuevos individuos. Foto del autor.



Fig. 4 Reproducción asexual por fragmentación vegetativa en *D. ciliolata*.

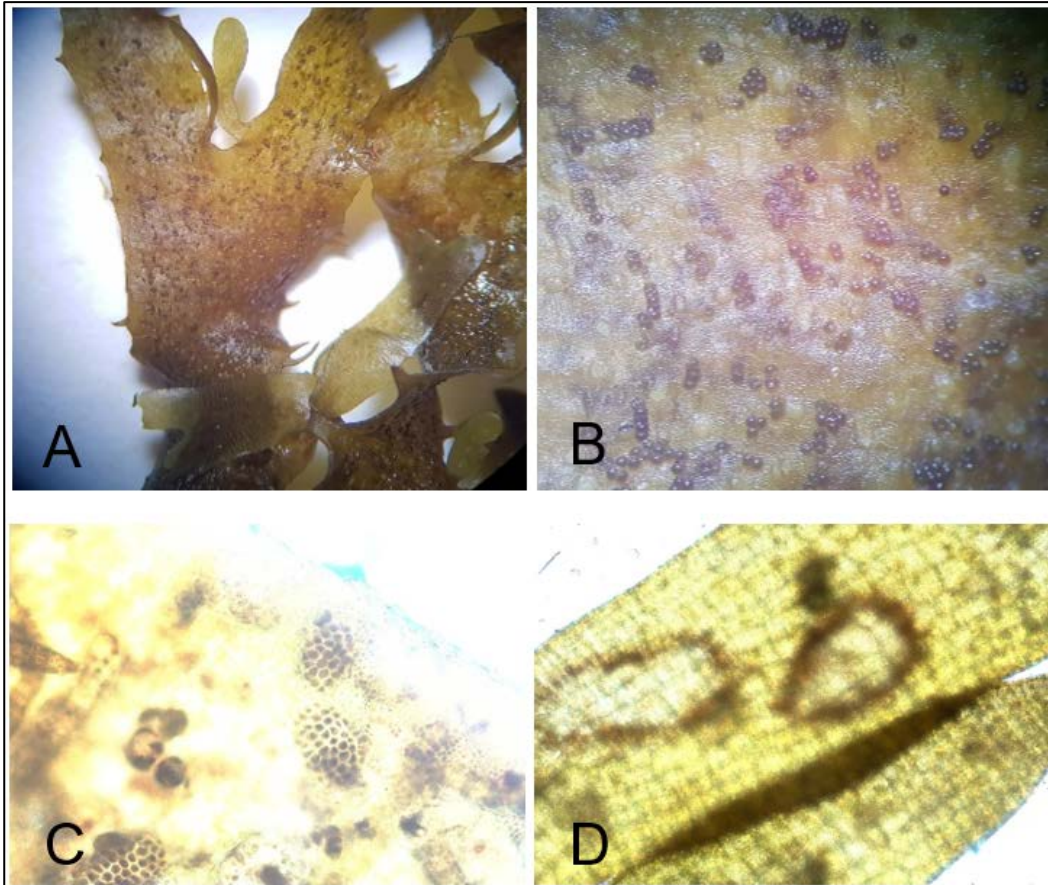


Fig. 5. Características reproductivas de *D. ciliolata*. A. Esporangios esparcidos sobre la superficie del filoide. B. Detalle de esporangios solitarios sobre la superficie. C. Gametofito femenino con soros oogoniales. D. Gametofito masculino con soros anteridiales. Fotos: Crescencia Chávez.

A los 22 días de cultivo en el fondo del acuario se observó una capa gelatinosa formada en su mayoría por gametofitos germinados que colonizaron todo el fondo. Durante la germinación, los gametofitos presentaron una prolongación basal septada, que se afina hacia el extremo y termina en un ligero ensanchamiento. Posteriormente en la parte apical del gametofito, se presentan haces de filamentos feofíceos septados que no terminan en punta, no descritos con anterioridad para esta etapa en esta especie, y por tanto se desconoce su función. Una semana después se detectó diferenciación celular y morfológica (Fig. 6).

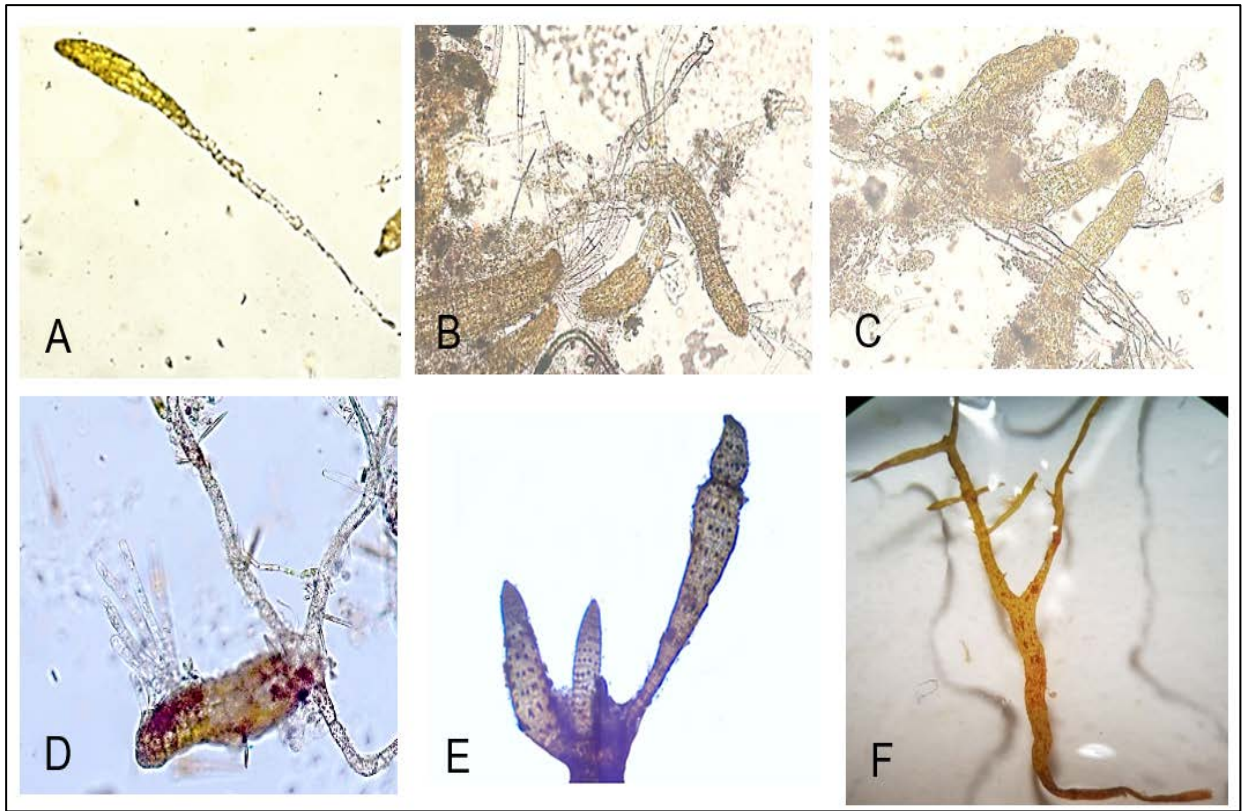


Fig. 6. Desarrollo de los gametofitos de *D. ciliolata*. A. Germinación del gametofito (Aumento 10x). B, C y D (Aumento 10x). Crecimiento de gametofitos con desarrollo de rizoides y filamentos feofíceos. E. Diferenciación celular de los gametofitos. F. Diferenciación morfológica. Fotos: Crescencia Chávez.

Halimeda scabra M. Howe.

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Chlorophyta

Phylum: Chlorophyta

Subphylum: Chlorophytina

Clase: Ulvophyceae

Orden: Bryopsidales

Familia: Halimedaceae

Género: *Halimeda* J.V.Lamouroux, 1812.

Talo formado por segmentos aplanados y calcificados con crecimiento erecto de hasta 7 cm en ocasiones con dicotomías. Segmentos constituidos de filamentos cenocíticos multiaxiales. Utrículos terminados en punta (Fig. 7). Se observó adherida a rocas por un disco basal. No se observaron estructuras reproductoras, sin embargo, durante el mantenimiento en acuario se observó reproducción asexual por segmentos.

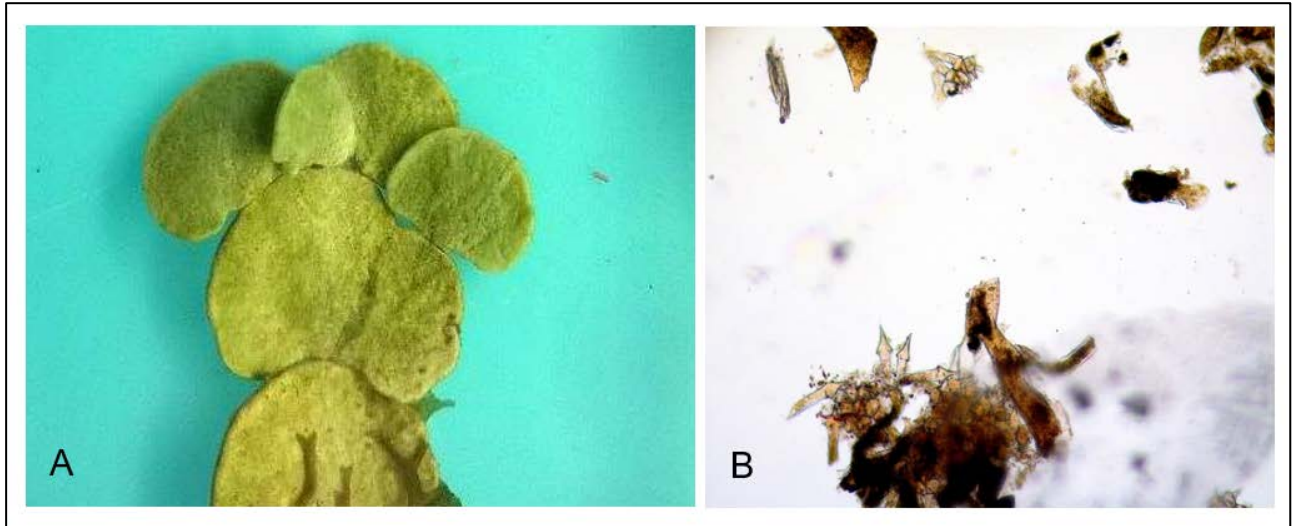


Fig. 7. *H. scabra*. A. Aspecto general. B. utrículos terminados en puntas (Aumento 40x).

1.3.2. Biomasa

Las variaciones en la biomasa están relacionadas con las estaciones del año, al presentar una interacción altamente significativa ($F_{(1, 36)} = 17.887$, $p = 0.00015$). Aunque la biomasa de *Halimeda* no varió significativamente, *D. ciliolata* presentó una disminución importante durante el período de lluvias de 2018 (Fig. 8).

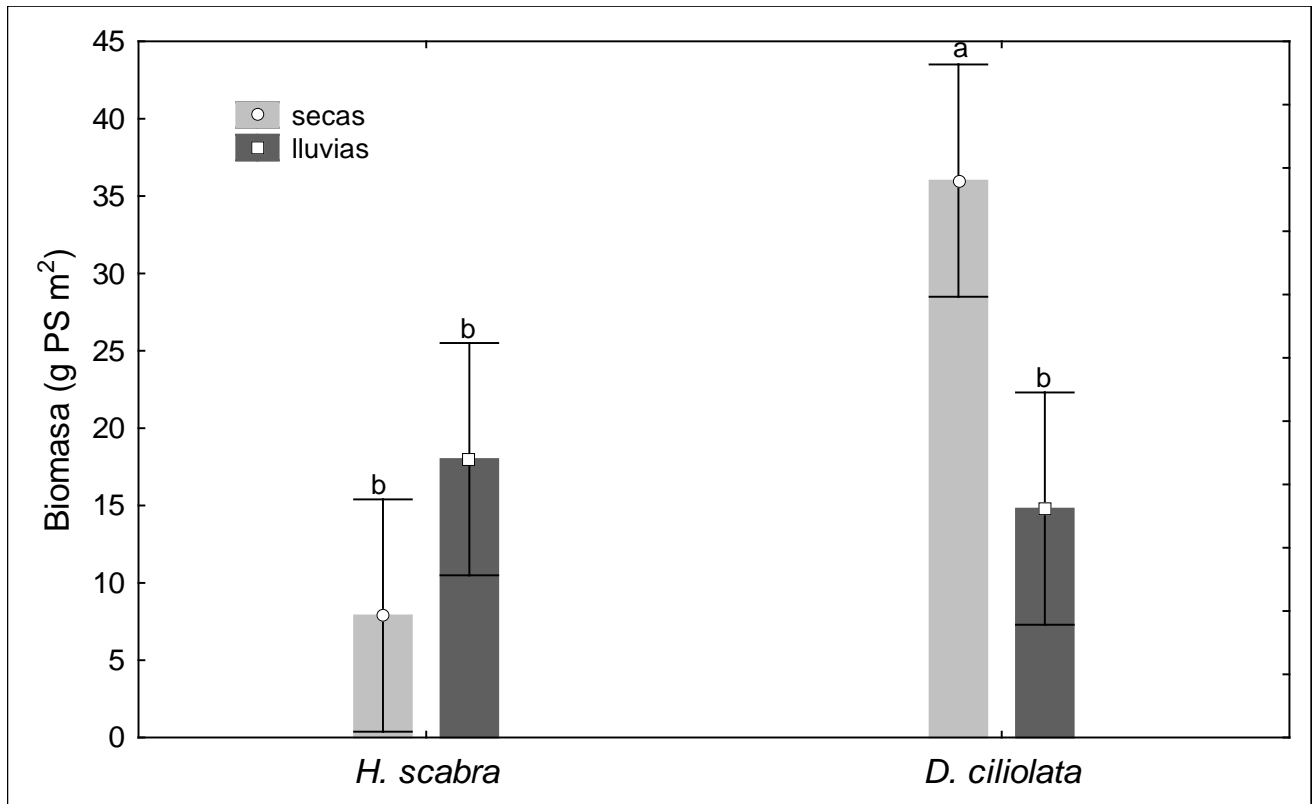


Fig. 8. Variación estacional de la biomasa por especies.

1.3.3. Fotosíntesis y respiración

Aunque *D. ciliolata* presentó valores de P_{max} superiores a los de *H. scabra*, este parámetro no se diferenció estacionalmente en ninguna de las dos especies ($F_{(1, 24)} = 0.007$, $p = 0.93$). En *D. ciliolata* la I_k ($F_{(1, 24)} = 3.575$, $p = 0.071$) y la α ($F_{(1, 24)} = 0.3985$, $p = 0.533$) fueron similares en ambos períodos, mientras que la fotosíntesis de *H. scabra* fue más eficiente en el período de lluvias con menor I_k . La respiración, R_d , mostró un incremento significativo en el período lluvioso en ambas especies ($F_{(1, 24)} = 16.731$, $p = 0.00042$) (Tabla 1).

Tabla 1. Variación estacional de la fotosíntesis y la respiración de *H. scabra* y *D. ciliolata* (media \pm Desviación estándar). Letras diferentes $p \leq 0.05$).

Especie	Estación	P_{max}	Eficiencia	I_k	R_d
		(mg O ₂ g PS h ⁻¹)	fotosintética (α)	(μ mol m ⁻² s ⁻¹)	(mg O ₂ g PS h ⁻¹)
<i>H. scabra</i>	secas	1.76 \pm 0.4 ^b	0.03 \pm 0.01 ^c	65.7 \pm 12.6 ^a	-1.25 \pm 0.39 ^d
	lluvias	2.00 \pm 0.5 ^b	0.05 \pm 0.01 ^c	38.97 \pm 6.2 ^b	-3.12 \pm 0.41 ^c
<i>D. ciliolata</i>	secas	14.52 \pm 1.0 ^a	0.20 \pm 0.03 ^b	72.8 \pm 10.1 ^a	-5.09 \pm 0.87 ^b
	lluvias	14.8 \pm 1.6 ^a	0.24 \pm 0.04 ^a	62.8 \pm 13.0 ^a	-9.92 \pm 1.61 ^a
ANOVA	especie	$p = 0.000^{***}$	$p = 0.00^{***}$	$p = 0.00^{***}$	$p = 0.000^{***}$
	estación	$p = 0.61^{ns}$	$p = 0.00^{***}$	$p = 0.00^{***}$	$p = 0.000^{***}$
	esp*est	$p = 0.93^{ns}$	$p = 0.533^{ns}$	$p = 0.07^{ns}$	$p = 0.000^{***}$

1.3.4. Pigmentos fotosintéticos

La *Chl a* presentó una interacción significativa de estaciones por especies ($F_{(1,32)} = 10.255$, $p \leq 0.005$). *Halimeda* presentó valores de *Chl a* más elevados en el período de secas de 0.593 \pm 0.177 mg/g superiores a los del período de lluvias y a los de *D. ciliolata* en el período de secas 0.420 \pm 0.085. De los pigmentos accesorios, la *Chl b*, solo presente en *Halimeda*, fue similar en ambos períodos ($t = 1.80$; $p \geq 0.05$); la *Chl c*, solo en *Dictyota*, fue superior en el período seco ($t = 14.73$; $p \leq 0.005$), mientras que los carotenos presentaron una interacción especie*estación altamente significativa ($F_{(1,32)} = 114.98$, $p \leq 0.001$) con valores superiores en la estación de secas en ambas especies (Tabla 2).

Tabla 2. Variación estacional del contenido de pigmentos fotosintéticos (media \pm Desviación estándar). Letras diferentes $p \leq 0.05$).

Pigmentos (mg g PS)	<i>H. scabra</i>		<i>D. ciliolata</i>	
	secas	lluvias	secas	lluvias
<i>Chl a</i>	0.593 \pm 0.177 ^a	0.46 \pm 0.04 ^b	0.420 \pm 0.085 ^b	0.50 \pm 0.08 ^{ab}
<i>Chl b</i>	0.604 \pm 0.195	0.49 \pm 0.04 ^{ns}		
<i>Chl c</i>			0.365 \pm 0.055 ^a	0.11 \pm 0.01 ^b
Carotenos	0.303 \pm 0.084 ^b	0.199 \pm 0.005 ^c	1.034 \pm 0.172 ^a	0.28 \pm 0.03 ^{bc}

1.3.5. Composición química

Los valores más elevados de carbohidratos se presentaron en el período de secas ($F_{(1, 20)} = 44.33$; $p \leq 0.001$), con niveles significativamente superiores en *D. ciliolata* ($F_{(1, 20)} = 169.35$; $p \leq 0.001$), entre 5.26 ± 1.35 y $8.65 \pm 0.72\%$ en lluvias y secas respectivamente. En *H. scabra* oscilaron entre $1.73 \pm 0.72\%$ en lluvias y $3.06 \pm 0.33\%$ en secas. La interacción resultó no significativa ($F_{(1, 20)} = 1.47$; $p \geq 0.05$) (Tabla 3). Contrario a los carbohidratos, las proteínas se incrementaron durante el período lluvioso ($F_{(1, 20)} = 27.3$; $p \leq 0.001$), y no presentaron diferencias significativas entre especies ($F_{(1, 20)} = 3.07$; $p \geq 0.05$) ni en la interacción estación x especie ($F_{(1, 20)} = 0.29$; $p \geq 0.05$) (Tabla 3). Los lípidos presentaron una interacción estación por especie no significativa ($F_{(1, 8)} = 3.8281$; $p \geq 0.05$), sin embargo, si existieron diferencia entre las estaciones ($F_{(1, 8)} = 6.6138$, $p \leq 0.05$) con los valores más elevados durante la estación de lluvias, y entre especies ($F_{(1, 8)} = 13.841$, $p \leq 0.001$), con un contenido superior en *D. ciliolata* entre $8.03 \pm 0.36\%$ en la estación de secas y $10.10 \pm 0.75\%$ en la de lluvias. En *H. scabra* el contenido de lípidos estuvo entre $7.28 \pm 0.49\%$ y $7.57 \pm 1.22\%$, y fueron similares en ambos períodos (Tabla 3). El contenido de cenizas, varió estacionalmente ($F_{(1, 20)} = 15.26$; $p \leq 0.001$), entre especies ($F_{(1, 20)} = 1040.99$; $p \leq 0.001$) y la interacción estación por especie ($F_{(1, 20)} = 8.97$; $p \leq 0.001$) y resultaron significativamente más altos en *Halimeda* con porcentajes similares entre estaciones entre $72.73 \pm 2.42\%$ y $74.06 \pm 1.49\%$ en secas y lluvias respectivamente. Mientras que los niveles en *Dictyota* solo alcanzaron 30.18 ± 0.54 en seca y fueron superiores en lluvia con 37.18 ± 4.59 (Tabla 3). El contenido de carbonatos varió estacionalmente en la especie calcificada, siendo superiores durante la seca $75.57 \pm 5.36\%$ respecto a la estación lluviosa que solo alcanzó $69.88 \pm 4.02\%$ ($t = 2.6833$; $p \leq 0.01$) (No mostrado).

Tabla 3. Composición química estacional (media \pm Desviación estándar). Letras diferentes representan $p \leq 0.05$, ^{ns} = no significativo.

Especies	Estación	Carbohidratos solubles (%)	Proteínas (%)	Cenizas (%)	Lípidos (%)
<i>H. scabra</i>	secas	3.06 ± 0.33^c	5.15 ± 0.84^b	72.73 ± 2.42^a	7.28 ± 0.05^b
	lluvias	1.73 ± 0.72^d	7.59 ± 0.86^a	74.06 ± 1.49^a	7.57 ± 1.22^b
<i>D. ciliolata</i>	secas	8.65 ± 0.72^a	6.52 ± 1.51^b	30.18 ± 0.54^b	8.03 ± 0.36^b
	lluvias	5.26 ± 1.35^b	8.16 ± 0.72^a	37.18 ± 4.59^c	10.10 ± 0.75^a
ANOVA	estación	$p = 0.000^{***}$	$p = 0.000^{***}$	$p = 0.000^{***}$	$p = 0.033^{**}$
	especies	$p = 0.000^{***}$	$p = 0.09^{ns}$	$p = 0.000^{***}$	$p = 0.005^{***}$

est.*esp.

$p = 0.24^{ns}$

$p = 0.59^{ns}$

$p = 0.007^{***}$

$p = 0.086^{ns}$

1.4. Discusiones

Dictyota ciliolata y *H. scabra* son macroalgas muy abundantes en zonas bajas rocosas de Xcalacoco, Quintana Roo, México. Ambas especies presentan dos tipos de reproducción (sexual y asexual), bien adaptadas a las condiciones ambientales locales. El éxito de *D. ciliolata* en muchos hábitats ha sido relacionado a su capacidad de reproducirse vegetativamente por fragmentación (Beach y Walters 2000), como ejemplo la abundancia *D. menstrualis* y *D. pulchella* ha sido explicada por este tipo de reproducción asexual (Herren *et al.* 2006). *Dictyota* presenta un ciclo de vida diplo-haplóntico, donde el gametofito haploide alterna con el esporofito diploide. No presenta dimorfismo sexual (isomórficos) (Liu *et al.* 2017), y pueden diferenciarse solamente por la presencia de las estructuras reproductivas. Las masculinas y femeninas se pueden distinguir fácilmente por la presencia de soros oogoniales o anteridiales en la superficie del talo (Bogaert *et al.* 2016). Otras características observadas son consistentes con las descripciones realizadas por Tronholm *et al.* (2013) como son esporangios solitarios que con frecuencia germinan sobre la superficie del talo, una célula apical prominente y la presencia de una sola hilera de células medulares grandes (médula sin capas). Aunque no fue un resultado esperado, en este trabajo se describe por primera vez la germinación del gametofito de *D. ciliolata*, el cual presenta una prolongación basal septada terminada en un ensanchamiento que pudiera estar relacionada con la nutrición al igual que los pelos feofíceos no descritos con anterioridad para esta etapa. La germinación de gametofitos también ha sido descrita en *D. dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux (Bogaert *et al.* 2016), pero las prolongaciones aparentan ser más cortas que las encontradas en el gametofito de *D. ciliolata*, y no presentan pelos feofíceos.

Halimeda scabra crece adherida a rocas por un disco basal, y puede alcanzar hasta 25 cm de alto, pero comúnmente no excede los 9 cm (Hillis-Colinvaux 1980). Con frecuencia es confundida con *H. tuna* (Howe 1905, Hillis-Colinvaux 1980), pero fácilmente identificada por la terminación en forma de espina característica de los utrículos de *H. scabra*. La amplia distribución y rápido crecimiento de *Halimeda* ha sido relacionada a su capacidad de obtener nutrientes de los sedimentos (Williams 1984), a su adaptación a las fluctuaciones de luz y a que puede tomar ventaja de los pulsos de nutrientes (Littler *et al.* 1988, Multer y Clavijo 2004), característicos de la zona de colecta. Aunque comúnmente presenta ambos tipos de reproducción (sexual y asexual) (Walters y Smith 1994, Vroom *et al.* 2003, Mayakun *et al.*

2012), solo fue observada la reproducción asexual por fragmentación. La importancia de la fragmentación como medio de reproducción asexual también ha sido documentada en *Halimeda discoidea* Decaisne con alta supervivencia de los fragmentos desprendidos por pastoreo de peces y/o por disturbios físicos (Walters y Smith 1994, Mayakun *et al.* 2012), en *H. tuna* J.Ellis & Solander, *H. opuntia* (Linnaeus) J.V.Lamouroux y en *H. goreau* W.R. Taylor (Walters *et al.* 2002). Lo cual puede aumentar rápidamente el número de plantas sin reproducción sexual (Vroom *et al.* 2003) y dispersar los individuos (Walters *et al.* 2002).

Los resultados confirmaron la hipótesis de que la biomasa, la fotosíntesis, los pigmentos y la composición química de *H. scabra* y *D. ciliolata* son diferentes, y varían estacionalmente. Ha sido demostrado que las variaciones en la biomasa de las macroalgas están correlacionadas con la temperatura y las irradiancias estacionales y son especie-específicas (Ateweberhan *et al.* 2006, Ferrari *et al.* 2012). En este estudio se encontró que *D. ciliolata* presentó las mayores biomásas durante la estación de secas. Resultados similares han sido hallados por Ateweberhan *et al.* 2006, quienes encontraron que *D. ciliolata* alcanzó mayor biomasa durante los meses de abril y mayo, mientras que las más bajas se presentaron durante el verano. Otras especies de *Dictyota* por el contrario presentan mayor biomasa en el verano como son *Dictyota pulchella* Hörning et Schnetter (Lirman y Biber 2000, Ferrari *et al.* 2012) y *Dictyota bartayresiana* Lamouroux (Lirman y Biber 2000). Las poblaciones de *Dictyota* aparentemente sobreviven a estaciones menos favorables limitando el crecimiento y forman nuevas poblaciones cuando regresan las condiciones favorables (Van den Hoek *et al.* 1995, Gauna *et al.* 2013), estos pequeños talos se corresponden con reducciones significativas de la biomasa durante la estación de lluvias. Las biomásas de *H. scabra* fueron similares en las estaciones de lluvias y de secas. Contrariamente, las biomásas de *H. incrassata* (J.Ellis) J.V.Lamouroux (Van Tussenbroek y Van Dijk 2007) y *H. opuntia* (Ferrari *et al.* 2012) aumentan durante la estación de lluvias.

Las diferentes respuestas a los cambios estacionales a corto plazo entre la fotosíntesis y la respiración pueden explicarse por la observación de que las reacciones fotosintéticas generalmente son menos afectadas por la temperatura que las reacciones enzimáticas de la respiración (Davison 1991), aunque también están influenciadas por el estado fisiológico y la disponibilidad de nutrientes (Aalderink y Jovin 1997). El incremento de la R_d en la estación de lluvias, con temperaturas más elevada, en ambas especies sigue la ley de Arrhenius, que explica que cualquier reacción química mediada por una enzima va a ser más probable que ocurra a mayor temperatura (Arrhenius 1889, Vásquez-Elizondo y Enríquez 2016).

La fotosíntesis, la R_d y la biomasa de *D. ciliolata* fueron superiores a las de *H. scabra*, lo cual podría deberse a que estas especies pertenecen a diferentes grupos morfofuncionales. Existe una relación general entre el grosor del tejido y el comportamiento fotosintético de los organismos con fuertes y positivas relaciones entre la P_{max} y la pendiente inicial de la curva PI (α), entre la P_{max} y la R_d , y entre estos con el grosor del talo, donde las especies con tejidos más finos generalmente presentan un metabolismo alto y un crecimiento más rápido (Enríquez *et al.* 1995, Enríquez *et al.* 1996). Una ventaja de las especies de láminas delgadas y las filamentosas es la capacidad de crecimiento rápido, que se combina con altas tasas fotosintéticas por unidad de biomasa (Littler *et al.* 1983, Falkowski y Raven 1997).

Al igual que los parámetros fotosintéticos, los contenidos de pigmentos también varían con la morfología y la taxonomía (Enríquez *et al.* 1996, Miller *et al.* 2006, Wing *et al.* 2007, Raven y Hurd 2012). *Halimeda* presentó altos contenidos de *Chl a* y *b*, mientras que *Dictyota* presentó altos contenido de *Chl c* y carotenos. El incremento de los pigmentos en la época de secas podría ser explicado porque en ciertos períodos de tiempo, las tasas fotosintéticas netas deben ser lo suficientemente altas para que las algas puedan promover el crecimiento, la reproducción, y el almacenamiento de energía para hacer frente a la reducida disponibilidad de luz típica de la estación de invierno (secas) (Hanelt y Figueroa 2012). En condiciones de poca luz, los organismos autótrofos invierten más energía en la síntesis de pigmentos de la antena, mientras que en luz fuerte (lluvioso) invierte más energía en la síntesis de enzimas fotosintéticas, componentes de la cadena de electrones, así como estructuras fotoprotectoras y mecanismos de disipación de energía (Ramus *et al.* 1976, 1977, Hanelt y Figueroa 2012). De acuerdo con Rosenbergl y Ramus (1982) las variaciones de luz, nutrientes o temperaturas provocan un acomodo del aparato fotosintético en las algas que puede implicar cambios tanto en la concentración como en la proporción de los pigmentos de la antena.

La mayoría de los parámetros ambientales varían según la estación por lo que pueden estimular o inhibir la biosíntesis de nutrientes (Lobban *et al.* 1985; Anantharaman *et al.* 2010). Las proteínas, los carbohidratos y los lípidos son los componentes bioquímicos más importantes de las algas (Khairy y El-Shafay 2013) y se ven afectados por las especies, el área geográfica, la estación del año, la temperatura del agua y la disponibilidad de nutrientes (Jensen 1993, Dawczynski *et al.* 2007, Anantharaman *et al.* 2010, Goecke *et al.* 2012). Ha sido reconocido que en las algas marinas el período de síntesis activa de carbohidratos se caracteriza por la disminución de proteínas y viceversa (Rosenberg y Ramus 1982, Rotem *et al.* 1986, Mouradi-Givernaud *et al.* 1993, Mwalugha *et al.* 2015), soportando el incremento de carbohidratos en

secas y el incremento de las proteínas en lluvias encontrado en este trabajo. Variaciones estacionales en los carbohidratos de *D. ciliolata* también han sido hallados por Renaud y Luong-Van (2006) con valores de 20.3% en secas y 15.2% en verano. Contrario a nuestros resultados, valores superiores de carbohidratos del 65% han sido reportados en esta especie por Chale-Dzul *et al.* (2017). El porcentaje de proteínas encontrados en *D. ciliolata* en este trabajo (6.1 – 8.2%) es semejante a los encontrados por Renaud y Luong-Van (2006) (4.1– 10.7%), y superiores a los encontrados por Al-Saif *et al.* (2014) (3.12%) en esta misma especie.

De manera general, la composición química de carbohidratos y proteínas de *D. ciliolata* fueron superiores a los de *H. scabra*, lo cual podría deberse al mayor contenido de materia orgánica en *Dictyota*, mientras que la especie calcificante presenta mayor contenido de cenizas. Los contenidos de proteínas, lípidos y cenizas son comparables a los encontrados por Renaud y Luong-Van (2006) en *D. ciliolata*, e inferiores a los de carbohidratos encontrados por los mismos autores. De manera similar los contenidos de carbohidratos, proteínas, lípidos y cenizas de *H. scabra* son semejantes a los encontrados en *H. macroloba* y *H. opuntia* (Renaud y Luong-Van 2006). Si bien los carbohidratos constituyen el componente mayoritario y más importante para el metabolismo, ya que suministra la energía necesaria para la respiración y otros procesos metabólicos (Khairy y El-Shafay 2013), en *Halimeda*, sin embargo, su contenido es muy bajo. Los bajos contenidos de carbohidratos encontrados en *H. scabra* en este trabajo) están en el rango de los hallados en *H. opuntia* (2.5%) y *H. macroloba* (2.7%) (Renaud y Luong-Van 2006). De forma similar el contenido de proteínas de *H. scabra* (5.1 – 7.6%) es comparable a los de *H. opuntia* (3.2%), *H. macroloba* (6.6%) (Renaud y Luong-Van 2006), y *H. macroloba* (5.28%) Mwalugha *et al.* (2015).

Los altos valores de lípidos encontrados en *D. ciliolata* durante la estación de lluvias pudiera deberse a que los lípidos están asociados a varias etapas de resistencia de las algas (Miller 1962, Khairy y El-Shafay 2013). También ha sido reconocido que su incremento es una respuesta a la disminución de nitrógeno en el medio ambiente (Zavodnik 1973, Medeiros 1998) y a que su síntesis es estimulada por la luz (Murthy y Radia 1978). Aunque parece más probable que estos altos valores sean una característica intrínseca del orden Dictyotales, ya que han sido encontrados altos contenidos de lípidos basados en peso seco en *D. sandvicensis* Kütz (20.2%), *D. acutiloba* J. Agardh (16.1%) (McDermid y Stuercke 2003), y *D. dichotoma* (10– 12%) (Gosch *et al.* 2012). El contenido de lípido encontrado en *D. ciliolata* en este trabajo es comparable a los hallados por Renaud y Luong-Van (2006) en la misma especie (7.1-7.8%), y a los de *D. dichotoma* (7.5 %) (El-Shenody *et al.* 2019). Aunque el contenido de lípidos en la

mayoría de las macroalgas generalmente es inferior al 5% del peso seco (Kumari *et al.* 2010, Gosch *et al.* 2012), altos valores también han sido hallados en Bryopsidales (*Derbesia tenuissima* (Moris & De Notaris) P.Crouan & H.Crouan, 12–13%), por lo que ha sido reconocido como un orden rico en lípidos (Gosch *et al.* 2012). El contenido de lípidos encontrado en *H. scabra* es superior a los hallados en *H. macroloba* Decaisne (2.5%) y en *H. opuntia* (2.9%) (Renaud y Luong-Van 2006).

El contenido de cenizas de *D. ciliolata* (este trabajo) es comparable a los de *D. bartayresiana* (30%) y *D. cervicornis* Kützinger (36.5%) (Mwalugha *et al.* 2015), mientras que los de *H. scabra* se encuentran en el rango de los encontrados en *H. macroloba* (64%), *H. opuntia* (89.7) (Renaud y Luong-Van 2006), y *H. macroloba* (66.07%) (Mwalugha *et al.* 2015), y están en correspondencia con el alto contenido carbonatos. Alto contenido de carbonatos es típico del género, como ejemplo en *H. macroloba* se han encontrado de 67.87 – 80.88% (Sinutok *et al.* 2008) y más de 80% (82.46%) (Mayakun *et al.* 2014). Una disminución del contenido de carbonatos en el período de lluvias también ha sido documentada en *H. macroloba* (Sinutok *et al.* 2008).

1.5. Conclusiones

H. scabra y *D. ciliolata* presentan dos tipos de reproducción lo cual podría garantizar sus éxitos reproductivos en el área. Se describe por primera vez la germinación del gametofito de *D. ciliolata* con una prolongación basal septada y pelos feofíceos. *H. scabra* presenta biomasa similares en ambas estaciones mientras que la de *D. ciliolata* disminuye durante la estación de lluvias, lo cual está relacionado con los ciclos naturales de la especie. Las variaciones en la fotosíntesis y los pigmentos fotosintéticos entre especies se relacionaron a los diferentes GMF. En ambas especies la P_{max} se mantuvo estacionalmente similar, el contenido de pigmentos se incrementó en la estación de secas y la respiración en la de lluvias. Los contenidos de carbohidratos y proteínas presentaron comportamientos opuestos como parte del período de síntesis típicos de estos compuestos. Los altos contenidos de lípidos encontrados en ambas especies parecen ser una característica intrínseca de los órdenes Dictyotales y Bryopsidales. Los carbonatos de la especie calcificante disminuyeron durante la estación de lluvias. Aunque el estudio permitió caracterizar el comportamiento estacional de los principales parámetros ecofisiológicos en ambas especies, son necesarios más estudios que permitan identificar las condiciones que favorecen la abundancia de estas especies en el Caribe, como son sus

respuestas a la interacción de varios factores y la presencia de Mecanismos de Concentración de Carbono (MCC).

CAPÍTULO 2

Respuestas fotosintéticas de *Halimeda scabra* (Chlorophyta, Bryopsidales) al efecto interactivo de la temperatura, el pH y los nutrientes



Publicado en la revista *PeerJ* 2021

DOI:10.7717/peerj.10958

RESUMEN

Se evaluaron los efectos interactivos de la temperatura, el pH y los nutrientes sobre el rendimiento fotosintético de la macroalga tropical calcificante *Halimeda scabra*. La absorción de bicarbonato (HCO_3^-) por la especie se evaluó mediante la abundancia natural de isótopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en tejidos de algas, y la incorporación del isótopo $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ en productos fotosintéticos. Adicionalmente se evaluó la posible actividad de la enzima anhidrasa carbónica (AC) sobre la fotosíntesis mediante la utilización de los inhibidores Acetazolamida, AZ y Etoxizolamida, EZ. Se encontró una interacción significativa de los factores ambientales (temperatura, pH y nutrientes) sobre la fotosíntesis bruta (P_{gross}). Los mayores valores de P_{gross} fueron alcanzados con la temperatura más elevada, el pH más básico y con el nivel de nutrientes alto y en el tratamiento control (sin adición de nutrientes), a 33°C de temperatura y el pH más bajo (7.5). La abundancia natural de isótopos estables de carbono, $\delta^{13}\text{C}$, indicó que la especie utiliza ambas formas de carbono inorgánico (C_i), CO_2 y HCO_3^- . La incorporación del isótopo ^{13}C en el aspartato en tres tratamientos de fotoperíodos validó absorción de HCO_3^- y sugirió actividad de fotosíntesis C4. El inhibidor de la actividad de la AC extracelular AZ, no mostró efecto sobre la fotosíntesis mientras que EZ (inhibidor de la actividad de la AC intracelular) provocó una inhibición del 22% de la fotosíntesis.

ABSTRACT

Interactive effects of temperature, pH and nutrients levels on the photosynthetic performance of the calcifying tropical macroalgae *Halimeda scabra* were evaluated. The absorption of bicarbonate (HCO_3^-) by the species was evaluated by the natural abundance of stable isotopes of carbon ($\delta^{13}\text{C}$) in algae tissues, and the incorporation of the isotope $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ in photosynthetic products. The possible activity of the carbonic anhydrase enzyme (AC) on photosynthesis was evaluated using the inhibitors Acetazolamide, AZ and Ethoxizolamide, EZ. A significant interaction of environmental factors (temperature, pH and nutrients) on gross photosynthesis (P_{gross}) was found. The highest P_{gross} values were reached with the highest temperature, the most basic pH and with the high nutrient level and in the control treatment (no added nutrients), at temperature of 33°C and the lowest pH (7.5). The natural abundance of stable isotopes of carbon, $\delta^{13}\text{C}$, indicated that the species uses both forms of inorganic carbon (C_i), CO_2 and HCO_3^- . The incorporation of the ^{13}C isotope in aspartate in three photoperiod

treatments validated HCO_3^- absorption and suggested C4 photosynthesis activity. The inhibitor of extracellular AC activity AZ showed no effect on photosynthesis while EZ (inhibitor of intracellular AC activity) caused a 22% inhibition of photosynthesis.

2.1. Introducción

La fotosíntesis es considerada el principal indicador del rendimiento, adaptación y estado fisiológico de los organismos fotosintéticos (Walaku 2006), y sus reacciones fotoquímicas y bioquímicas continuamente responden a las condiciones ambientales. La irradiancia, la temperatura, la concentración de CO_2 y la concentración de nutrientes se encuentran entre los principales factores ambientales que afectan la fotosíntesis (Raven y Hurd 2012, Zweng *et al.* 2018). Ha sido documentado que los parámetros fotosintéticos responden a los cambios ambientales más rápido que el contenido de C y N en tejidos del alga, de ahí su utilidad en estudios a corto plazo (Figueroa *et al.* 2009).

La temperatura es uno de los principales factores que influyen sobre la fotosíntesis (Davison 1991, Pedersen *et al.* 2004, Bruno *et al.* 2015). Se ha encontrado que los procesos metabólicos aumentan con la temperatura (Herzka y Dunton 1997, Hubas *et al.* 2006, Zou y Gao 2014, Vásquez-Elizondo y Enríquez 2016). Incrementos de la temperatura han mostrados respuestas contrastantes entre las diferentes especies de macroalgas (Schnerer *et al.* 2016) y se ha sugerido que en *Halimeda* pudiera mitigar el efecto negativo de la acidificación (Campbell *et al.* 2015).

Para los autótrofos marinos, otro factor crítico es el CO_2 ya que es la única fuente directa de carbono que puede ser asimilada por la enzima de carboxilación ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) en la fotosíntesis (Badger *et al.* 1998, Falkowski y Raven 2007). Sin embargo, en el agua de mar normal (pH 8.1 – 8.3), el CO_2 solo se encuentra entre el 0.5 y el 1% de todo el carbono inorgánico disuelto, mientras que más del 90% está en forma de HCO_3^- (Falkowski y Raven 1997, Hurd *et al.* 2009, Diaz-Pulido *et al.* 2016). La fotosíntesis en ambientes acuáticos está expuesta a una mayor limitación por la disponibilidad de carbono que en los ecosistemas terrestres (Madsen y Sand-Jensen 1991, Enríquez y Rodríguez-Román 2006). Esta limitación es causada en primer lugar por la lenta difusión de los gases y solutos en el agua mar (CO_2 y el HCO_3^-) que es más baja que en el aire en un orden de magnitud de 4 a 5 (Raven 1984, Enríquez y Rodríguez-Román 2006); y en segundo lugar debido al hecho de que a pH marino la mayor parte del carbono inorgánico está en forma de un ion bicarbonato, que no

es fácilmente asimilable por los organismos (Enríquez y Rodríguez-Román 2006). En el agua de mar normal (pH 8.1 – 8.3, salinidad 35 psu, y temperatura de 5 a 25°C), la mayoría del carbono inorgánico disuelto (CID) (~90%) se encuentra en forma de bicarbonato (HCO_3^- 2.0 – 2.2 mM) seguido por el CO_3^{2-} con ~9%, y el CO_2 con ~1% (10.2 - 18.8 μM) (Raven 1984, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Zou *et al.* 2011). El CO_2 y el HCO_3^- son las únicas formas de C_i que pueden ser utilizadas como fuente de carbono para la fotosíntesis, de ellas el CO_2 puede penetrar fácilmente por difusión a través de la pared celular de las algas, mientras que el HCO_3^- (por ser una molécula grande con carga negativa) no puede pasar a través de la doble capa lipídica de la membrana plasmática (Larkum *et al.* 1989, Fernández *et al.* 2014) y necesita de mecanismos de transporte específicos para ingresar a la célula. Han sido propuestos tres mecanismos para la adquisición del HCO_3^- (1) deshidratación extracelular del HCO_3^- en CO_2 catalizada por una enzima anhidrasa carbónica (AC) localizada en la pared celular de la mayoría de las algas (Bowes 1969, Smith y Bidwell 1987, 1989, Bjork *et al.* 1992). (2) absorción directa de HCO_3^- mediante una proteína de intercambio aniónico localizada en el plasmanema; este mecanismo fue sugerido por una relativa insensibilidad a la acetazolamida en condiciones de pH alto (Beer *et al.* 2002) y un incremento de la fotosíntesis neta a pH alto (Carlberg *et al.* 1990, Larsson *et al.* 1990, Axelsson *et al.* 1991). De esta manera, el HCO_3^- se acumula interiormente y requiere de una AC interna para ser convertido a CO_2 (Fernández *et al.* 2014). (3) absorción activa de C_i por medio de una ATPasa (Raven y Lucas 1985, Mercado *et al.* 1998, Giordano *et al.* 2005, Fernández *et al.* 2014).

La anhidrasa carbónica son una familia de enzimas que catalizan la conversión reversible del HCO_3^- a CO_2 (Badger y Price 1994), y en general, en las algas han sido encontradas tanto dentro de la célula como externamente en la membrana celular (Tsuzuki y Miyachi 1989, Invers *et al.* 1999) y pueden actuar como un MCC para el mantenimiento de la fotosíntesis (Enríquez y Schubert 2014). La AC externa facilita la conversión extracelular del HCO_3^- en CO_2 , facilitando la difusión de este último, a pesar de lo cual algunas algas no han mostrado indicios de actividad de la CA extracelular (Cook *et al.* 1986, 1988, Bjork *et al.* 1991). La AC interna tiene diferentes funciones dependiendo de su localización (Sültemeyer 1998, Fernández *et al.* 2018). La AC citosólica ayuda a mantener el equilibrio entre las concentraciones de C_i y el pH interno para evitar cualquier fuga de CO_2 fuera de la célula cuando el gradiente de concentración es mayor dentro de la célula (Fernández *et al.* 2014, Fernández *et al.* 2018). La AC mitocondrial limita la fuga potencial de CO_2 del citosol al medio (Raven 2001, Fernández *et al.* 2018). La AC del cloroplasto es responsable del suministro de CO_2 al sitio activo de Rubisco (Badger y Price

1994, Fernández *et al.* 2018). Por tanto, las AC son esenciales en el proceso fotosintético permitiendo, el rápido suministro de CO₂ a la enzima, ribulosa1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Surif and Raven 1989; Raven 1995), y para otras reacciones metabólicas como la fotorrespiración, calcificación, y homeostasis de pH intracelular (Badger 2003; Hofmann *et al.* 2013; Bi y Zhou 2016, Fernández *et al.* 2018). La actividad de la AC ha sido ampliamente documentada (Borowitzka y Larkum 1976, Holbrook *et al.* 1988, Reiskind *et al.* 1988, Giordano y Maberly 1989, Reiskind y Bowes 1991, Badger y Price 1994, Beer y Rehnberg 1997, Invers *et al.* 1999, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Moulin *et al.* 2011).

Como la Rubisco está menos de la mitad de saturada bajo los niveles actuales de CO₂ en el agua de mar (Giordano *et al.* 2005), muchas algas y plantas superiores han adquirido mecanismos que promueven la acumulación intracelular de CO₂ y permiten que los organismos fotosintéticos reduzcan el efecto de la limitación de carbono al incrementar la concentración de CO₂ en la proximidad de la Rubisco (Mecanismos de Concentración de CO₂, MCC) (Badger 1987, Badger y Andrews 1987, Giordano *et al.* 2005, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Cornwall *et al.* 2015).

Muchos estudios han examinado los efectos combinados de variables ambientales sobre las respuestas fotosintéticas de las algas: CO₂ y temperatura (Campbell *et al.* 2016, Kram *et al.* 2016, Vásquez-Elizondo y Enríquez 2016); CO₂ y luz (Vogel *et al.* 2015); luz y nutrientes (Zubia *et al.* 2014); CO₂ y nutrientes (Zou *et al.* 2011, Hofmann *et al.* 2014, Hofmann *et al.* 2015, Bender-Champ *et al.* 2017); CO₂, nutrientes, y temperatura (Stengel *et al.* 2014), and CO₂, nutrientes y luz (Celis-Plá *et al.* 2015). Múltiples estresores probablemente tengan influencias acumulativas o interactivas que causen respuestas más complejas pero significativas a nivel fisiológico y ecológico que cualquier factor estresante por separado (Hofmann *et al.* 2014) haciéndolos difícil de interpretar. Son particularmente necesarios estudios que combinen escenarios de acidificación oceánica con otros factores como la temperatura, la luz y la disponibilidad de nutrientes, ya que los cambios en estos parámetros están coocurriendo con los cambios en la química del carbonato en el agua de mar (Zou *et al.* 2011, Harley *et al.* 2012, Hofmann *et al.* 2014).

Halimeda es un género de algas verdes sifonadas calcificantes (Bryopsidales, Chlorophyta) que son componentes importantes en los arrecifes y lagunas tropicales y subtropicales. Algunas especies de este género con frecuencia aparecen dominando en los arrecifes de coral del Caribe (Shulman y Robertson 1996, Lirman y Biber 2000, Beach *et al.* 2003, Hofmann *et al.*

2014), donde como productores primarios constituyen una fuente de alimento y hábitat (Hillis-Colinvaux 1980, Verbruggen y Kooistra 2004, Campbell *et al.* 2016).

Las respuestas fotosintéticas al efecto interactivo de factores ambientales, han sido estudiadas en algunas especies de *Halimeda*, como ejemplo, en *H. opuntia* (Linnaeus) J.V.Lamouroux, ha sido investigado el efecto de los nutrientes y el pH (Hofmann *et al.* 2014, Hofmann *et al.* 2015), el efecto del pH y la temperatura (Campbell *et al.* 2016) y del pH y la luz (Vogel *et al.* 2015). En *H. incrassata* (J.Ellis) J.V.Lamouroux y *H. simulans* M.Howe, se evaluó el efecto del pH y la temperatura (Campbell *et al.* 2016). Un incremento en CO₂ (pH bajo) y alta temperatura podrían tener un efecto positivo sobre las tasas fotosintéticas (Kram *et al.* 2016). Sin embargo, las respuestas de *Halimeda* a altas concentraciones de CO₂ han sido diversas; en algunas especies se ha observado una disminución en la fotosíntesis con la reducción del pH (Price *et al.* 2011, Sinutok *et al.* 2012, Meyer *et al.* 2016), otras han mostrado un efecto opuesto (Peach *et al.* 2016) o no han mostrado respuesta significativa (Price *et al.* 2011, Campbell *et al.* 2016). En general, aún son insuficientes los estudios sobre la fisiología del género *Halimeda* que permitan entender la diversidad de las respuestas fisiológicas al efecto interactivo de variables ambientales y los mecanismos involucrados en esas respuestas.

En este estudio se contrastó la hipótesis de que “el incremento interactivo de tres factores ambientales (temperatura, pH, and nutrientes) favorecería la fotosíntesis de *H. scabra*, la cual absorbe bicarbonato y los incorpora en los productos de la fotosíntesis”. Basado en ello, se evaluó el efecto interactivo de la temperatura, el pH y niveles de nutrientes sobre las respuestas fotosintéticas de *H. scabra*. Adicionalmente, se determinó la utilización de bicarbonato como fuente de carbono para la fotosíntesis mediante la abundancia natural de isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en tejidos del alga y la incorporación del isótopo estable ^{13}C en los productos resultantes de la fotosíntesis. Adicionalmente, se investigó la actividad de las AC externa e interna mediante el efecto de inhibidores de AC sobre P_{max} .

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Material biológico y condiciones de mantenimiento

Muestras de *Halimeda scabra* Howe fueron colectadas en febrero de 2017 en Xcalacoco, Quintana Roo, Caribe Mexicano (20.660035 N, -87.034655 W), donde crece sobre sustrato rocoso, entre 1.5 y 2.0 m de profundidad. En el área existen dos estaciones: una temporada de secas de noviembre a mayo, y una temporada de lluvias de junio a octubre. En la primera, la

temperatura superficial media del agua de mar es de $\sim 24^{\circ}\text{C}$, mientras en la segunda estación, coincidente con el verano, las temperaturas más altas ocurren en agosto con una máxima media mensual de $\sim 30^{\circ}\text{C}$ pudiendo presentarse valores superiores. La media anual de la temperatura superficial del agua de mar es de $\sim 28^{\circ}\text{C}$ (Robledo y Freile-Pelegrín 2005, Álvarez-Cadena *et al.* 2007, Rodríguez-Martínez *et al.* 2010, Scheufen *et al.* 2017). La irradiancia diurna se incrementa progresivamente de enero a mayo y declina de julio a diciembre (Scheufen *et al.* 2017). La zona se caracteriza además por las descargas submarinas de agua hacia el ambiente costero (Crook *et al.* 2012, Hernández-Terrones *et al.* 2015) lo cual constituye una ruta para el transporte de nutrientes (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , SRP, SRSi) y otros contaminantes desde la tierra al ambiente marino (Hernández-Terrones *et al.* 2015) confiriendo un comportamiento en pulsos a los nutrientes, la salinidad y el pH. El último con importantes variaciones desde 7.0 a 8.5 (Hernández-Terrones *et al.* 2015).

H. scabra fue seleccionada por su abundancia en el área y la ausencia de estudios fisiológicos. Su determinación taxonómica se realizó según los criterios de Howe (1905) y Hillis-Colinvaux (1980). Las algas colectadas fueron transportadas al laboratorio en bolsas Ziploc a temperatura reducida en neveras con hielo. En el laboratorio, se limpiaron con agua de mar y cepillo de cerdas finas para eliminar epífitas. Posteriormente se colocaron en acuarios de 12 L conteniendo agua de mar filtrada (36 PSU, pH 8.2) con recambios diarios de 1/3 del agua, irradiancia de $115 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ proporcionada con lámparas fluorescentes con fotoperiodo de 12:12 horas (luz:oscuridad), a 24°C de temperatura, y burbujeo constante de aire.

2.2.2. Mediciones fotosintéticas

Para evaluar el efecto interactivo de la temperatura, el pH y los niveles de nutrientes sobre la fotosíntesis de *H. scabra*, fue usado un diseño trifactorial con 36 combinaciones (Zar 1996) (Tabla S1). Los siguientes tratamientos y niveles fueron probados: 1) temperatura con tres niveles (24 , 28 and 33°C) mantenidos constantes colocando las botellas de DBO en un baño de agua conectado a un sistema de recirculación (Cole-Parmer® Polystat® Refrigerated Recirculator, USA); 2) pH con tres niveles (7.5 , 8.2 , y 8.6) obtenidos por adición de soluciones de 0.5 M HCl o 0.5 M NaOH (Lignell y Pedersén 1989, Invers *et al.* 2001, Zou 2014); 3) nutrientes ($\text{KNO}_3:\text{K}_3\text{PO}_4$) evaluados en cuatro niveles: bajo ($1:0.1 \mu\text{M}$), medio ($5:0.5 \mu\text{M}$), alto ($10:1.0 \mu\text{M}$), y 4) tratamiento control (agua de mar sin adición de nutrientes). Los niveles de temperaturas, pH y nutrientes fueron seleccionados de acuerdo con las condiciones

prevalecientes en el área de colecta descritas previamente. Para la preparación de los tratamientos (combinaciones) primeramente se ajustó el pH del agua de mar, 48 horas más tarde el pH fue medido nuevamente y reajustado cuando fue necesario. Posteriormente se adicionaron los nutrientes de acuerdo con el nivel de nutrientes requerido (Lignell y Pedersén 1989).

Las respuestas fotosintéticas fueron evaluadas por el método de las botellas claro-oscuras siguiendo la evolución del oxígeno vs la irradiancia (Thomas 1988) usando un Oxímetro YSI 5000 con sonda BOD YSI 5905 (YSI Incorporated Yellow Springs, Ohio, USA). Para minimizar el efecto de la lesión, los talos fueron cortados y pesados 24 horas previas a las mediciones de oxígeno. Fragmentos apicales de 0.1 g de peso fresco se colocaron en botellas de DBO de 60 ml conteniendo el agua de mar preparada de acuerdo con el tratamiento correspondiente. Para evaluar cada tratamiento se usaron siete botellas ($n = 7$), más una botella adicional con agua de mar, sin tejidos, utilizada como blanco. Cada tratamiento (combinación) fue evaluado en días separados y con diferentes fragmentos de tejidos de algas y de acuerdo con el nivel de temperatura establecido en la Table S1.

Una vez ajustada la temperatura, las algas fueron expuestas durante una hora a cada una de las siete intensidades luminosas sucesivas seleccionadas (0, 100, 170, 200, 272, 436, 770 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$), generadas con una lámpara de halógeno de 500 W, y reducidas con filtros de mallas oscuras hasta total oscuridad. Entre cada medición las botellas fueron rellenadas y agitadas. Las irradiancias fueron medidas con un sensor esférico underwater quantum sensor (LI-193SA) conectado a un sensor de luz Light Sensor Logger LI-COR LI-1500 (LI-COR, Nebraska USA). La fotosíntesis máxima (P_{max}) se calculó como el promedio de los tres valores de producción de oxígeno más altos a irradiancia de saturación. Mientras que la respiración (R_d) se determinó como el consumo de oxígeno en total oscuridad. La fotosíntesis bruta (P_{gross}) fue determinada como la fotosíntesis neta más respiración oscura. Al final de cada medición, se determinó el peso seco de las muestras, por lo que los resultados se expresaron como $\text{mg O}_2 \text{ g peso seco h}^{-1}$ en 300 ml. Las evaluaciones se realizaron utilizando agua de mar sintética Instant Ocean® (Marineland, USA) con alcalinidad entre 3.0 - 4.0 mEq / L, carbonato/bicarbonato de 200 ppm, libre de nitrato y fosfato (excepto para los tratamientos experimentales de niveles de nutrientes) preparada a partir de agua destilada y esterilizada por autoclave.

2.2.3. Absorción de bicarbonato, HCO_3^-

La utilización de carbono inorgánico como fuente de carbono para la fotosíntesis fue evaluada mediante dos técnicas: (1) abundancia natural del isótopo estable de carbono $\delta^{13}\text{C}$ en tejidos (2) absorción e incorporación del isótopo estable ^{13}C en productos resultantes de la fotosíntesis.

2.2.4. Abundancia natural del isótopo estable de carbono $\delta^{13}\text{C}$ en tejidos de muestras de campo

Talos completos fueron lavados cuidadosamente y descalcificados con ácido clorhídrico (HCL) a 0.6 M durante 8 horas con cambios cada hora hasta el cese completo del burbujeo. Seguidamente fueron enjuagados con agua destilada y secados en horno a 70°C durante 24 horas. Posteriormente fueron trituradas con mortero y tamizadas. Para el análisis isotópico, se pesaron muestras de 5 mg del tamizado utilizando una balanza analítica con una precisión de 0.0001 g. Se empacaron individualmente en microcápsulas (5 x 9 mm) para su análisis en espectrofotómetro de masas isotópicas por el Laboratorio de Isotopía estable en la Universidad de California en Davis, California, USA.

2.2.5. Absorción e incorporación del isótopo estable ^{13}C en productos resultantes de la fotosíntesis

Para el ensayo fue utilizada agua de mar del área de colecta, previamente filtrada y esterilizada en autoclave. Posteriormente, el C_i se eliminó por reducción del pH hasta ~4 mediante la adición de HCL 0.5 M y burbujeo de gas N_2 durante 5 horas. Posteriormente, el pH fue elevado a 8.2 con la adición de una solución de NaOH 0.5 M (Invers *et al.* 2001, Zou 2014). A continuación, se añadió 1.6 g L^{-1} de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ (isotopo ^{13}C 99% Aldrich). Fragmentos talos de *H. scabra* de 2 g (peso fresco) fueron colocados en botellas BOD de 250 ml selladas herméticamente ($n = 3$) y conteniendo agua de mar previamente preparada con el isótopo ^{13}C y mantenidas durante 24 horas a 28°C de temperatura con recirculador de agua previamente descrito y a saturación de luz ($278 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$), previamente determinada como la irradiancia de saturación, $I_k (P_{max}/\alpha)$, donde α es la eficiencia fotosintética. Tres tratamientos con distinto fotoperiodo fueron seleccionados: (1) 24 h en luz, (2) 12:12 h luz: oscuridad, y (3) 24 h en oscuridad. En cada tratamiento se usó una botella control conteniendo agua de mar sin el isótopo ^{13}C . Al final de las incubaciones, las algas fueron lavadas con abundante agua de mar y enjuagadas con agua destilada para eliminar los restos del isótopo que no fueron absorbidos. Posteriormente fueron congeladas y liofilizadas. Muestras de liofilizados de algas de 0.6 g se sometieron a doble despigmentación con metanol (100%), después de lo cual se extrajeron los carbohidratos de bajo peso molecular mediante dos extracciones sucesivas con agua destilada

por 24 horas. Finalmente, el sobrenadante fue congelado y liofilizado para ser usado en el análisis de RMN.

2.2.6. Análisis espectroscópico de ^{13}C Resonancia Magnética Nuclear (^{13}C -RMN)

Para determinar la incorporación del isótopo $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ en los productos fotosintéticos, muestras de liofilizados (8 mg) fueron disueltas en 1 mL de óxido de deuterio al 99.8% (D_2O). Los espectros de protones (^{13}C) se registraron en un espectrómetro de RMN Varian/Agilent Premium Compact 600 (Palo Alto, CA, USA) a una frecuencia de 150.83 MHz utilizando sodio [3- trimethylsilyl 2,2', 3,3'-2-H4] propionato (TSP-d4) con referencia interna de 0.00 ppm. Todos los espectros de RMN se registraron a temperatura ambiente utilizando los siguientes parámetros: exploraciones = 50.000; Ancho de pulso ^{13}C de 3.3 s, un tiempo de adquisición de 0.5 s y retraso de relajación de 0.60 s.

2.2.7. Ensayos de inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)

Se utilizaron dos inhibidores: a) dextran-bound acetazolamide (AZ) que no penetra en la célula e inhibe solo la AC extracelular (Bjork *et al.* 1992, Haglund *et al.* 1992, Beer y Rehnberg 1997), b) 6- ethoxzolamide (EZ) que penetra a través de la pared celular y las membranas e inhibe la AC interna (Bjork *et al.* 1992). Se prepararon soluciones madre de cada inhibidor, para las cuales el EZ fue disuelto en NaOH 0.05 N a una concentración de 10 mM, mientras que AZ fue disuelto en NaOH 0.05 N a una concentración de $0.1 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Bjork *et al.* 1992). Los tratamientos experimentales fueron preparados a partir de agua de mar del área de colecta filtrada con bomba de vacío y esterilizada por autoclave. Los inhibidores fueron adicionados al agua de mar previo a las incubaciones hasta obtener una concentración final del inhibidor de $100 \mu\text{M}$ (Bjork *et al.* 1992). Las tasas fotosintéticas fueron probadas en cuatro tratamientos: (1) adición de AZ, (2) adición de EZ, (3) combinación de AZ + EZ, y (4) tratamiento control, con agua de mar sin inhibidores. La Fotosíntesis máxima fue medida como se describió previamente, pero a 28°C de temperatura ($n = 7$).

2.2.8. Análisis estadísticos

Para probar el efecto interactivo de la temperatura, el pH, y los niveles de nutrientes sobre la variable dependiente P_{gross} , fue aplicado un Análisis de Varianza de tres vías (ANOVA) ($3 \times 3 \times 4$) considerando los factores ambientales como variables independientes. Un ANOVA de una vía fue aplicado para probar las diferencias entre diferentes inhibidores sobre la P_{max} . En todos los casos se utilizó un nivel de significación de 0.05, y las diferencias significativas se

determinaron mediante la prueba post hoc de comparaciones múltiples Newman-Keuls. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico Statistica™ 7. Previo a los análisis, la homogeneidad de varianza (Bartlett) y la normalidad (Kolmogórov-Smirnov) fueron probados, cuando no se cumplió estas condiciones, se aplicaron transformaciones.

2.3. Resultados

2.3.1. Respuestas fotosintéticas al efecto interactivo de la temperatura, el pH y los nutrientes

Los resultados del ANOVA trifactorial mostraron un efecto interactivo significativo de la temperatura, el pH y los nutrientes sobre la P_{gross} de *H. scabra* (P_{gross} ($F_{12; 216} = 4.57$, $p \leq 0.001$) (Fig. 9; Table S2). Los mayores valores de P_{gross} ($1.83 \text{ mg O}_2 \text{ g PS h}^{-1}$) fueron obtenidos con el nivel de nutrientes más alto (10.0:1.0 μM), la temperatura más elevada (33°C) y con el pH más básico (8.6), y con el tratamiento control (sin adición de nutrientes) a 33°C de temperatura y al pH más bajo (7.5) ($P_{gross} = 1.78 \text{ mg O}_2 \text{ g PS h}^{-1}$). En contraste, los tratamientos de niveles de nutrientes bajo y medio presentaron las P_{gross} más bajas a temperaturas intermedias. En general, las tasas fotosintéticas de *H. scabra* fueron más elevadas a las temperaturas más altas analizadas, independientemente del nivel de nutriente o pH, excepto para el tratamiento de nivel de nutrientes bajo, el cual presentó alta P_{gross} a la temperatura más baja para todos los niveles de pH. Es de resaltar como las respuestas de la P_{gross} a la temperatura y el pH cambian respecto a los niveles de nutrientes en un patrón opuesto entre el nivel de nutrientes alto (10:1.0) y el tratamiento control (sin nutrientes adicionados), en ambos casos con la temperatura más alta (33°C). El análisis individual de los factores mostró que el pH solo no tuvo efecto sobre la P_{gross} ($F = 2.84$, $p > 0.05$), mientras que el efecto individual de los nutrientes ($F = 4.77$, $p \leq 0.05$) y la temperatura ($F = 45.30$, $p \leq 0.001$) por separados fueron significativos (Table S2). Todas las interacciones que involucraron dos factores fueron significativas (temperatura-pH ($F = 2.70$, $p \leq 0.05$); nutrientes-temperatura ($F = 10.32$, $p \leq 0.001$); y pH-nutrientes ($F = 9.23$, $p \leq 0.001$)).

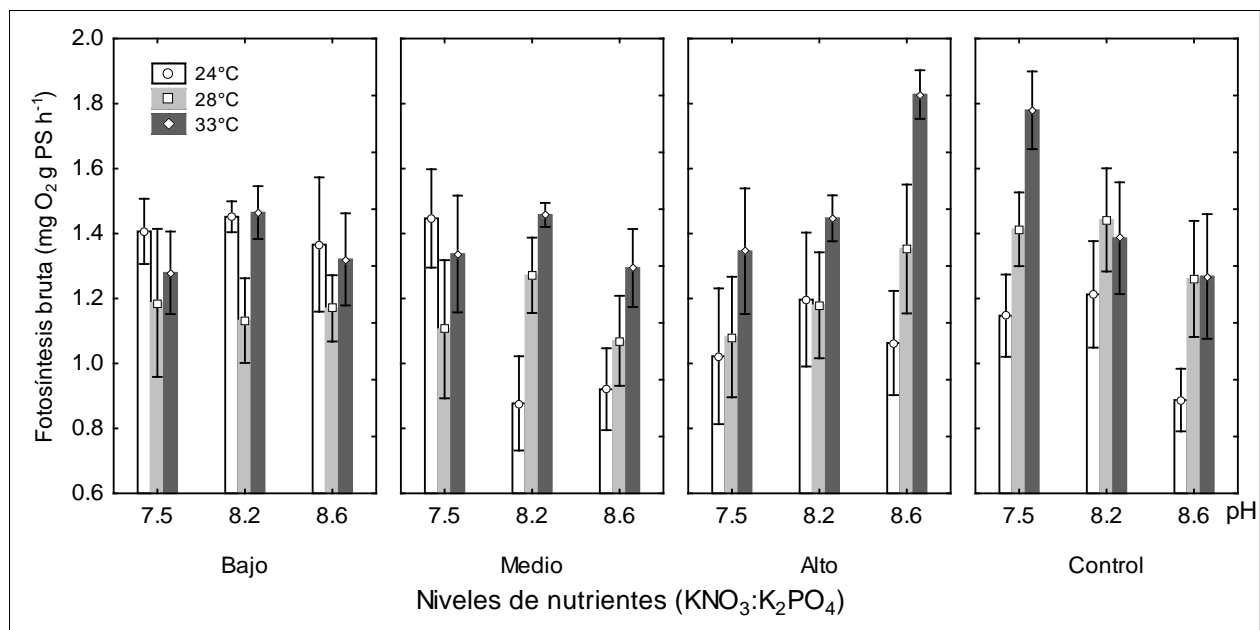


Fig. 9. Efecto interactivo de la temperatura, el pH y los nutrientes sobre la P_{gross} de *H. scabra* ($n = 7$). Símbolos representan la media y las barras de error representan intervalos de confianza de 0.95.

2.3.2. Utilización de bicarbonato

2.3.2.1. Abundancia natural de isótopos estables de carbono.

Se encontró que *H. scabra* presentó un valor de $\delta^{13}C$ en tejidos de -23.96‰ , sugiriendo absorción de HCO_3^- y CO_2 .

2.3.2.2. Incorporación del isótopo ^{13}C en productos de la fotosíntesis.

El etiquetado del isótopo estable ^{13}C en *H. scabra* observado por multiplicidad de la señal (acoplamiento) también mostró absorción e incorporación de bicarbonato ya que el isótopo ^{13}C se incorporó en un aminoácido afín al aspartato en los tres tratamientos de fotoperiodos analizados. La incorporación de bicarbonato en oscuridad indica una β -carboxilación. El aspartato también aparece en los tres tratamientos controles (señal simple desacoplada) resaltando su abundancia en esta especie (Fig. 10).

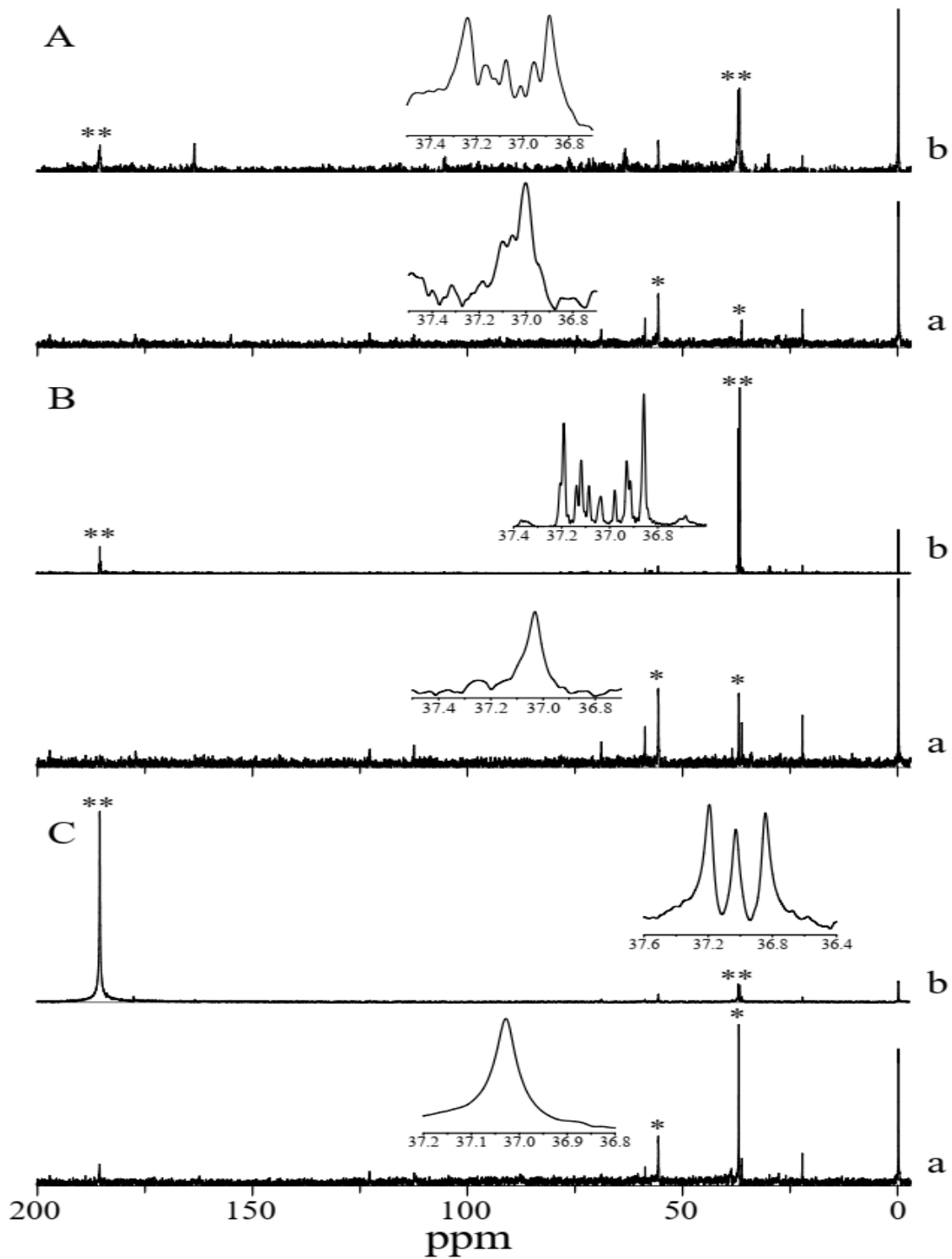


Fig. 10. Espectro de RMN de la incorporación del $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ en productos fotosintéticos de *H. scabra* en diferentes tratamientos en luz y oscuridad ($n = 3$). A) 24 horas a irradiancias de saturación B) 12 horas en saturación de luz y 12 horas en oscuridad C) 24 horas en oscuridad. * **

Indica señal consistente para el aspartato en el tratamiento control. ** Indica enriquecimiento de ^{13}C (acoplamiento). Letra **a** indica tratamiento control, Letra **b** indica tratamientos.

2.3.3. inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)

Los ensayos de inhibición de la anhidrasa carbónica mostraron que la adición de EZ causó una inhibición significativa (22.2%) de las tasas de fotosíntesis máxima P_{max} ($F_{3, 24} = 18.674$, $p \leq 0.001$), mientras la combinación de ambos inhibidores (AZ+EZ) provocó un efecto similar al encontrado con EZ. El inhibidor AZ no mostró efecto sobre la P_{max} implicando la ausencia de actividad de una anhidrasa carbónica externa (Fig. 11).

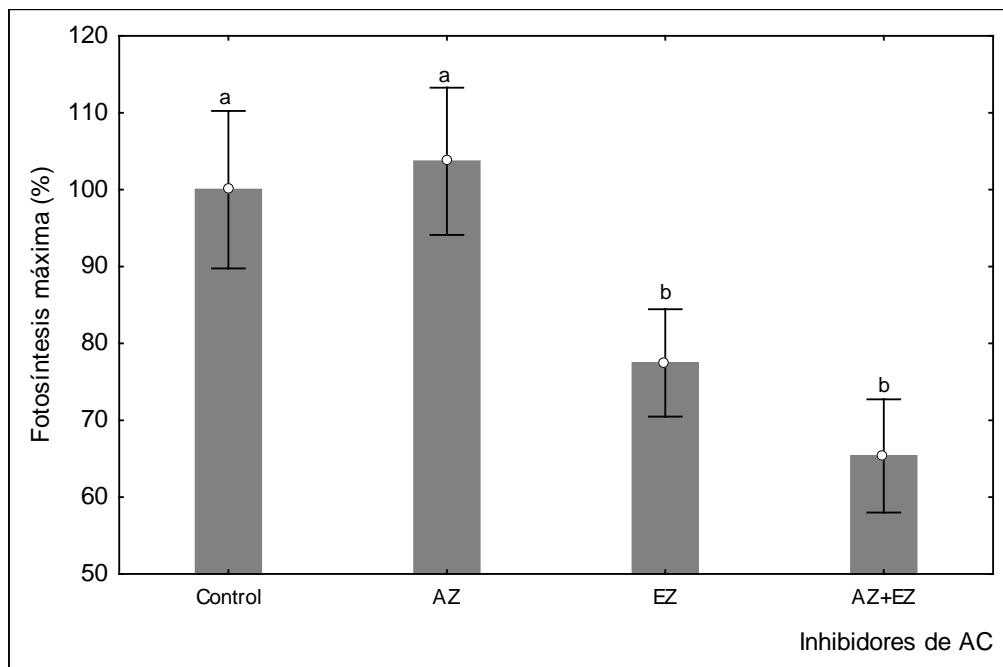


Fig. 11. Efecto de dos inhibidores de la enzima anhidrasa carbónica sobre el la P_{max} de *H. scabra* ($n = 7$). Barras de error representan intervalos de confianza de 0.95.

2.4. Discusiones

Los resultados enfatizan que los efectos interactivos de las variables ambientales sobre la fotosíntesis son un indicador más confiable que el análisis del efecto individual de un solo factor, resaltando la importancia de los estudios interactivos. Un aumento en la temperatura podría incrementar la P_{gross} a pH alto si existen suficientes nutrientes en el medio. Condiciones ambientales de alta temperatura del agua de mar (Robledo y Freile-Pelegrín 2005, Scheufen *et al.* 2017), pH elevado y enriquecimiento de nutrientes en pulsos debido a las descargas de agua

submarinas (Hernández-Terrones *et al.* 2015), son comunes en la zona costera de Quintana Roo donde *H. scabra* y otras especies de *Halimeda* colonizan ambientes costeros de baja profundidad. Un incremento de la fotosíntesis en pH alto ha sido hallado en varias macroalgas verdes por lo que se considera una característica de este grupo (Carlberg *et al.* 1990, Axelsson *et al.* 1991, Larsson y Axelsson 1999).

En cambio, el efecto interactivo del decrecimiento del pH (bajo y medio) con incrementos en temperatura y enriquecimientos de nutrientes mantuvieron a la P_{gross} por debajo de su capacidad potencial. Por tanto, posibles efectos perjudiciales sobre el comportamiento de *H. scabra* son esperados que puedan ocurrir bajo futuros escenarios de acidificación del mar, calentamiento global y sus complejas interacciones con el enriquecimiento de nutrientes debido al continuo desarrollo de la zona costera. De acuerdo con estos resultados en *H. scabra*, reducciones significantes de la fotosíntesis fueron encontrados en *H. incrassata* y *Udotea flabellum* expuestas a elevado CID (pH 8.2 y 7.8) (Meyer *et al.* 2016). En contraste, en *H. incrassata*, *H. simulans*, y *H. opuntia* no se encontraron efectos significativos sobre la fotosíntesis neta para las interacciones entre especies, pH y temperatura (Campbell *et al.* 2016). Mientras que en *H. opuntia* no se encontró efecto interactivo significativo del CO_2 con el enriquecimiento de nutrientes sobre la fotosíntesis neta (Hofmann *et al.* 2015). Estos resultados contrastantes entre congéneres indican que las respuestas fotosintéticas a los efectos interactivos de diversos factores ambientales son complejos, ya que en adición a los factores que están siendo evaluados, los mecanismos fisiológicos podrían estar respondiendo a otros procesos interrelacionados que no fueron evaluados durante los ensayos. Como ejemplo, Campbell *et al.* (2016) encontraron en tres especies de *Halimeda* que la fotosíntesis estuvo positivamente correlacionada con las tasas de calcificación, y un incremento en temperatura incrementó la actividad de ambos procesos. Mientras que Vásquez-Elizondo y Enríquez (2016) evaluando la combinación de estrés termal con pH bajo no encontraron interacción significativa de estos factores sobre la tasa fotosintética ni sobre las tasas de calcificación máxima como resultado de un complejo desacople de las tasas metabólicas (fotosíntesis, respiración y calcificación) no completamente entendido en su estudio. En este contexto, los dos procesos, fotosíntesis y calcificación compiten por el carbono inorgánico disponible. La reducción de NO_3^- a NH_4^+ es otro proceso con altos requerimientos de energía (Ale *et al.* 2011), y está relacionado a la fijación de carbono (Cabello-Pasini y Figueroa 2005). Por consiguiente, son más plausibles que afecten la fotosíntesis que la calcificación, ya que este último aparenta ser más dependiente de la actividad fotosintética de muchos productores primarios calcificantes. Un

enriquecimiento de nutrientes soportó un rápido incremento en el comportamiento fisiológico de *H. opuntia* (Teichberg *et al.* 2013). Por tanto, el incremento fotosintético encontrado en este trabajo con la adición de nutrientes ($\text{KNO}_3\text{:K}_3\text{PO}_4$) podría ser el resultado de su efecto sobre procesos relacionados con la absorción de nutrientes y de estos con la fotosíntesis. También es conocido que las tasas de absorción de nutrientes incrementan con la temperatura (Harrison y Hurd 2001), consecuentemente, los resultados encontrados en este estudio no solo son una respuesta al efecto interactivo de los factores ambientales, sino además son el resultado de la respuesta directa e indirecta de otros procesos metabólicos sobre la fotosíntesis.

Los mecanismos de absorción de carbono fotosintético pueden influenciar la composición isotópica de la materia orgánica, la cual informa sobre la importancia de la fuente externa de C_i , pero no brinda información sobre cuál mecanismo se utiliza. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -30‰ y -10‰ indican absorción activa de HCO_3^- y CO_2 , y las especies con valores en ese rango han sido clasificadas como especies con un activo MCC (Maberly *et al.* 1992, Raven *et al.* 2002, Diaz-Pulido *et al.* 2016, Bender-Champ *et al.* 2017). Considerando estos rangos y los resultados obtenidos en este trabajo, *H. scabra* utiliza ambas formas de C_i como fuentes para la fotosíntesis, HCO_3^- y CO_2 . Absorción de bicarbonato también ha sido encontrada en *H. discoidea*, *H. macroloba*, y *H. tuna* (Borowitzka y Larkum 1976). Otras especies de *Halimeda* presentan valores de $\delta^{13}\text{C}$ dentro del rango (-30‰ y -10‰), *H. opuntia*, $\sim -21\text{‰}$ (Zweng *et al.* 2018) y *H. tuna*, $\sim -21\text{‰}$ (Duarte *et al.* 2018).

En este estudio, *H. scabra* incorporó el isótopo ^{13}C en el aspartato en los tres tratamientos de fotoperiodos demostrando absorción de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. La incorporación del isótopo ^{13}C en el aspartato en el tratamiento de 24 horas en oscuridad indica β -carboxilación, la cual facilita alternativas metabólicas a la carboxilación de C_i resultando en una importante contribución a los MCC (Bowes 1985, Raven y Osmond 1992, Enríquez y Rodríguez-Román 2006). La β -carboxilación tiene múltiples funciones, entre las que se encuentran, la de proveer compuestos esenciales para el crecimiento que no pueden producirse fotosintéticamente (Falkowski y Raven 1997). La fijación de carbono en estos compuestos puede realizarse en luz y en oscuridad (Axelsson 1988), y generalmente es inferior al 5% de la fotosíntesis máxima (Cabello-Pasini y Alberte 1997). En las algas marinas, los productos finales de esta fijación de carbono independiente de la luz son típicamente compuestos orgánicos y aminoácidos, más que los azúcares triosas producidos durante la fotosíntesis (Akagawa *et al.* 1972, Cabello-Pasini y Alberte 1997).

La abundancia de aspartato en los tratamientos experimentales y controles sugiere actividad de fotosíntesis C4 en *H. scabra*. En algas existe gran plasticidad en el uso de vías alternativas de carboxilación (metabólica), y aunque no existe especialización estructural, sin embargo, el mecanismo es esencialmente el mismo con la formación de un ácido dicarboxílico de 4C (Giordano *et al.* 2005). En plantas C4, los ácidos malato y aspartato son los principales productos fotosintéticos iniciales y son rápidamente descarboxilados liberando CO₂ para su refijación por la Rubisco funcionando como intermediarios fotosintéticos (Holaday y Bowes 1980). Las plantas C4 tienen un activo MCC, que se relaciona principalmente con el uso eficiente de HCO₃⁻, a través de una reacción de carboxilación inicial catalizada por una enzima fosfoenolpiruvato (PEP) (Badger y Price 1994, Raven 1997). Mecanismos C4 han sido sugeridos en algunas Chlorophyta incluyendo al alga semi-calcificante *Udotea flabellum*, con una carboxilación inicial por la enzima Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (Reiskind *et al.* 1988), mientras que en *Ulva prolifera* se han encontrado indicios de ambas rutas (Xu *et al.* 2012).

Algunas especies de *Halimeda* utilizan bicarbonato como fuente alternativa de carbono inorgánico (Borowitzka y Larkum 1976, Price *et al.* 2011) manteniendo la fotosíntesis saturada de carbono en las concentraciones actuales de C_i en el agua de mar (Beer 1994, Beardall *et al.* 1998, Fernández *et al.* 2014). Por tanto, un MCC podría ser responsable del incremento de la P_{gross} a elevada temperatura, pH y nivel de nutrientes. De acuerdo con Giordano *et al.* (2005), la cantidad de recursos que una célula invierte en la adquisición de carbono a través de un MCC probablemente está emparejado con la disponibilidad de nutrientes. Lo anterior también podría explicar el aumento en P_{gross} observado con el nivel alto de nutrientes ya que la mayoría de los MCC requieren la síntesis *novo* de proteínas específicas, lo cual representa una demanda de nitrógeno celular (Giordano *et al.* 2005). La baja producción de oxígeno encontrada a pH bajo (7.5) y con el nivel de nutrientes alto en *H. scabra* podría deberse a que un pH bajo puede degradar la inducción de los MCC y hacer que el alga dependa solo de la difusión pasiva de CO₂, lo que conduce a una reducción de la eficiencia potencial en la asimilación de carbono en especies con MCC (Price *et al.* 2011, Cornwall *et al.* 2012, Meyer *et al.* 2016).

El inhibidor AZ no mostró efecto sobre la fotosíntesis sugiriendo la ausencia de actividad de una AC extracelular. Resultados similares han sido encontrados en *H. discoidea* (De Beer y Larkum 2001) y *H. cuneata* f. *digitate* (Hofmann *et al.* 2015a). Algunas especies de *Halimeda* absorben HCO₃⁻ directamente (Borowitzka y Larkum 1976) y no dependen de una AC externa (De Beer y Larkum 2001). Los indicios de actividad de fotosíntesis C4 encontrados con la incorporación del

isótopo ^{13}C en el aspartato podría explicar la insensibilidad de la respuesta fotosintética del alga al inhibidor AZ.

La reducción de la fotosíntesis causada por el inhibidor EZ fue solo del 22.2% respecto al tratamiento control probablemente porque había suficiente CO_2 en la proximidad de la Rubisco para mantener un nivel reducido de fotosíntesis. La disponibilidad de CO_2 podría provenir de las siguientes alternativas: (1) como resultado de un MCC relacionado principalmente con el uso eficiente de HCO_3^- (Raven 1997), como una actividad de fotosíntesis C4 sugerida con la incorporación del isótopo ^{13}C en el aspartato (2) CO_2 respiratorio (Borowitzka y Larkum 1976), (3) CO_2 disponible en los espacios intertriticulares, aunque este recurso no es suficiente para sostener toda la fotosíntesis (De Beer y Larkum 2001), (4) Difusión de CO_2 del medio externo (agua) y de los espacios intertriticulares (Borowitzka y Larkum 1976). Todas las explicaciones previas podrían mantener a la Rubisco saturada de CO_2 y minimizar las pérdidas fotosintéticas después de la inhibición de la AC intracelular. Esto sugiere que el suministro de C_i para la fotosíntesis en *H. scabra* tiene poca dependencia de la actividad de una AC, y podría ser mantenida por diversos mecanismos, lo cual puede ser ventajoso durante condiciones adversas.

2.5. Conclusiones

El estudio sugiere que *H. scabra* se adaptará mejor a condiciones ambientales de alto pH y alta temperatura si existe suficiente enriquecimiento de nutrientes. Tales condiciones son típicas en las costas de la península de Yucatán donde especies de *Halimeda* crecen en abundancia. Condiciones interactivas opuestas de disminución del pH en combinación con incrementos de la temperatura y disponibilidad de nutrientes podrían mantener a la fotosíntesis en un nivel subóptimo con fuertes implicaciones ecológicas debido al potencial decline en la abundancia de *Halimeda* y consecuencias sobre la producción de sedimentos y balances de carbono en los arrecifes de coral donde la especie se desarrolla. La abundancia natural de isótopos estables de carbono, $\delta^{13}\text{C}$ demostró absorción de bicarbonato. Mientras que la incorporación del isótopo $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ en el aspartato validó la absorción de bicarbonato y sugirió actividad de fotosíntesis C4 en *H. scabra*. El inhibidor AZ no afectó la fotosíntesis sugiriendo ausencia de actividad de la AC extracelular. Mientras que la baja inhibición por EZ indicó poca dependencia de la fotosíntesis de una anhidrasa carbónica pudiendo tener diferentes mecanismos para la adquisición de C_i (CO_2 y HCO_3^-). Estas estrategias dan a *H. scabra* mayor plasticidad fisiológica para adaptarse a posibles cambios ambientales a corto plazo.

CAPÍTULO 3

Absorción de bicarbonato y composición de monosacáridos en *Dictyota ciliolata* Sonder ex Kutzing



RESUMEN

Dictyota ciliolata Sonder ex Kutzing es una macroalga abundante en arrecifes de coral y zonas bajas rocosas del Caribe Mexicano. La absorción de bicarbonato en esta especie fue estudiada mediante la abundancia natural de isótopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en tejidos de muestras de campo. También se investigó la posible presencia de un Mecanismo de Concentración de Carbono (MCC) basado en una enzima anhidrasa carbónica (AC) extracelular mediante el efecto de inhibidores de la actividad de la enzima AC sobre la fotosíntesis máxima (P_{max}). Los monosacáridos se determinaron por Cromatografía de Alta Resolución de Intercambio Iónico con Detección Amperométrica de Pulso HPLC-PAD. Se encontró un valor de $\delta^{13}\text{C} = -20.4\text{‰}$ por lo que la especie utiliza ambas formas de carbono inorgánico (C_i) como fuentes de carbono para la fotosíntesis (HCO_3^- y CO_2). El inhibidor AZ no mostró efecto sobre la fotosíntesis por lo que no se evidenció la actividad una enzima AC externa. El inhibidor de la AC intracelular EZ causó un 58.2% de inhibición sobre la P_{max} , resaltando la importancia de la enzima sobre la fotosíntesis. Se identificaron diez monosacáridos característicos de las algas pardas (Manitol, Ramnosa (Rha), Arabinosa (Ara), Glucosamina (GlcN), Galactosa (Gal), Glucosa (Glc), Manosa (Man), Xilosa (Xyl), Fructosa (Fruc) y ácido Glucurónico (GlcA) siendo este uno de los primeros estudios que describen la composición de monosacáridos en *D. ciliolata*

ABSTRACT

Dictyota ciliolata Sonder ex Kutzing is an abundant species in coral reefs and shallow areas of Mexican Caribbean. HCO_3^- uptake by the species was studied by the natural abundance of carbon stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$) in tissues. The possible presence of a carbon concentration mechanism (CCM) relied on an external carbonic anhydrase enzyme was also investigated by the effect of inhibitors of AC enzyme activity on maximum photosynthesis (P_{max}). Monosaccharides were determined by High-Resolution Ion Exchange Chromatography. We found that *D. ciliolata* uses both forms of inorganic carbon (HCO_3^- and CO_2) as a carbon source for photosynthesis ($\delta^{13}\text{C} = -20.4\text{‰}$). The AZ inhibitor showed no effect on photosynthesis. The EZ intracellular AC inhibitor caused 58.2% inhibition over P_{max} , highlighting the importance of the enzyme over photosynthesis. Ten characteristic monosaccharides of brown algae (Mannitol, Rhamnose (Rha), Arabinose (Ara), Glucosamine (GlcN), Galactose (Gal), Glucose (Glc),

Mannose (Man), Xylose (Xyl), Fructose (Fruc) and Glucuronic acid (GlcA) were identified, being this one of the first studies describing its composition in *D. ciliolata*.

3.1. Introducción

Los organismos de arrecifes de coral están cada vez más afectados por estresores locales y globales (Vogel *et al.* 2015). El estudio para entender mejor el efecto de estos factores dependerá en gran medida del conocimiento de las respuestas fisiológicas y ecológicas de especies clave (Wernberg *et al.* 2010). En este sentido, las especies del género *Dictyota* están consideradas entre las más abundantes en los arrecifes de coral del Caribe (Lirman y Biber 2000, Olsen *et al.* 2015), de ahí su importancia ecológica para comprender mejor las causas que determinan su éxito en las actuales condiciones.

Para realizar la fotosíntesis las macroalgas marinas tienen acceso tanto al CO₂ disuelto, como al HCO₃⁻ (Badger y Price 1994, Giordano *et al.* 2005, Hurd *et al.* 2009). Sin embargo, el CO₂ es la única fuente de carbono directa que puede ser asimilada en el proceso fotosintético por la enzima de carboxilación Ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) para su fijación en el ciclo de Calvin Benson Bassham (Badger *et al.* 1998, Falkowski y Raven 2007). Sin embargo, en el agua de mar normal (pH 8.1 – 8.3), el CO₂ solo se encuentra entre el 0.5 y el 1% de todo el carbono inorgánico disuelto, mientras que más del 90% está en forma de HCO₃⁻ (Falkowski y Raven 1997, Hurd *et al.* 2009, Diaz-Pulido *et al.* 2016). La fotosíntesis en ambientes acuáticos está expuesta a una mayor limitación por la disponibilidad de carbono que en los ecosistemas terrestres (Madsen y Sand-Jensen 1991, Enríquez y Rodríguez-Román 2006). Esta limitación es causada en primer lugar por la lenta difusión de los gases y solutos en el agua mar (CO₂ y el HCO₃⁻) que es más baja que en el aire en un orden de magnitud de 4 a 5 (Raven 1984, Enríquez y Rodríguez-Román 2006); y en segundo lugar debido al hecho de que a pH marino la mayor parte del carbono inorgánico está en forma de un ion bicarbonato, que no es fácilmente asimilable por los organismos (Enríquez y Rodríguez-Román 2006). En el agua de mar normal (pH 8.1 – 8.3, salinidad 35 psu, y temperatura de 5 a 25°C), la mayoría del carbono inorgánico disuelto (CID) (~90%) se encuentra en forma de bicarbonato (HCO₃⁻ 2.0 – 2.2 mM) seguido por el CO₃²⁻ con ~9%, y el CO₂ con ~1% (10.2 - 18.8 μM) (Raven 1984, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Zou *et al.* 2011). El CO₂ y el HCO₃⁻ son las únicas formas de C_i que pueden ser utilizadas como fuente de carbono para la fotosíntesis, de ellas el CO₂ puede penetrar fácilmente por difusión a través de la pared celular de las algas, mientras que el HCO₃⁻ (por ser una molécula grande con carga negativa) no puede pasar a través de la doble capa

lipídica de la membrana plasmática (Larkum *et al.* 1989, Fernández *et al.* 2014) y necesita de mecanismos de transporte específicos para ingresar a la célula. Han sido propuestos tres mecanismos para la adquisición del HCO_3^- (1) deshidratación extracelular del HCO_3^- en CO_2 catalizada por una enzima anhidrasa carbónica (AC) localizada en la pared celular de la mayoría de las algas (Bowes 1969, Smith y Bidwell 1987, 1989, Bjork *et al.* 1992). (2) absorción directa de HCO_3^- mediante una proteína de intercambio aniónico localizada en el plasmanema; este mecanismo fue sugerido por una relativa insensibilidad a la acetazolamida en condiciones de pH alto (Beer *et al.* 2002) y un incremento de la fotosíntesis neta a pH alto (Carlberg *et al.* 1990, Larsson *et al.* 1990, Axelsson *et al.* 1991). De esta manera, el HCO_3^- se acumula interiormente y requiere de una AC interna para ser convertido a CO_2 (Fernández *et al.* 2014). (3) absorción activa de C_i por medio de una ATPasa (Raven y Lucas 1985, Mercado *et al.* 1998, Giordano *et al.* 2005, Fernández *et al.* 2014).

La anhidrasa carbónica son una familia de enzimas que catalizan la conversión reversible del HCO_3^- a CO_2 (Badger y Price 1994), y en general, en las algas han sido encontradas tanto dentro de la célula como externamente en la membrana celular (Tsuzuki y Miyachi 1989, Invers *et al.* 1999) y pueden actuar como un MCC para el mantenimiento de la fotosíntesis (Enríquez y Schubert 2014). La AC externa facilita la conversión extracelular del HCO_3^- en CO_2 , facilitando la difusión de este último, a pesar de lo cual algunas algas no han mostrado indicios de actividad de la CA extracelular (Cook *et al.* 1986, 1988, Bjork *et al.* 1991). La AC interna tiene diferentes funciones dependiendo de su localización (Sültemeyer 1998, Fernández *et al.* 2018). La AC citosólica ayuda a mantener el equilibrio entre las concentraciones de C_i y el pH interno para evitar cualquier fuga de CO_2 fuera de la célula cuando el gradiente de concentración es mayor dentro de la célula (Fernández *et al.* 2014, Fernández *et al.* 2018). La AC mitocondrial limita la fuga potencial de CO_2 del citosol al medio (Raven 2001, Fernández *et al.* 2018). La AC del cloroplasto es responsable del suministro de CO_2 al sitio activo de Rubisco (Badger y Price 1994, Fernández *et al.* 2018). Por tanto, las AC son esenciales en el proceso fotosintético permitiendo, el rápido suministro de CO_2 a la enzima, ribulosa1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco) (Surif and Raven 1989; Raven 1995), y para otras reacciones metabólicas como la fotorrespiración, calcificación, y homeostasis de pH intracelular (Badger 2003; Hofmann *et al.* 2013; Bi y Zhou 2016, Fernández *et al.* 2018). La actividad de la AC ha sido ampliamente documentada (Borowitzka y Larkum 1976, Holbrook *et al.* 1988, Reiskind *et al.* 1988, Giordano y Maberly 1989, Reiskind y Bowes 1991, Badger y Price 1994, Beer y Rehnberg 1997, Invers *et al.* 1999, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Moulin *et al.* 2011).

Como la Rubisco tiene baja afinidad relativa por el CO₂ está menos de la mitad de saturada bajo los niveles actuales de CO₂ en el agua de mar (Giordano *et al.* 2005), muchas algas y plantas superiores han adquirido mecanismos que promueven la acumulación intracelular de CO₂ y permiten que los organismos fotosintéticos reduzcan el efecto de la limitación de carbono al incrementar la concentración de CO₂ en la proximidad de la Rubisco (Mecanismos de Concentración de CO₂, MCC) (Badger 1987, Badger y Andrews 1987, Giordano *et al.* 2005, Enríquez y Rodríguez-Román 2006, Cornwall *et al.* 2015).

Muchas algas pardas pueden utilizar bicarbonato incluso a pH elevado (Holbrook *et al.* 1988, Axelsson *et al.* 1989, Surif y Raven 1989, Axelsson *et al.* 2000, Enríquez y Rodríguez-Román 2006). Este conocimiento es una herramienta importante para predecir las respuestas de las especies a las variaciones locales del pH y futuros escenarios de acidificación del mar, ya que dichas respuestas dependerán de su fisiología del carbono (Hurd *et al.* 2009, Fernández *et al.* 2014). Para este estudio se propuso la hipótesis de que *D. ciliolata* puede utilizar HCO₃⁻ como un recurso de carbono para la fotosíntesis. En este sentido se estudió la absorción de HCO₃⁻ de *Dictyota ciliolata* Sonder ex Kutzing mediante la abundancia natural de isótopos estables de carbono en tejidos ($\delta^{13}\text{C}$) y se investigó el efecto de inhibidores de la enzima anhidrasa carbónica en la fotosíntesis. Se identificó además la composición de monosacáridos como los principales receptores fotosintéticos.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Material biológico y condiciones de mantenimiento

La macroalga marina *D. ciliolata* fue seleccionada por su abundancia en el arrecife frontal y zonas bajas rocosas de los arrecifes de coral del Caribe Mexicano. Su determinación taxonómica fue realizada de acuerdo con los criterios de De Clerck (2003) y Wysor y De Clerck (2003). Muestras del alga fueron colectadas durante los meses de febrero y agosto de 2018 en Xcalacoco, Quintana Roo, Caribe Mexicano (20.660035 N, -87.034655 W) donde crecen sobre sustrato rocoso entre 0.5 y 1.0 m de profundidad. En el área existen dos estaciones: una temporada de secas de noviembre a mayo, y una temporada de lluvias de junio a octubre. En la primera, la temperatura superficial media del agua de mar es de ~24°C, mientras en la segunda estación, coincidente con el verano, las temperaturas más altas ocurren en agosto con una máxima media mensual de ~30°C pudiendo presentarse valores superiores. La media anual de la temperatura superficial del agua de mar es de ~28°C (Robledo y Freile-Pelegrín 2005,

Álvarez-Cadena *et al.* 2007, Rodríguez-Martínez *et al.* 2010, Scheufen *et al.* 2017). La irradiancia diurna se incrementa progresivamente de enero a mayo y declina de julio a diciembre (Scheufen *et al.* 2017). La zona se caracteriza además por las descargas submarinas de agua hacia el ambiente costero (Crook *et al.* 2012, Hernández-Terrones *et al.* 2015) lo cual constituye una ruta para el transporte de nutrientes (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , SRP, SRSi) y otros contaminantes desde la tierra al ambiente marino (Hernández-Terrones *et al.* 2015) confiriendo un comportamiento en pulsos a los nutrientes (que pueden ser particularmente altos en algunos sitios), la salinidad y el pH. El último con importantes variaciones desde 7.0 a 8.5 (Hernández-Terrones *et al.* 2015).

Las algas colectadas fueron transportadas al laboratorio en bolsas Ziploc a temperatura reducida en neveras con hielo. En el laboratorio, se limpiaron con agua de mar y cepillo de cerdas finas para eliminar epífitas. Posteriormente se colocaron en acuarios de 12 L conteniendo agua de mar filtrada (36 PSU, pH 8.2) con recambios diarios de 1/3 del agua a irradiancia de $115 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ proporcionada con lámparas fluorescentes y fotoperiodos de 12:12 horas (luz:oscuridad), a 24°C de temperatura, y burbujeo constante de aire.

3.2.2. Absorción de bicarbonato (HCO_3^-)

La absorción de bicarbonato como fuente de carbono para la fotosíntesis fue evaluada mediante la abundancia natural del isótopo estable de carbono $\delta^{13}\text{C}$ en tejidos de muestras de campo. Talos completos de *D. ciliolata* fueron lavados, enjuagados con agua destilada y secados en horno a 70°C durante 24 horas. Posteriormente fueron trituradas con mortero y tamizadas. Para el análisis isotópico, se pesaron muestras de 5 mg del tamizado utilizando una balanza analítica con una precisión de 0.0001 g. Se empacaron individualmente en microcápsulas (5 x 9 mm) para su análisis en espectrofotómetro de masas isotópicas por el Laboratorio de Isotopía estable en la Universidad de California en Davis, California, USA.

3.2.3. Ensayos de inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)

Se utilizaron dos inhibidores: a) dextran-bound acetazolamide (AZ) que no penetra en la célula e inhibe solo la AC extracelular (Bjork *et al.* 1992, Haglund *et al.* 1992, Beer y Rehnberg 1997), b) 6-ethoxazolamide (EZ) que penetra a través de la pared celular y las membranas e inhibe la AC interna (Bjork *et al.* 1992). Se prepararon soluciones madre de cada inhibidor, para lo cual el EZ fue disuelto en NaOH 0.05 N a una concentración de 10 mM, mientras que AZ fue disuelto en NaOH 0.05 N a una concentración de $0.1 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Bjork *et al.* 1992). Los tratamientos

experimentales fueron preparados a partir de agua de mar del área de colecta filtrada con bomba de vacío y esterilizada por autoclave. Los inhibidores fueron adicionados al agua de mar previo a las incubaciones hasta obtener una concentración final del inhibidor de 100 μM (Bjork *et al.* 1992). Las tasas fotosintéticas fueron probadas en cuatro tratamientos: (1) adición de AZ, (2) adición de EZ, (3) combinación de AZ + EZ, y (4) tratamiento control, con agua de mar sin inhibidores.

Las respuestas fotosintéticas fueron evaluadas por el método de las botellas claro-oscuro siguiendo la evolución del oxígeno vs la irradiancia (Thomas 1988) usando un Oxímetro YSI 5000 con sonda BOD YSI 5905 (YSI Incorporated Yellow Springs, Ohio, USA). Para minimizar el efecto de la lesión, los talos fueron cortados y pesados 24 horas previas a las mediciones de oxígeno. Fragmentos apicales de 0.1 g de peso fresco se colocaron en botellas de DBO de 60 ml conteniendo el agua de mar preparada con las soluciones del inhibidor. Para evaluar cada tratamiento se usaron siete botellas ($n = 7$), más una botella adicional con agua de mar, sin tejidos, utilizada como blanco. Todos los tratamientos fueron evaluados en días separados y con diferentes fragmentos de tejidos de algas.

Las incubaciones se realizaron a 28°C de temperatura mantenidos con termorregulador (Cole-Parmer® Polystat® Refrigerated Recirculator, USA). Una vez ajustada la temperatura, las algas fueron expuestas durante una hora a cada una de las siete intensidades luminosas sucesivas seleccionadas (0, 100, 170, 200, 272, 436, 770 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$), generadas con una lámpara de halógeno de 500 W, y reducidas con filtros de mallas oscuras hasta total oscuridad. Entre cada medición las botellas fueron rellenadas y agitadas. Las irradiancias fueron medidas con un sensor esférico underwater quantum sensor (LI-193SA) conectado a un Data-Logger LI-COR LI-1500 (LI-COR, Nebraska USA). La fotosíntesis máxima (P_{max}) se calculó como el promedio de los tres valores de producción de oxígeno más altos a irradiancias de saturación. Al final de cada medición, se determinó el peso seco de las muestras, por lo que los resultados se expresaron como $\text{mg O}_2 \text{ g peso seco h}^{-1}$ en 300 ml y posteriormente como porcentaje de fotosíntesis.

3.2.4. Composición de monosacáridos

La detección de monosacáridos se realizó mediante Cromatografía de Alta Resolución de Intercambio Iónico con Detección Amperométrica de Pulso HPLC-PAD (Thermo Dionex, France). Muestras de 4 mg de talos liofilizados fueron sometidas a hidrólisis ácida durante 48 h a 100°C, con 1 ml de agua miliQ y 110 μL de HCl 1N, en un ampula de vidrio sellada al fuego.

Al finalizar se agregaron 110 μL de NaOH 1M y 780 μL de agua miliQ para neutralizar el HCl y obtener una concentración de 2 mg/ml. Todos los hidrolizados fueron filtrados con filtro de 0.22 μm . Posteriormente se tomaron 0.1 ml de muestra y 0.9 ml de una solución acuosa que contenía 50 ppm de desoxirribosa, el cual se utilizó como el estándar interno. Se utilizó una columna CarboPac PA-1 (4.6 x 250 mm) precedida por una pre-columna CarboPac. Se inyectaron manualmente 100 μL en el buckle del HPAEC y 25 μL fueron inyectados en la columna. La inyección se realizó isocráticamente manteniendo la fase móvil durante 30 min con 18% solvente B (NaOH 0.1 M) y el resto con solvente A (Agua miliQ 100%), seguido por un gradiente de elución hasta el minuto 35 con 100% solvente C (NaOH 0.1 M+NaACo 1M), y finalizando con 18% solvente B hasta el minuto 80. La temperatura de la columna se mantuvo constante a 30°C. El flujo fue monitoreado con el PAD con un electrodo de oro y un electrodo de Ag/AgCl de referencia (Dionex, Francia) operado a una sensibilidad de 1000 nA. Los picos se leyeron con uso del software Chromeleon 6 (Thermo Scientific, France). Todos los solventes fueron desgasificados con gas Helio. Los monómeros fueron identificados y cuantificados a partir de sus curvas estándares a diferentes concentraciones (3 a 125 ppm), entre ellos: Desoxirribosa, Arabinosa, Glucosamina, Galactosa, Glucosa, Manosa, Xilosa, Fructosa, Ribosa, Ácido glucurónico y Ácido galacturónico.

3.2.5. Análisis estadísticos

Para conocer el efecto de los inhibidores de la AC sobre la P_{max} se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un nivel de significación de 0.05 (Zar 1996). Se aplicaron transformaciones en los casos que lo requirieron. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico Statistica™ 7.

3.3. Resultados

3.3.1. Absorción de HCO_3^-

La abundancia natural de isótopos estables de carbono en tejidos de campo de *D. ciliolata* fue $\delta^{13}\text{C} = -20.4\text{‰}$ indicando la absorción de CO_2 y HCO_3^- .

3.3.2. Inhibición de la anhidrasa carbónica (AC)

El inhibidor AZ no mostró efecto significativo sobre la fotosíntesis, sugiriendo la ausencia de actividad de una AC extracelular. Las mayores reducciones de la P_{max} se detectaron con el

inhibidor EZ (58.2% respecto al control), y con la combinación de AZ + EZ (56.7% respecto al control) ($F_{(3, 24)} = 55.828, p \leq 0.001$) (Fig. 12) indicando la actividad de una AC intracelular.

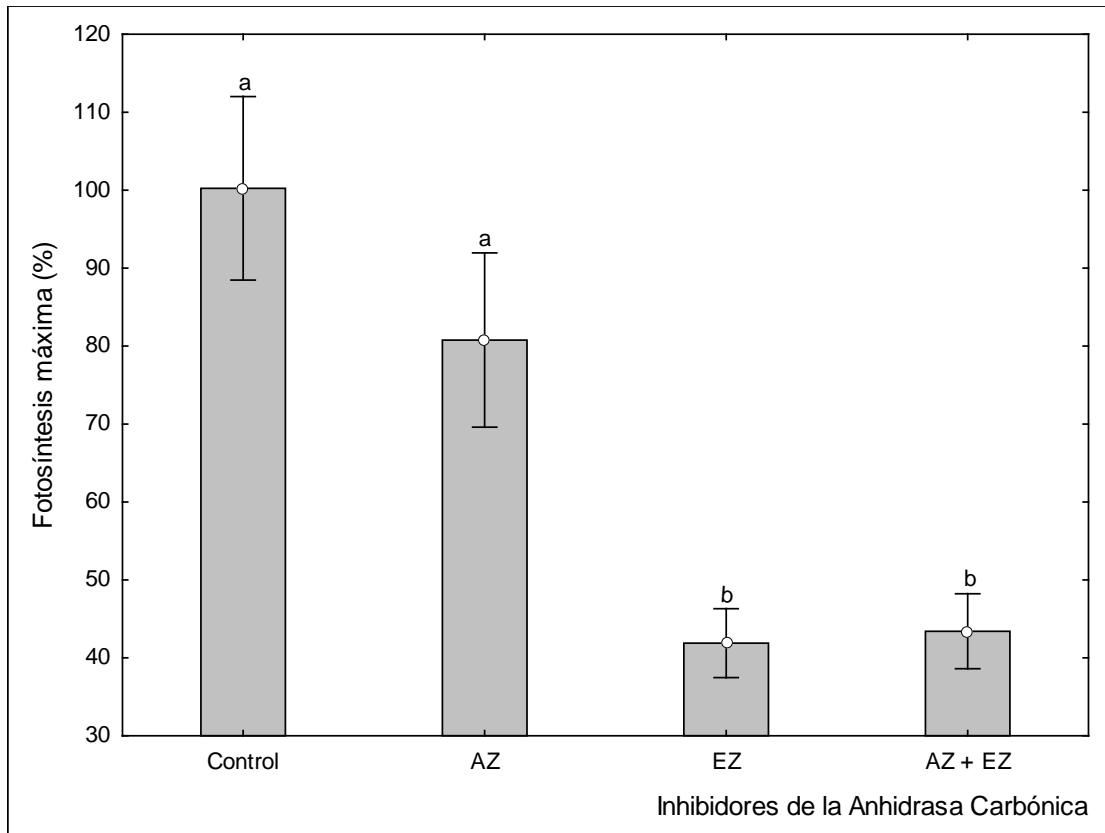


Fig. 12. Efecto de dos inhibidores de la enzima anhidrasa carbónica sobre la fotosíntesis máxima de *D. ciliolata* ($n = 7$). Barras de error representan intervalos de confianza de 0.95 y letras diferentes $p \leq 0.05$. AZ y EZ inhibidores de la AC.

3.3.3. Monosacáridos

En *D. ciliolata* se identificaron 10 monosacáridos: Manitol, Rhamnosa (Rha), Arabinosa (Ara), Glucosamina (GlcN), Galactosa (Gal), Glucosa (Glc), Manosa (Man), Xilosa (Xyl), Fructosa (Fruc), Ácido glucurónico (GlcA) (Tabla 4). Los tiempos de retención fueron variados. El mínimo tiempo de retención lo presentó el manitol con 3.490 min, y el máximo el Ácido glucurónico con 25.910 min.

Tabla 4. Composición de monosacáridos de *D. ciliolata*.

Monosacáridos	Tiempo de retención (min)
Manitol	3.490
Rhamnosa	8.825
Arabinosa	10.887
Glucosamina	11.763
Galactosa	14.315
Glucosa	15.008
Manosa	15.913
Xilosa	16.673
Fructosa	20.761
Ácido Glucurónico	25.910

3.4. Discusiones

Los resultados confirmaron la hipótesis que *D. ciliolata* utiliza HCO_3^- como fuente de carbono para la fotosíntesis. Los valores naturales de isótopos estables de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en tejidos de macroalgas contribuyen a discriminar la fuente de carbono inorgánico y permiten identificar la presencia de un Mecanismo de Concentración de Carbono (MCC) aunque no brinda información sobre cuál es el mecanismo que utiliza. De manera general, es aceptado que especies de macroalgas con valores de $\delta^{13}\text{C}$ inferiores a -30‰ solo utilizan CO_2 y no poseen MCC, mientras que las especies con $\delta^{13}\text{C}$ más positivos que -10‰ indican el uso exclusivo de HCO_3^- y se consideran con MCC. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ entre -30 y -10‰ indican la absorción activa tanto de HCO_3^- como de CO_2 y son consideradas especies con MCC (Maberly *et al.* 1992, Raven *et al.* 2002, Diaz-Pulido *et al.* 2016, Cornwall *et al.* 2017). El contenido de isótopos estables encontrado en *D. ciliolata* estuvo en el rango entre -30‰ y -10‰ evidenciando la utilización de CO_2 y HCO_3^- (Diaz-Pulido *et al.* 2016, Cornwall *et al.* 2017). La absorción de ambas fuentes de carbono para la fotosíntesis, CO_2 y HCO_3^- podría conferir a *D. ciliolata* mayor plasticidad para adaptarse a los cambios ambientales. Una alta tolerancia a las variaciones de pH ha sido encontrada en *D. dichotoma* var. *intricata* (C. Agardh) Greville (Porzio *et al.* 2020) soportando nuestros resultados.

Valores de $\delta^{13}\text{C}$ encontrados en otras especies del género consideradas con un MCC se encuentran en el mismo rango (entre -30‰ y -10‰), como son *D. cervicornis* (Raven *et al.* 2002), *D. dichotoma* (Raven *et al.* 2002, Cornwall *et al.* 2017), *D. dichotoma* var. *intricata*

(Mercado *et al.* 2009), *D. menstrualis* (Raven *et al.* 2002), *D. pfaffii* (Raven *et al.* 2002), *D. pinnatifida* (Lamb *et al.* 2012), *D. pulchella* (Raven *et al.* 2002), y *Dictyota* spp. (Van Duyl *et al.* 2018, Cabanillas-Terán *et al.* 2019) (Tabla 5), por lo que, la absorción de bicarbonato parece ser una característica común del género.

Tabla 5. Abundancia natural de isótopos estables de carbono $\delta^{13}\text{C}$ en especies de *Dictyota*.

Especies	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Referencias
<i>D. cervicornis</i> Kützing	-15.06	Raven <i>et al.</i> 2002
<i>D. dichotoma</i> (Hudson) J.V.Lamouroux	-17.49 a -19.68	Raven <i>et al.</i> 2002
<i>D. dichotoma</i>	-15.7 a -24.8	Cornwall <i>et al.</i> 2017
<i>D. dichotoma</i> var. <i>Intricata</i> (C.Agardh) Greville	-18.58	Mercado <i>et al.</i> 2009
<i>D. menstrualis</i> (Hoyt) Schnetter, Hörning & Weber-Peukert	-17 a -19.45	Raven <i>et al.</i> 2002
<i>D. pfaffii</i> Schnetter	-15.38 a -19.6	Raven <i>et al.</i> 2002
<i>D. pinnatifida</i> Kützing	-16.5	Lamb <i>et al.</i> 2012
<i>D. pulchella</i> Hörning & Schnetter	-17.72	Raven <i>et al.</i> 2002 Cabanillas-Terán <i>et al.</i>
<i>Dictyota</i> sp.	-15.47 a -16.38	2019
<i>Dictyota</i> spp.	-18.44 a -15.04	Van Duyl <i>et al.</i> 2018
<i>D. ciliolata</i> Sonder ex Kützing	-20.4	Este trabajo

El inhibidor AZ no mostró efecto sobre la fotosíntesis, sugiriendo la ausencia de actividad de una AC extracelular, y por tanto de un MCC basado en esta enzima. El inhibidor EZ provocó una inhibición significativa. La reducción de la fotosíntesis por el inhibidor EZ es indicativa de la actividad de una AC interna (Badger y Price 1994) localizada en el cloroplasto. Contrario a los resultados encontrados en *D. ciliolata* en este trabajo, en *D. dichotoma* ambos inhibidores causaron 100% de inhibición de la fotosíntesis (Mercado *et al.* 1998).

Las algas almacenan grandes cantidades de sustrato fotosintético para reconstituir su reserva de carbono y responder a las condiciones fluctuantes del hábitat. El flujo de carbono fotosintético es primeramente dirigido hacia los carbohidratos de bajo peso molecular (monosacáridos) (Bondu *et al.* 2008), los cuales cumplen importantes funciones metabólicas como son el almacén de energía, reestructuración molecular, y transferencia de energía entre niveles tróficos (Robin *et al.* 2017). De los diez monosacáridos identificados en *D. ciliolata* (Manitol, Rha, Ara, GlcN, Gal, Glc, Man, Xyl, Fruc, GlcA) Arabinosa es inusual en algas pardas,

sin embargo, también ha sido encontrado en *D. dichotoma* (Rabanal *et al.* 2014), mientras que la Glucosamina y el manitol han sido reportados en *D. caribaea* Hörnig & Schnetter (García-Ríos *et al.* 2012). En muchos organismos fotosintéticos, el manitol es sintetizado como un producto fotosintético primario (Iwamoto y Shiraiwa 2005), y en algas pardas, el manitol representa la principal forma de almacenamiento de carbono (Gravot *et al.* 2010, Michel *et al.* 2010, Rousvoal *et al.* 2011).

3.5. Conclusiones

D. ciliolata utiliza ambas formas de C_i como fuente de carbono para la fotosíntesis (HCO_3^- y CO_2) y no depende de la actividad de una enzima AC extracelular. Este es uno de los primeros estudios que describen la composición de monosacáridos de *D. ciliolata* los cuales proveen almacén de carbono y energía.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES ECOLÓGICAS

Aunque *H. scabra* y *D. ciliolata* pertenecen a diferentes grupos taxonómicos y morfofuncionales, sus abundancias podrían estar relacionadas con características comunes (Tabla S3):

- Se adaptan bien a condiciones locales fluctuantes de pH y pulsos de nutrientes determinadas por la entrada de agua de manantiales submarinos característicos de la zona.
- Ambas utilizan CO_2 y HCO_3^- como fuentes de carbono para la fotosíntesis que les podría conferir plasticidad para adaptarse a las fluctuaciones a corto plazo de los parámetros ambientales.
- *H. scabra* se adaptará mejor a condiciones ambientales de alto pH y alta temperatura si existe suficiente enriquecimiento de nutrientes. Condiciones interactivas opuestas de disminución del pH en combinación con incrementos de la temperatura y disponibilidad de nutrientes podrían mantener a la fotosíntesis en un nivel subóptimo con fuertes implicaciones ecológicas al disminuir su abundancia.
- *D. ciliolata* se adaptará mejor a la estación de secas con temperaturas más bajas incrementando su abundancia.
- *H. scabra* incorpora bicarbonato en el aspartato probablemente relacionado a una actividad de fotosíntesis C4.
- Ambas especies presentan altos contenidos de lípidos lo cual contribuye a incrementar la resistencia a condiciones adversas.
- Ambas especies presentan dos tipos de reproducción (sexual y asexual) lo cual contribuye a su abundancia y supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Aalderink, R. H. & Jovin, R. 1997. Estimation of the photosynthesis/irradiance (PII) curve parameters from light and dark bottle experiments. *J. Plankton. Res.* 19(11):1713-1742.
- Akagawa, H., Ikawa, T. & Nisizawa, K. 1972. Initial pathway of dark $^{14}\text{CO}_2$ -fixation in brown algae. *Bot. Mar.* 15:119-125.
- Alcolado, P. M., Claro-Madruga, R., Menéndez-Macías, G., García-Parrado, P., Martínez-Daranas, B. & Sosa, M. 2003. The Cuban coral reefs. In: Cortés J, ed. Latin American Reefs. Elsevier Science B.V. Amsterdam pp. 56-76.
- Ale, M. T., Mikkelsen, J. D. & Meyer, A. S. 2011. Differential growth response of *Ulva lactuca* to ammonium and nitrate assimilation. *J. Appl. Phycol.* 23:345–351.
- Almeraya, E. & Sánchez, E. 2015. Adaptaciones fotosintéticas en las plantas para mejorar la captación del carbono. *Ciencia* (octubre-diciembre):74-79.
- Álvarez-Cadena, J. N., Ordóñez-López, U., Valdés-Lozano, D., Almaral-Mendivil, A. R. & Uicab-Sabido, A. 2007. Estudio anual del zooplancton: composición, abundancia, biomasa e hidrología del norte de Quintana Roo, Mar Caribe de México. *Rev. Mex. Biodivers.* 78(2): 421-430.
- Al-Saif, S. S. A., Abdel-Raouf, N., El-Wazanani, H. A. & Aref, I. A. 2014. Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea, Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.* 21:57–64.
- Anantharaman, P., Karthikaidevi, G., Manivannan, K., Thirumaran, G. & Balasubramanian, T. 2010. Mineral composition of marine macroalgae from Mandapam coastal regions; southeast coast of India. *Recent Res. Sci. Technol.* 2(10):66-71.
- Arrhenius, S. A. 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Ibid* 4: 226–248.
- Ateweberhan, M., Bruggemann, J. H. & Breeman, A. M. 2006. Effects of extreme seasonality on community structure and functional group dynamics of coral reef algae in the southern Red Sea (Eritrea). *Coral Reefs* 25:391–406.
- Ateweberhan, M., Bruggemann, J. H. & Breeman, A. M. 2005. Seasonal patterns of biomass, growth and reproduction in *Dictyota cervicornis* and *Stoechospermum polypodioides* (Dictyotales, Phaeophyta) on a shallow reef flat in the southern Red Sea (Eritrea). *Bot. Mar.* 48:8–17.
- Axelsson, L. 1988. Changes in pH as a measure of photosynthesis by marine macroalgae. *Mar. Biol.* 97:287-294.
- Axelsson, L., Carlberg, S. & Ryberg, H. 1989. Adaptations by macroalgae to low carbon availability. I. A buffer system in *Ascophyllum nodosum*, associated with photosynthesis. *Plant Cell. Environ.* 12:765–770.

- Axelsson, L., Mercado, J. & Figueroa, F. 2000. Utilization of HCO_3^- at high pH by the brown macroalga *Laminaria saccharina*. *Eur. J. Phycol.* 35(1):53-59.
- Axelsson, L., Uusitalo, J. & Ryberg, H. 1991. Mechanisms for concentrating and storage of inorganic carbon in marine macroalgae. In *Seaweed Cellular Biotechnology, Physiology and Intensive Cultivation* (García-Reina, G. & Pedersen, M., editors), 185–198. COST-48; Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain.
- Badger, M. R. 1987. The CO_2 concentrating mechanism in aquatic phototrophs. In: Hatch, M. D. & Boardman, N. K. (ed). *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. Vol. 10: Photosynthesis. New York: Academic. pp. 219-74.
- Badger, M. R. & Andrews, T. J. 1987. Co-evolution of Rubisco and CO_2 concentrating mechanisms. In Biggins, J. (Ed). *Progress in photosynthesis research*. Vol. III. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 601–609.
- Badger, M. 2003. The roles of carbonic anhydrases in photosynthetic CO_2 concentrating mechanisms. *Photosynth Res.* 77:83–94
- Badger, M. R., Andrews, T. J., Whitney, S. M., Ludwig, M., Yellowlees, D. C., Leggat, W. & Price, G. D. 1998. The diversity and coevolution of Rubisco, plastids, pyrenoids, and chloroplast-based CO_2 -concentrating mechanisms in algae. *Can. J. Bot.* 76:1052-1071.
- Badger, M. R. & Price, D. P. 1994. The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:369-392.
- Baggini, C. 2014. Assessing the effects of long-term ocean acidification on benthic communities at CO_2 seeps. A thesis submitted to Plymouth University and Bremen University in partial fulfilment for the degree of Doctor of Philosophy and Doctor of Science (Dr. RER. NAT.). School of Marine Science and Engineering Marine Biology & Ecology Research Centre (MBERC). 543 pp.
- Baggini, C., Salomidi, M., Voutsinas, E., Bray, L., Krasakopoulou, E. & Hall-Spencer, J. M. 2014. Seasonality Affects Macroalgal Community Response to Increases in $p\text{CO}_2$. *PLoS One* 9(9): e106520.
- Bauwe, H., Hagemann, M., Kern, R. & Timm, S. 2012. Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:269-275.
- Beach, K. & Walters, L. 2000. *Dictyota* bloom in Florida Keys national marine sanctuary: fragments and fouling. *Diving for Science in the 21st Century: American Association of Underwater Sciences* p. 61-63.
- Beach, K., Walters, L., Borgeas, H., Smith, C., Coyer, J. & Vroom, P. 2003. The impact of *Dictyota* spp. on *Halimeda* populations of Conch Reef, Florida Keys. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 297:141–159.
- Beadle, C.L. & Long, S.P. 1985. Photosynthesis –is it limiting to Biomass Production? *Biomass* 8:119–168.
- Beardall, J., Beer, S. & Raven, J. A. 1998. Biodiversity of marine plants in an era of climate change: some predictions based on physiological performance. *Bot. Mar.* 41:113–123.

- Beardall, J., Quigg, A. & Raven, J. A. 2003. Oxygen consumption: photorespiration and chlororespiration. In: Larkum, A. W. D., Douglas, S. E. & Raven J. A. (Eds.), *Photosynthesis in Algae*. Dordrecht The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp. 157–18.
- Beer, S., Bjork, M., Hellblom, F. & Axelsson, L. 2002. Inorganic carbon utilization in marine angiosperms (seagrasses). *Funct. Plant. Biol.* 29(3):349-354.
- Beer, S. & Rehnberg, J. 1997. The acquisition of inorganic carbon by the seagrass *Zostera marina*. *Aquatic. Bot.* 56:277-283.
- Beer, S. 1994. Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine macroalgae (with special reference to the Chlorophyta). In: Round, F. E. & Chapman, D. J. (Eds). *Progress in Phycological Research*. Biopress, Bristol, UK. pp. 179-207.
- Bender-Champ, D., Diaz-Pulido, G. & Dove, S. 2017. Effects of elevated nutrients and CO₂ emission scenarios on three coral reef macroalgae. *Harmful Algae* 65:40–51.
- Bi, Y. & Zhou, Z. 2016. Absorption and transport of inorganic carbon in kelps with emphasis on *Saccharina japonica*. *Appl. Photosynth New Progress*.
- Bischof, K., Gómez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U., Roleda, M. Y., Zacher, K. & Wiencke, C. 2006. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 5(2-3):141–166.
- Bjork, M., Haglund, K., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G., Pedersen, M. 1992. Inorganic carbon assimilation in the green seaweed *Ulva rigida* C. Ag. (Chlorophyta). *Planta* 187:152-156.
- Bogaert, K., Beeckman, T. & De Clerck, O. 2016. Abiotic regulation of growth and fertility in the sporophyte of *Dictyota dichotoma* (Hudson) J.V. Lamouroux (Dictyotales, Phaeophyceae). *J. Appl. Phycol.* 28(5):2915- 2924.
- Borowitzka, M. A. & Larkum, A. W. D. 1976. Calcification in the green alga *Halimeda*. III. The sources of inorganic carbon for photosynthesis and calcification and a model of the mechanism of calcification. *J. Exp. Bot.* 27:879–893.
- Bondu, S., Cerantola, S., Kervarec, N. & Deslandes, E. 2009. Impact of the salt stress on the photosynthetic carbon flux and ¹³C-label distribution within floridoside and digeneaside in *Solieria chordalis*. *Phytochemistry* 70:173–184.
- Bowes, G. W. 1969. Carbonic anhydrase in marine algae. *Plant Physiol.* 44:726–732.
- Bowes, G. 1985. Pathways of CO₂ fixation by aquatic organisms. In: Lucas, W. J. & Berry, J. A. (eds) *Inorganic Carbon Uptake by Aquatic Photosynthetic Organisms*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. USA. pp. 187–210.
- Bowes, G., Ogren, W. L. & Hageman, R. H. 1971. Phosphoglycolate production catalysed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45:716–722.

- Brodie, J., Williamson, C., Smale, D. A., Kamenos, N. A., Mieszkowska, N., Santos, R., *et al.* 2014. The future of the northeast Atlantic benthic flora in a high CO₂ world. *Ecol. Evol.* 4(13):2787-2798.
- Bruno, J. F., Carr, L. A. & O'Connor, M. I. 2015. Exploring the role of temperature in the ocean through metabolic scaling. *Ecology* 96(12):3126–3140.
- Cabanillas-Terán, N., Hernández-Arana, H. A., Ruiz-Zárate, M. Á., Vega-Zepeda, A., Sanchez-Gonzalez, A. 2019. *Sargassum* blooms in the Caribbean alter the trophic structure of the sea urchin *Diadema antillarum*. *PeerJ* 7:e7589.
- Carlberg, S., Axelsson, L., Larsson, C., Ryberg, H. & Uusitalo, J. 1990. Inducible CO₂ concentrating mechanisms in green seaweeds. I. Taxonomical and physiological aspects. In *Current Research in Photosynthesis*, vol. IV (Baltscheffsky, M., editor), 529–532. Kluwer, Dordrecht.
- Larsson, C., Axelsson, L., Carlberg, S., Ryberg, H. & Uusitalo, J. 1990. Inducible CO₂ concentrating mechanisms in green seaweeds. II. Ecology and field observations. In *Current Research in Photosynthesis*, vol. IV (Baltscheffsky, M., editor), 533–536. Kluwer, Dordrecht.
- Cook, C. M., Lanaras, T. & Colman, B. 1986. Evidence for bicarbonate transport in species of red and brown macrophytic marine algae. *J. Exp. Bot.* 37:977–984.
- Cabello-Pasini, A. & Alberte, R. S. 1997. Seasonal patterns of photosynthesis and light-independent carbon fixation in marine macrophytes. *J. Phycol.* 33:321-329.
- Cabello-Pasini, A. & Figueroa, F. L. 2005. Effect of nitrate concentration on the relationship between photosynthetic oxygen evolution and electron transport rate in *Ulva rigida* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 41:1169–1177.
- Calosi, P., Rastrick, S. P. S., Graziano, M., Thomas, S. C., Baggini, C., Carter, H. A., Hall-Spencer, J. M., Milazzo, M. & Spicer, J. I. 2013. Distribution of sea urchins living near shallow water CO₂ vents is dependent upon species acid-base and ion-regulatory abilities. *Mar. Poll. Bull.* 73(2):470–484.
- Campbell, J. E., Fisch, J., Langdon, C. & Paul, V. J. 2016. Increased temperature mitigates the effects of ocean acidification in calcified green algae (*Halimeda* spp.). *Coral Reefs* 35:357–368.
- Celis-Plá, P., Hall-spencer, J. M., Horta, P., Milazzo, M., Korbee, N., Cornwall, C. E. & Figueroa, F. L. 2015. Macroalgal responses to ocean acidification depend on nutrient and light levels. *Front. Mar. Sci.* 2:26.
- Chale-Dzul, J., Freile-Peigrín, Y., Robledo, D. & Moo-Puc, R. 2017. Protective effect of fucoidans from tropical seaweeds against oxidative stress in HepG2 cells. *J. Appl. Phycol.* 29(5):2229–2238.
- Chauvin, A., Denis, V. & Cuet, P. 2011. Is the response of coral calcification to seawater acidification related to nutrient loading? *Coral Reefs* 30:911–923.

- Chung, I. C., Hwang, R. L., Lin, S. H., Wu, T. M., Wu, J. Y., Su, S. W., Chen, C. S. & Lee, T. M. 2007. Nutrients, temperature, and salinity as primary factors influencing the temporal dynamics of macroalgal abundance and assemblage structure on a reef of Du-Lang Bay in Taitung in southeastern Taiwan. *Bot. Stud.* 48:419-433.
- Comeau, S., Edmunds, P. J., Spindel, N. B. & Carpenter, R. C. 2013. The responses of eight coral reef calcifiers to increasing partial pressure of CO₂ do not exhibit a tipping point. *Limnol. Oceanogr.* 58:388–398.
- Cornwall, C., Hepburn, C. D., Pritchard, D., Currie, K. I., McGraw, C. M., Hunter, K. A. & Hurd, C. L. 2012. Carbon-use strategies in macroalgae: differential responses to lowered pH and implications for ocean acidification. *J. Phycol.* 48:137–144.
- Cornwall, C. E., Reville, A. T. & Hurd, C. L. 2015. High prevalence of diffusive uptake of CO₂ by macroalgae in a temperate subtidal ecosystem. *Photosynth. Res.* 124:181–190.
- Cornwall, C. E., Reville, A. T., Hall-Spencer, J. M., Milazzo, M., Raven, J. A. & Hurd, C. L. 2017. Inorganic carbon physiology underpins macroalgal responses to elevated CO₂. *Sci. Rep.* 7:46297.
- Crook, E. D., Potts, D., Rebolledo-Vieyra, M., Hernández, L. & Paytan, A. 2012. Calcifying coral abundance near low-pH springs: implications for future ocean acidification. *Coral Reefs* 31(1):239-245.
- Davison, I. R. 1991. Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27:2–8.
- Dawczynski, C., Schubert, R., Jahreis, G. 2007. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem.* 103:891-899.
- De Beer, D., Larkum, A. W. D. 2001. Photosynthesis and calcification in the calcifying algae *Halimeda discoidea* studied with microsensors. *Plant Cell and Environ.* 24:1209–1217.
- De Clerck, O. 2003. The genus *Dictyota* in the Indian Ocean. *Opera Bot. Belg.* 13:1-205.
- De Clerck, O. & Coppejans, E. 1999. Two new species of *Dictyota* (Dictyotales, Phaeophyta) from the Indo-Malayan region. *Phycologia* 38:184–194.
- Diaz-Pulido, G., Cornwall, C., Gartrell, P., Hurd, C. & Tran, D. V. 2016. Strategies of dissolved inorganic carbon use in macroalgae across a gradient of terrestrial influence: implications for the Great Barrier Reef in the context of ocean acidification. *Coral Reefs* 35(4):1327-1341.
- Diaz-Pulido, G. & Garzon-Ferreira, J. 2002. Seasonality in algal assemblages on upwelling-influenced coral reefs in the Colombian Caribbean. *Bot. Mar.* 45:284–292.
- Duarte, C. M., Delgado-Huertas, A., Anton, A., Carrillo-de-Albornoz, P., López-Sandoval, D. C., Agustí, S., Almahasheer, H., Marbá, N., Hendriks, I. E., Krause-Jensen, D. & Garcias-Bonet, N. 2018. Stable Isotope ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$, δD) Composition and Nutrient Concentration of Red Sea Primary Producers. *Front. Mar. Sci.* 5:298.

- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 28:350–356.
- Edding, M., Tala, F. & Vásquez, J. 2006. Fotosíntesis, productividad y algas marinas. En: Squeo, F. A. & Cardemil, L. (eds). Fisiología vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 39 pp.
- El-Shenody, R. A., Ashour, M., & Ghobara, M. M. E. 2019. Evaluating the chemical composition and antioxidant activity of three Egyptian seaweeds: *Dictyota dichotoma*, *Turbinaria decurrens*, and *Laurencia obtusa*. *Braz. J. Food Technol.* 22: e2018203.
- Enríquez, S. & Rodríguez-Román, A. 2006. Effect of water flow on the photosynthesis of three marine macrophytes from a fringing-reef lagoon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 323:119–132.
- Enríquez, S., Schubert, N. 2014. Direct contribution of the seagrass *Thalassia testudinum* to lime mud production. *Nat. Commun.* 5:3835.
- Enriquez, S., Duarte, C. M., Sand-Jensen, K. & Nielsen, S. L. 1996. Broad-scale comparison of photosynthetic rates across phototrophic organisms. *Oecologia.* 108:197-206.
- Enriquez, S., Duarte, C. M. & Sand-Jensen, K. 1995. Patterns in the photosynthetic metabolism of Mediterranean macrophytes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119:243-252.
- Falkowski, P. & Kiefer, D. A. 1985. Chlorophyll a fluorescence in phytoplankton: relationship to photosynthesis and biomass. *J. Plankton. Res.* 7(5):715–731.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell science. Massachusetts. 375 pp.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. 2007. Aquatic Photosynthesis: (Second Edition). Princeton; Oxford: Princeton University Press. 488 pp.
- Falkowski, P., Scholes, R. J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N. Hibbard, K., Högberg, K. P., Linder, S., Mackenzie, F. T., Moore III, B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V. & Steffen, W. 2000. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. *Science* 290 (5490): 291-296.
- Fernández, P. A., Hurd, C. L. & Roleda, M. Y. 2014. Bicarbonate uptake via the anion exchange protein is the main mechanism of inorganic carbon acquisition by the giant kelp *Macrocystis pyrifera* (Laminariales, Phaeophyceae) under variable pH. *J. Phycol.* 50:998–1008.
- Fernández, P. A., Roleda, M. Y., Rautenberger, R. & Hurd, C. L. 2018. Carbonic anhydrase activity in seaweeds: overview and recommendations for measuring activity with an electrometric method, using *Macrocystis pyrifera* as a model species. *Mar. Biol.* 165:88.
- Figuroa, F. L., Israel, A., Neori, A., Martínez, B., Malta, E. J., Ang, P., Inken, S., Marquardt, R. & Korbee, N. 2009. Effects of nutrient supply on photosynthesis and pigmentation in *Ulva lactuca* (Chlorophyta): responses to short-term stress. *Aquat. Biol.* 7:173–183.

- Ferrari, R., Gonzalez-Rivero, M., Ortiz, J. C. & Mumby, P. J. 2012. Interaction of herbivory and seasonality on the dynamics of Caribbean macroalgae. *Coral Reefs* 31:683–692.
- Findlay, H. S., Wood, H. L., Kendall, M. A., Spicer, J. I., Twitchett, R. J. & Widdicombe, S. 2011. Comparing the impact of high CO₂ on calcium carbonate structures in different marine organisms. *Mar. Biol. Res.* 7:565–575.
- Fleurence, J. 1999. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci. Tech.* 10(1):25-28.
- Franklin, L. A. & Foster, R. M. 1997. The changing irradiance environment: consequences for marine macrophytes physiology, productivity and ecology. *Eur. J. Phycol.* 32:207–232.
- García-Ríos, V., Ríos-Leal, E., Robledo, D. & Freile-Pelegrin, Y. 2012. Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds. *Phycological Res.* 60:305–315.
- Gauna, M. C., Cáceres, E. J. & Parodi, E. R. 2013. Temporal variations of vegetative features, sex ratios and reproductive phenology in a *Dictyota dichotoma* (Dictyotales, Phaeophyceae) population of Argentina. *Helgol. Mar. Res.* 67:721–732.
- Geraldes, F. X. 2003. The coral reefs of Dominican Republic. In: Cortés, J. (ed). Latin American Coral Reefs. Copyright © Elsevier B.V. pp. 77 - 105.
- Giordano, M., Beardall, J., Raven & J. A. 2005. CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56:99–131.
- Giordano, M. & Maberly, S. C. 1989. Distribution of carbonic anhydrase in British marine macroalgae. *Oecologia* 81:534–539.
- Gordillo, F. J. L., Niell, F. X. & Figueroa, F. L. 2001. Non-photosynthetic enhancement of growth by high CO₂ level in the nitrophilic seaweed *Ulva rigida* C. Agardh (Chlorophyta). *Planta* 213:64–70.
- Goecke, F., Escobar, M. & Collantes G. 2012. Chemical composition of *Padina fernandeziana* (Phaeophyceae, Dictyotales) from Juan Fernández Archipelago, Chile. *Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal* 3(2):95-104.
- Gosch, B., Magnusson, M., Paul, N. A. & De Nys, R. 2012. Total lipid and fatty acid composition of seaweeds for the selection of species for oil-based biofuel and bioproducts. *GCB Bioenergy* 4:919–930.
- Gravot, A., Dittami, S. M., Rousvoal, S., Lugan, R., Eggert, A., Collén, J., Boyen, C., Bouchereau, A. & Tonon, T. 2010. Diurnal oscillations of metabolite abundances and genome analysis provide new insights into central metabolic processes of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. *New Phytologist.* 188:98–110.
- Haglund, K., Bjork, M., Ramazanov, Z., Garcia-Reina, G. & Pedersen, M. 1992. Role of carbonic anhydrase in photosynthesis and inorganic carbon assimilation in the red alga *Gracillaria tenuistipitata*. *Planta* 187: 275 - 281.

- Hanisak, M. D. 1983. The nitrogen relationships of marine macroalgae. In: Carpenter, E. J. & Capone, D. G. (eds) Nitrogen in the marine environment. Academic Press Inc, New York. 699-730.
- Hernández-Terrones, M. L., Kimberly, A. N., Null, K. A., Ortega-Camacho, D. & Paytan, A. 2015. Water quality assessment in the Mexican Caribbean: Impacts on the coastal ecosystem. *Cont. Shelf Res.* 102:62–72.
- Herren, L. W., Walters, L.J. & Beach, K.S. 2006. Fragment generation, survival, and attachment of *Dictyota* spp. at Conch Reef in the Florida Keys, USA. *Coral Reefs* 25:287–295.
- Hillis-Colinvaux, L. 1980. Ecology and taxonomy of *Halimeda*: primary producer of coral reef. *Adv. Mar. Biol.* 17:1-327.
- Howe, M. A. 1905. Phycological studies - I. New Chlorophyceae from Florida and the Bahamas. *Bull. Torrey Bot. Club* 32:241–252.
- Häder, D. P., Kumar, H. D., Smith, R. C. & Worest, R. C. 2007. Effect of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6:267–285.
- Hatch, M. D. 1987. C4 photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta* 895(2):81-106.
- Hanelt, D. & Figueroa, F. L. 2012. Physiological and Photomorphogenic Effects of Light on Marine Macrophytes. In C. Wiencke and K. Bischof (eds.), *Seaweed Biology, Ecological Studies*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 219 pp.
- Harley, C. D. G., Anderson, K. M., Demes, K. W., Jorve, J. P., Kordas, R. L., Coyle, T. A. & Graham, M. H. 2012. Effects of climate change on global seaweed communities. *J. Phycol.* 48:1064–1078.
- Harrison, P. J., Hurd, C. L. 2001. Nutrient physiology of seaweeds: Application of concepts to aquaculture. *Cah. Biol. Mar.* 42:71-82.
- Herzka, S. Z. & Dunton, K. H. 1997. Seasonal photosynthetic patterns of the seagrass *Thalassia testudinum* in the western Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 152: 103-117.
- Hofmann, L. C., Bischof, K., Baggini, C., Johnson, A., Koop-Jakobsen, K. & Teichberg, M. 2015. CO₂ and inorganic nutrient enrichment affect the performance of a calcifying green alga and its noncalcifying epiphyte. *Oecologia* 177(4):1157–1169.
- Hofmann, L., Fink, A., Bischof, K., De Beer, D. 2015a. Microsensor studies on *Padina* from a natural CO₂ seep: implications of morphology on acclimation to low pH. *J. Phycol.* 51:1106–1111.
- Hofmann, L. C., Straub, S. & Bischof, K. 2013. Elevated CO₂ levels affect the activity of nitrate reductase and carbonic anhydrase in the calcifying rhodophyte *Corallina officinalis*. *J. Exp. Bot.* 64(4):899–908.

- Hofmann, L. C., Heiden, J., Bischof, K. & Teichberg, M. 2014. Nutrient availability affects the response of the calcifying chlorophyte *Halimeda opuntia* (L.) J.V. Lamouroux to low pH. *Planta* 239(1):231-242.
- Holaday, A. S. & Bowes, G. 1980. C4 Acid Metabolism and Dark CO₂ Fixation in a Submersed Aquatic Macrophyte (*Hydrila verticillata*). *Plant Physiol.* 65:331-335.
- Holcomb, M., McCorkle, D. C. & Cohen, A. L. 2010. Long-term effects of nutrient and CO₂ enrichment on the temperate coral *Astrangia poculata* (Ellis and Solander, 1786). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 386:27–33.
- Holbrook, G. P., Beer, S., Spencer, W. E., Reiskind, J. B., Davis, J. S. & Bowes, G. 1988. Photosynthesis in marine macroalgae: evidence for carbon limitation. *Can. J. Bot.* 66:577–582.
- Hubas, C., Davoult, D., Cariou, T. & Artigas, L. F. 2006. Factors controlling benthic metabolism during low tide along a granulometric gradient in an intertidal bay (Roscoff Aber Bay, France). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 316: 53-68.
- Hurd, L. C., Hepburn, D., Currie, I. K., Raven, A. J., Hunter, A. K. 2009. Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism: considerations for experimental designs. *J. Phycol.* 45:1236–1251.
- Invers, O., Perez, M. & Romero, J. 1999. Bicarbonate utilization in seagrass photosynthesis: role of carbonic anhydrase in *Posidonia oceanica* (L.) Delile and *Cymodocea nodosa* (Ucria) Ascherson. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 235:125–133.
- Invers, O., Zimmerman, C. R., Alberte, S. R., Perez, M. & Romero, J. 2001. Inorganic carbon sources for seagrass photosynthesis: an experimental evaluation of bicarbonate use in species inhabiting temperate waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 265:203–217.
- IPCC 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M., Allen, S. K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. & Midgley, P.M. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 1535 pp.
- Iwamoto, K. & Shiraiwa, Y. 2005. Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Mar. Biotech.* 7:407–415.
- Jensen, A. 1993. Present and future needs for alga and algal products. *Hydrobiology* 260(1):15-23.
- Johansson, G. & Snoeijs, P. 2002. Macroalgal photosynthetic responses to light in relation to thallus morphology and depth zonation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 244:63–72.
- Johnson, V. R., Russell, B. D., Fabricius, K. E., Brownlee, C. & Hall-Spencer, J. M. 2012. Temperate and tropical brown macroalgae thrive, despite decalcification, along natural CO₂ gradients. *Glob. Chang. Biol.* 18(9):2792-2803.
- Johnson, M. D., Price, N. N. & Smith, J. E. 2014. Contrasting effects of ocean acidification on tropical fleshy and calcareous algae. *PeerJ* 2:e411.

- Juneja, A., Ceballos, R. M. & Murthy, G. S. 2013. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 6:4607-4638.
- Khairy, H. M. & El-Shafay, S. M. 2013. Seasonal variations in the biochemical composition of some common seaweed species from the coast of Abu Qir Bay, Alexandria, Egypt. *Oceanologia* 55(2):1–17.
- Koch, M., Bowes, G., Ross, C. & Zhang, X. H. 2013. Climate change and ocean acidification effects on seagrasses and marine macroalgae. *Glob. Chang. Biol.* 19:103–132.
- Kram, S. L., Price, N. N., Donham, E. M., Johnson, M. D., Kelly, E. L. A., Hamilton, S. L. & Smith, J. E. 2016. Variable responses of temperate calcified and fleshy macroalgae to elevated pCO₂ and warming. *ICES J. Mar. Sci.* 73(3):693–703.
- Kramer, P., McField, M., Álvarez, L., Filip, F., Drysdale, I., Rueda, M., Giró, A. & Pott, R. 2015. 2015 Report Card for the Mesoamerican Reef. Healthy Reefs Initiative.
- Kumari, P., Kumar, M., Gupta, V., Reddy, C. R. K. & Jha, B. 2010. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem.* 120:749–757.
- Lamb, K., Swart, P. K. & Altabet, M. A. 2012. Nitrogen and Carbon Isotopic Systematics of the Florida Reef Tract. *Bull. Mar. Sci.* 88(1):1–28.
- Larkum, A. W., Robert, G., Kuo, J. & Strother, S. 1989. Gaseous movement in seagrasses. In: Larkum AWD, McComb AJ, Shepherd SA (Eds.). *The Biology of Seagrasses. A Treatise on the Biology of Seagrasses with Special Reference to the Australian Region.* Elsevier, Amsterdam, pp. 686–722.
- Larsson, C. & Axelsson, L. 1999. Bicarbonate uptake and utilization in marine macroalgae. *Eur. J. Phycol.* 34:79–86.
- Lignell, Å. & Pedersén, M. 1989. Effects of pH and inorganic carbon concentration on growth of *Gracilaria secundata*. *Brit. Phycol. J.* 24:83-89.
- Lirman, D. & Biber, P. 2000. Seasonal Dynamics of Macroalgal Communities of the Northern Florida Reef Tract. *Bot. Mar.* 43:305-314.
- Littler, M. M., Taylor, P. R., Littler, D. S., Sims, R. H. & Norris, J. N. 1987. Dominant macrophyte standing stocks, productivity and community structure on a Belizean barrier reef. *Atoll. Res. Bull.* (302):1-24.
- Littler, M.M., Littler, D.S. & Lapointe, B.E. 1988. A comparison of nutrient- and light-limited photosynthesis in psammophytic versus epilithic forms of *Halimeda* (Caulerpales, Halimedaceae) from the Bahamas, *Coral Reefs* 6:219-225.
- Littler, M. M., Littler, D. S. & Taylor, P. R. 1983. Evolutionary strategies in a tropical barrier reef system: functional-form groups of marine macroalgae. *J. Phycol.* 19:229–237.
- Liu, X., Bogaert, K., Engelen, A. H., Leliaert, F., Roleda, M. Y. & De Clerck, O. 2017. Seaweed reproductive biology: environmental and genetic controls. *Bot. Mar.* 60(2):89–108.

- Lobban, C. S., Harrison, P. J. & Duncan, M. J. 1985. The physiological Ecology of Seaweeds. Cambridge University Press, Cambridge. 242 pp.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. & Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.
- Lüning, K. 1990. Seaweeds: their environment, biogeography and ecophysiology. Wiley, New York. 527 pp.
- Mabeau, S. & Fleurence, J. 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci. Tech.* 4:103–107.
- Maberly, S. C. 1990. Exogenous sources of inorganic carbon for photosynthesis by marine macroalgae. *J. Phycol.* 26:439–449.
- Maberly, S., Raven, J. & Johnston, A. 1992. Discrimination between ^{12}C and ^{13}C by marine plants. *Oecologia* 91(4):481–492.
- Madsen, T. V. & Sand-Jensen, K. 1991. Photosynthetic carbon assimilation in aquatic macrophytes. *Aquat. Bot.* 41:5–40.
- Martins, A. P., Yokoya, N. S. & Colepicolo, P. 2016. Biochemical Modulation by Carbon and Nitrogen Addition in Cultures of *Dictyota menstrualis* (Dictyotales, Phaeophyceae) to Generate Oil-based Bioproducts. *Mar. Biotechnol.* 18:314–326.
- Martone, P. T. 2010. Quantifying growth and calcium carbonate deposition of *Calliarthron cheilosporioides* (Corallinales, Rhodophyta) in the field using a persistent vital stain. *J. Phycol.* 46:13–17.
- Mayakun, J., Bunruk, P. & Kongsang, R. 2014. Growth rate and calcium carbonate accumulation of *Halimeda macroloba* Decaisne (Chlorophyta: Halimedaceae) in Thai waters. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 36(4):419-423.
- Mayakun, J., Kim, J. H., Lapointe, B. E. & Prathep, A. 2012. Gametangial characteristics in the sexual reproduction of *Halimeda macroloba* Decaisne (Chlorophyta: Halimedaceae). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 34 (2): 211 - 216.
- McClanahan, T. R. & Muthiga, N. A. 1998. An ecological shift in a remote coral atoll of Belize over 25 years. *Environ. Conserv.* 25:122-130.
- McClanahan, T. R., Sala, E., Mumby, P.J. & Jones, S. 2004. Phosphorus and nitrogen enrichment do not enhance brown frondose “macroalgae”. *Mar. Pollut. Bull.* 48:196–199.
- McDermid, K. J. & Stuercke, B. 2003. Nutritional composition of edible Hawaiian seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 15:513–524.
- Medeiros, P. P. N. 1998. Relation between chemical composition of *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe, *Gymnogongrus griffithsiae* (Turner) Martius, and abiotic parameters. *Acta Bot. Bras.* 12(1):77-88.
- Mercado, J. M. 2002. Ecofisiología y bomba biológica en el océano. *Interciencia* 27(10):537-543.

- Mercado, J. M., Gordillo, L. F., Figueroa, L. F. & Niell, F. X. 1998. External carbonic anhydrase and affinity for inorganic carbon in intertidal macroalgae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221:209–220.
- Mercado, J. M., De los Santos, C. B., Pérez-Lloréns, J. L. & Vergara, J. J. 2009. Carbon isotope fractionation in macroalgae from Cádiz Bay (Southern Spain): Comparison with other bio-geographic regions. *Estuar. Coast Shelf. Sci.* 85:449–458.
- Meyer, F. W., Schubert, N., Diele, K., Teichberg, M., Wild, C. & Enríquez, S. 2016. Effect of inorganic and organic carbon enrichments (DIC and DOC) on the photosynthesis and calcification rates of two calcifying green algae from a Caribbean reef lagoon. *Plos One* 11(8):e0160268.
- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J. M. & Kloareg, B. 2010. Central and storage carbon metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*: insights into the origin and evolution of storage carbohydrates in Eukaryotes. *New Phytol.* 188:67–81.
- Miller, S. M., Wing, S. R. & Hurd, C. L. 2006. Photoacclimation of *Ecklonia radiata* (Laminariales, Heterokontophyta) in Doubtful Sound, Fjordland, Southern New Zealand. *Phycologia* 45:44–52.
- Miller, J. D. A. 1962. Fats and steroids, [in:] Lewin, R. A. (ed.) Physiology and biochemistry of algae, Acad. Press, New York. 929 pp.
- Moulin, P., Andría, J. R., Axelsson, L. & Mercado, J. M. 2011. Different mechanisms of inorganic carbon acquisition in red macroalgae (Rhodophyta) revealed by the use of TRIS buffer. *Aquat. Bot.* 95:31–38.
- Mouradi-Givernaud, A., Givernaud, Y., Morvan, H. & Cosson, J. 1993. Annual variations of the biochemical composition of *Gelidium lalifolium* (Greville) Thuret et Bomel. *Hidrobiologia* 260/261: 607 - 612.
- Mutchler, T., Dunton, K. H., Townsend-Small, A., Fredriksen, S. & Rasser, M. K. 2007. Isotopic and elemental indicators of nutrient sources and status of coastal habitats in the Caribbean Sea, Yucatan Peninsula, Mexico. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 74:449e457.
- Multer, H. G. & Clavijo, I. E. 2004. *Halimeda* investigations: progress and problems. NOAA/RSMAS. p. 116-127.
- Murthy, M. S. & Radia, P. 1978. Eco-biochemical studies on some economical important intertidal algae from Port Okha (India). *Bot. Mar.* 24:417-422.
- Mwalugha, H. M., Wakibia, J. G., Kenji, G. M. & Mwasaru, M. A. 2015. Chemical Composition of Common Seaweeds from the Kenya Coast. *J. Food Res.* 4(6):28-38.
- Newcomb, L. A., Milazzo, M., Hall-Spencer, J. M. & Carrington, E. 2015. Ocean acidification bends the mermaid's wineglass. *Biol. Lett.* 11:20141075.
- Olsen, K., Paul, J. V. & Ross, C. 2015. Direct effects of elevated temperature, reduced pH, and the presence of macroalgae (*Dictyota* spp.) on larvae of the Caribbean coral *Porites astreoides*. *Bull. Mar. Sci.* 91(2):1-16.

- Peach, K. E., Koch, M. S., Blackwelder, P. L. 2016. Effects of elevated pCO₂ and irradiance on growth, photosynthesis and calcification in *Halimeda discoidea*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 544:143-158.
- Pedersen, A., Kraemer, G. & Yarish, C. 2004. The effects of temperature and nutrient concentrations on nitrate and phosphate uptake in different species of *Porphyra* from Long Island Sound (USA). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 312:235–252.
- Pendleton, L. H., Hoegh-Guldberg, O., Langdon, C. & Comte, A. 2016. Multiple Stressors and Ecological Complexity Require a New Approach to Coral Reef Research. *Front. Mar. Sci.* 3:36.
- Peralta-García, E., Caamal-Fuentes, E., Robledo, D., Hernández-Núñez, E. & Freile-Pelegrín, Y. 2016. Lipid characterization of red alga *Rhodymenia pseudopalmata* (Rhodymeniales, Rhodophyta). *Phycol. Res.* 65(1):1-11.
- Porzio, L., Arena, C., Lorenti, M., De Maio, A. & Buia, M. C. 2020. Long-term response of *Dictyota dichotoma* var. *intricata* (C. Agardh) Greville (Phaeophyceae) to ocean acidification: Insights from high pCO₂ vents. *Sci. Total Environ.* 731:138896.
- Price, N. N., Hamilton, S. L., Tootell, S. J. & Smith, E. J. 2011. Species-specific consequences of ocean acidification for the calcareous tropical green algae *Halimeda*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 440:67–78.
- Rabanal, M., Ponce, N. M., Navarro, D. A., Gómez, R. M. & Stortz, C. A. 2014. The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: Chemical analysis and antiviral activity. *Carbohydr. Polym.* 101:804–811.
- Ramus, J., Beale, S. I., Mauzerall, D. & Howard, K. L. 1976. Changes in photosynthetic pigment concentration in seaweeds as a function of water depth. *Mar. Biol.* 37:223–229.
- Ramus, J., Lemons, F. & Zimmerman, C. 1977. Adaptation of light-harvesting pigments to downwelling light and the consequent photosynthetic performance of the eulittoral rockweeds *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Mar. Biol.* 42:293–303.
- Raven, J. A. 1984. Energetics and transport in aquatic plants. Liss, New York.
- Raven, J. A. 1997. Inorganic carbon acquisition by marine autotrophs. *Adv. Bot. Res.* 27:85–209.
- Raven, J. A. 1997. CO₂-concentrating mechanisms: a direct role for thylakoid lumen acidification. *Plant Cell Environ.* 20:147–154.
- Raven, J. A. 1995. Photosynthetic and non-photosynthetic roles of carbonic anhydrase in algae and cyanobacteria. *Phycologia* 34(2):93–101.
- Raven, J. A. 2001. A role for mitochondrial carbonic anhydrase in limiting CO₂ leakage from low CO₂-grown cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Environ.* 24:261–265.
- Raven, J. A. & Beardall, J. 2015. The ins and outs of CO₂. *J. Exp. Bot.* 67(1):1–13.

- Raven, J. A. & Hurd, C. L. 2012. Ecophysiology of photosynthesis in macroalgae. *Photosynth. Res.* 113:105–125.
- Raven, J. A., Johnston, A. M., Kübler, J. E., Korb, R., McInroy, S. G., Handley, LL., Scrimgeour, C. M., Walker, D. I., Beardall, J., Vanderklift, M., Fredriksen, S. & Dunton, K. H. 2002. Mechanistic interpretation of carbon isotope discrimination by marine macroalgae and seagrasses. *Funct. Plant Biol.* 29(3):355–378.
- Raven, J. A. & Lucas, W. J. 1985. The energetics of carbon acquisition. In: Inorganic carbon uptake by aquatic photosynthetic organisms, In: Lucas, W. J., Berry, J. A, eds. American Society of Plant Physiologists. Rockwell, Md. pp. 735-738.
- Raven, J. A. & Osmond, C. B. 1992. Inorganic C assimilation acquisition processes and their ecological significance in inter- and sub-tidal macroalgae of North Carolina. *Funct. Ecol.* 6:41–47.
- Reiskind, J. B., Beer, S. & Bowes, G. 1989. Photosynthesis, photorespiration and ecophysiological interactions in marine macroalgae. *Aquat. Bot.* 34:131-152.
- Reiskind, J. B. & Bowes, G. 1991. The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a marine macroalga with C4-like photosynthetic characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:2883–2887.
- Reiskind, J. B., Seamon, P. T. & Bowes, G. 1988. Alternative methods of photosynthetic carbon assimilation in marine macroalgae. *Plant Physiol.* 87:686–692.
- Renaud, S. M. & Luong-Van, J. T. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. *J. Appl. Phycol.* 18:381–387.
- Richardson, K., Beardall, J. & Raven, J. A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* 93:157-191.
- Robin A, Chavel P, Chemodanov A, Israel A, Golberg A (2017) Diversity of monosaccharides in marine macroalgae from the Eastern Mediterranean Sea. *Algal Res.* 28:118–127.
- Robledo, D. & Freile-Pelegrín, Y. 2005. Seasonal variation in photosynthesis and biochemical composition of *Caulerpa* spp. (Bryopsidales, Chlorophyta) from the Gulf of Mexico. *Phycologia* 44(3):312–319.
- Rodríguez-Martínez, R. E., Ruíz-Rentería, F., Van Tussenbroek, B., Barba-Santos, G., Escalante-Mancera, E., Jordán-Garza, G. & Jordán-Dahlgren, E. 2010. Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Rev. Biol. Trop.* 58(3):23-43.
- Rosenbergl, G. & Ramus, J. 1982. Ecological Growth Strategies in the Seaweeds *Gracilaria foliifera* (Rhodophyceae) and *Ulva* sp. (Chlorophyceae): Photosynthesis and Antenna Composition. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 8:233-241.
- Rotem, A., Roth-Bejerano, N. & Arad, S. M. 1986. Effect of controlled environmental conditions on starch and agar contents of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae). *J. Phycol.* 22:117-121.

- Rousvoal, S., Groisillier, A., Dittami, S. M., Michel, G., Boyen, C. & Tonon, T. 2011. Mannitol-1-phosphate dehydrogenase activity in *Ectocarpus siliculosus*, a key role for mannitol synthesis in brown algae. *Planta* 233:261–273.
- Russell, B. D., Harley, C. D. G., Wernberg, T., Mieszkowska, N. & Connell, S. D. 2012. Predicting ecosystem shifts requires new approaches that integrate the effects of climate change across entire systems. *Glob.Change Biol.* 8:30–32.
- Russell, B. D., Thompson, J. A., Falkenberg, L. J. & Connell, S. D. 2009. Synergistic effects of climate change and local stressors: CO₂ and nutrient-driven change in subtidal rocky habitats. *Glob. Chang. Biol.* 15:2153–2162.
- Sand-Jensen, K. & Gordon, D. M. 1984. Differential ability of marine and freshwater macrophytes to utilize HCO₃⁻ and CO₂. *Mar. Biol.* 80:247–253.
- Scherner, F., Pereira, C., Duarte, G., Horta, P. A., Castro, C. B, Barufi, J. B. & Barreto, P. S. 2016. Effects of Ocean Acidification and Temperature Increases on the Photosynthesis of Tropical Reef Calcified Macroalgae. *PLoS ONE* 11(5):e0154844.
- Shevela, D., Bjorn, O. L. & Govindjee 2013. Oxygenic Photosynthesis. Chapter 2. In: Razeghifard, R. (Ed) Natural and Artificial Photosynthesis: Solar Power as an Energy Source. First Edition. John Wiley & Sons, Inc. pp. 13-63.
- Scheufen, T., Krämer, W. E., Iglesias-Prieto, R. & Enríquez, S. 2017. Seasonal variation modulates coral sensibility to heat-stress and explains annual changes in coral productivity. *Sci. Rep.* 7: 4937.
- Shulman, M. J. & Robertson, D. R. 1996. Changes in the coral reefs of San Blas, Caribbean Panama: 1983 to 1990. *Coral Reefs* 15:231-236.
- Sinutok, S., Hill, R., Doblin, M. A., Kühl, M. & Ralph, P. J. 2012. Microenvironmental changes support evidence of photosynthesis and calcification inhibition in *Halimeda* under ocean acidification and warming. *Coral Reefs* 31:1201–1213.
- Sinutok, S., Hill, R., Doblin, M. A., Wuhrer, R. & Ralph, P. J. 2011. Warmer more acidic conditions cause decreased productivity and calcification in subtropical coral reef sediment dwelling calcifiers. *Limnol. Oceanogr.* 56:1200–1212.
- Sinutok, S., Pongparadon, S. & Prathep, A. 2008. Seasonal variation in density, growth rate and calcium carbonate accumulation of *Halimeda macroloba* Decaisne at Tangkhen Bay, Phuket Province, Thailand. *Malaysian J. Sci.* 27(2):1-8.
- Smith, R. G. & Bidwell, R. G. S. 1987. Carbonic anhydrase-dependent inorganic carbon uptake by the red macroalga, *Chondrus crispus*. *Plant Physiol.*, 83:735–738.
- Stengel, D. B., Conde-Álvarez, R., Connan, S., Nitschke, U., Arenas, F., Abreu, H., Barufi, J. B., Chow, F., Robledo, D., Malta, E. J., Mata, M., Konotchick, T., Nassar, C., Pérez-Ruzafa, A., López, D., Marquardt, R., Vaz-Pinto, F., Celis Plá, P., Hermoso, M., Ruiz, E., Ordoñez, G., Flores, P., Zanolla, M., Bañares-España, E., Altamirano, M., Korbee, N., Bischof, K. & Figueroa, F. L. 2014. Short-term effect of CO₂, nutrients and temperature on three marine macroalgae under solar radiation. *Aquat. Biol.* 22(20):159–176.

- Sültemeyer, D. F. 1998. Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: characteristics, regulation, and possible function during photosynthesis. *Can. J. Bot.* 76:962–972.
- Surif, M. B. & Raven, J. A. 1989. Exogenous inorganic carbon sources for photosynthesis in seawater by members of the Fucales and the Laminariales (Phaeophyta): ecological and taxonomic implications. *Oecologia* 78:97–105.
- Szmant, A. M. 2001. Introduction to the special issue of Coral Reefs on Coral Reef Algal Community Dynamics. Why are reef world-wide becoming overgrown by algae? Algae, algae everywhere, and nowhere a bite to eat. *Coral Reefs* 19:299–302.
- Teichberg, M., Fricke, A. & Bischof, K. 2013. Increased physiological performance of the calcifying green macroalga *Halimeda opuntia* in response to experimental nutrient enrichment on a Caribbean coral reef. *Aquat. Bot.* 104:25–33.
- Thakur, M. C., Reddy, C. R. K. & Jha, B. 2008. Seasonal variation in biomass and species composition of seaweeds stranded along Port Okha, northwest coast of India. *J. Earth Syst. Sci.* 117(3):211–218.
- Thomas, M. L. H. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macro-flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyzer. In: Lobban, C. S., Chapman, D. J. & Kremer, B. P. eds. *Experimental Phycology: A Laboratory Manual*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 64–77.
- Timm, S., Florian, A., Arrivault, S., Stitt, M., Fernie, A. R. & Bauwe, H. 2012. Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth. *FEBS Letters* 586:3692–3697.
- Tronholm, A., Afonso-Carrillo, J., Sansón, M., Leliaert, F., Fernández-García, C., & De Clerck, O. 2013. Taxonomy of the *Dictyota ciliolata–crenulata* complex (Dictyotales, Phaeophyceae). *Phycologia* 52:171–181.
- Tsuzuki, M. & Miyachi, S. 1989. The function of carbonic anhydrase in aquatic photosynthesis. *Aquat. Bot.* 34:85–104.
- Van Den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 623 pp.
- Van Duyl, F. C., Mueller, B. & Meesters, E. H. 2018. Spatio–temporal variation in stable isotope signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of sponges on the Saba Bank. *PeerJ* 6:e5460.
- Van Tussenbroek, B. & van Dijk, J. K. 2007. Spatial and temporal variability in biomass and production of psammophytic *Halimeda incrassata* (Bryopsidales, Chlorophyta) in a Caribbean reef lagoon. *J. Phycol.* 43, 69–77.
- Vásquez-Elizondo, R. M. & Enríquez, S. 2016. Coralline algal physiology is more adversely affected by elevated temperature than reduced pH. *Sci. Rep.* 6:1–14.
- Verbruggen, H. & Kooistra, W. 2004. Morphological characterization of lineages within the calcified tropical seaweed genus *Halimeda*. *Eur. J. Phycol.* 39:213–228.

- Vogel, N., Meyer, F. W., Wild, C. & Uthicke, S. 2015. Decreased light availability can amplify negative impacts of ocean acidification on calcifying coral reef organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 521:49–61.
- Vroom, P. S., Smith, C. M., Coyer, J. A., Walters, L. J., Hunter, C. L., Beach, K. S. & Smith, J. E. 2003. Field biology of *Halimeda tuna* (Bryopsidales, Chlorophyta) across a depth gradient: comparative growth, survivorship, recruitment, and reproduction. *Hydrobiologia* 501:149–166.
- Walaku, K. J. 2006. Calcareous algae of a tropical lagoon. Primary Productivity, Calcification and Carbonate Production. Doctoral dissertation in plant physiology. Department of Botany. Stockholm University. Sweden. ISBN 91-7155-187-5. PrintCenter. Stockholm. 48 pp.
- Walters, L.J. & Smith, C.M. 1994. Rapid rhizoid production in *Halimeda discoidea* Decaisne (Chlorophyta, Caulerpales) fragments: a mechanism for survival after separation from adult thalli. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 175:105–120.
- Walters, L. J., Smith, C. M., James A. Coyer, J. A., Hunter, C. L., Beach, K. S. & Vroom, P. S. 2002. Asexual propagation in the coral reef macroalga *Halimeda* (Chlorophyta, Bryopsidales): production, dispersal and attachment of small fragments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 278:47–65.
- Wernberg, T., Thomsen, M. S., Tuya, F., Kendrick, G. A., Staehr, P. A. & Toohy, B. D. 2010. Decreasing resilience of kelp beds along a latitudinal temperature gradient: potential implications for a warmer future. *Ecol. Lett.* 13:685–694.
- Williams, S. L. 1984. Uptake of sediment ammonium and translocation in a marine green macroalga *Caulerpa cupressoides*, *Limnol. Oceanogr.* 29:374-379.
- Williams, I. D. & Polunin, N. V. C. 2001. Large-scale associations between macroalgal cover and grazer biomass on mid-depth reefs in the Caribbean. *Coral Reefs* 19:358-366.
- Wing, S. R., Leichter, J. J., Perrin, C., Rutger, S. M., Bowman, M. H. & Cornelisen, C. D. 2007. Topographic shading and wave exposure influence morphology and ecophysiology of *Ecklonia radiata* (C. Aghard 1817) in Fiordland. *N. Z. Limnol. Oceanogr.* 52:1853–1864.
- Wu, H., Zou, D. & Gao, K. 2008. Impacts of increased atmospheric CO₂ concentration on photosynthesis and growth of micro- and macro-algae. *Sci. China Life Sci.* 51:1144–1150.
- Wysor, B. & De Clerck, O. 2003. An Updated and Annotated List of Marine Brown Algae (Phaeophyceae) of the Caribbean Coast of the Republic of Panama. *Bot. Mar.* 46:151–160.
- Xu, J., Fan, X., Zhang, X., Xu, D., Mou, S., Cao, S., Zheng, Z., Miao, J. & Ye, N. 2012. Evidence of Coexistence of C3 and C4 Photosynthetic Pathways in a Green-Tide-Forming Alga, *Ulva prolifera*. *Plos One* 7(5):e37438.
- Zar, J. H. 1996. Biostatistical analysis. Prentice-Hall, Eryelwood Cliffs, N.J. 663 pp. Printed.

- Zavodnik, N. 1973. Seasonal variations in rate of photosynthetic activity and chemical composition of the littoral seaweeds common to North Adriatic. Part I. *Fucus virsoides* (Don) J. Ag. *Bot. Mar.* 16(3):155-165.
- Zou, D. 2014. The effects of severe carbon limitation on the green seaweed, *Ulva conglobata* (Chlorophyta). *J. Appl. Phycol.* 26:2417–2424.
- Zou, D. & Gao, K. 2014. The photosynthetic and respiratory responses to temperature and nitrogen supply in the marine green macroalga *Ulva conglobata* (Chlorophyta). *Phycol.* 53 (1), 86–94.
- Zou, D., Gao, K. & Luo, H. 2011. Short and long-term effects of elevated CO₂ on photosynthesis and respiration in the marine macroalga *Hizikia fusiformis* (Sargassaceae, Phaeophyta) grown at low and high N supplies. *J. Phycol.* 47:87-97.
- Zubia, M., Freile-Pelegrín, Y. & Robledo, D. 2014. Photosynthesis, pigment composition and antioxidant defenses in the red alga *Gracilaria tenuifrons* (Gracilariiales, Rhodophyta) under environmental stress. *J. Appl. Phycol.* 26:2001-2010.
- Zuñiga-Rios, D., Martínez-Daranas, B. & Alcolado, P. M. 2012. Ficoflora de los arrecifes coralinos del archipiélago Sabana-Camagüey, Cuba. *Ser. oceanol.* 11:57-76.
- Zuñiga-Rios, D. 2016. Macroalgas de los arrecifes de coral del archipiélago Jardines de la Reina, Cuba. En: Rey-Villiers, N. (ed.). Línea base ambiental para el estudio del cambio climático en el golfo de Cazones y el archipiélago Jardines de la Reina, Cuba. Instituto de Oceanología, CITMA, La Habana, Cuba. ISBN: 978-959-298-038-9. pp. 151-162.
- Zweng, R. C., Koch, M. S. & Bowes, G. 2018. The role of irradiance and C-use strategies in tropical macroalgae photosynthetic response to ocean acidification. *Sci. Rep.* 8:9479.

SUPLEMENTOS

Tabla S1: Diseño de experimento para probar el efecto interactivo de la temperatura, el pH y los niveles de nutrientes sobre la fotosíntesis bruta de *H. scabra*.

KNO ₃ :K ₃ PO ₄ (μM)	pH	Temperatura (°C)
Bajo (1.0:0.1)	7.5	24
		28
		33
	8.2	24
		28
		33
	8.6	24
		28
		33
Medio (5.0:0.5)	7.5	24
		28
		33
	8.2	24
		28
		33
	8.6	24
		28
		33
Alto (10.0:1.0)	7.5	24
		28
		33
	8.2	24
		28
		33
	8.6	24
		28
		33
Control (Sin nutrientes)	7.5	24
		28
		33
	8.2	24
		28
		33
	8.6	24
		28
		33

Tabla S2: Resultados del ANOVA de tres vías y de la prueba de comparaciones múltiples Post hoc Newman-Keuls para detectar diferencias significativas entre tratamientos y niveles.

Fuentes de variación	media	SS	DF	MS	F	p
Temperatura		10.032	2	5.016	45.30	0.000000
24°C	1.1665 ^b					
28°C	1.2219 ^b					
33°C	1.4318 ^a					
pH		0.629	2	0.315	2.84	0.058977ns
Nutrientes (KNO ₃ :K ₃ PO ₄)		1.584	3	0.528	4.77	0.002681
1.0:0.1	1.3085 ^a					
5.0:0.5	1.1977 ^b					
10.0:1.0	1.2794 ^a					
0.0:0.0 control	1.3106 ^a					
Temperatura*pH		1.195	4	0.299	2.70	0.029806
24°C*pH 7.5	1.256 ^b					
24°C*pH 8.2	1.184 ^{bc}					
24°C*pH 8.6	1.059 ^c					
28°C*pH 7.5	1.197 ^{bc}					
28°C*pH 8.2	1.256 ^b					
28°C*pH 8.6	1.213 ^{bc}					
33°C*pH 7.5	1.435 ^a					
33°C*pH 8.2	1.438 ^a					
33°C*pH 8.6	1.427 ^a					
Temperatura*nutrientes		6.858	6	1.143	10.32	0.000000
24°C*1.0:0.1	1.408 ^a					
24°C*5.0:0.5	1.081 ^d					
24°C*10.0:1.0	1.094 ^d					
24°C*control	1.082 ^d					
28°C*1.0:0.1	1.163 ^{cd}					
28°C*5.0:0.5	1.149 ^d					
28°C*10.0:1.0	1.204 ^{bcd}					
28°C*control	1.372 ^{ab}					
33°C*1.0:0.1	1.355 ^{abc}					
33°C*5.0:0.5	1.363 ^{ab}					
33°C*10.0:1.0	1.540 ^a					
33°C*control	1.478 ^a					
pH*nutrientes		6.130	6	1.022	9.23	0.000000
7.5*1.0:0.1	1.291 ^{abc}					
7.5*5.0:0.5	1.296 ^{abc}					
7.5*10.0:1.0	1.149 ^{cd}					
7.5*control	1.446 ^a					
8.2*1.0:0.1	1.349 ^{ab}					
8.2*5.0:0.5	1.202 ^{bcd}					
8.2*10.0:1.0	1.274 ^{abcd}					
8.2*control	1.349 ^{ab}					
8.6*1.0:0.1	1.285 ^{abcd}					

8.6*5.0:0.5	1.095 ^d				
8.6*10.0:1.0	1.414 ^a				
8.6*control	1.138 ^{cd}				
Temperatura*pH*nutrientes		6.070	12	0.506	4.57
24°C*7.5*1.0:0.1	1.406 ^{bcde}				
24°C*7.5*5.0:0.1	1.446 ^{bc}				
24°C*7.5*10.0:1.0	1.022 ^{fgh}				
24°C*7.5*control	1.147 ^{bcdefgh}				
24°C*8.2*1.0:0.1	1.451 ^{bc}				
24°C*8.2*5.0:0.5	0.877 ^h				
24°C*8.2*10.0:1.0	1.196 ^{bcdefgh}				
24°C*8.2*control	1.213 ^{bcdefgh}				
24°C*8.6*1.0:0.1	1.366 ^{bcdef}				
24°C*8.6*5.0:0.5	0.921 ^{gh}				
24°C*8.6*10.0:1.0	1.063 ^{efgh}				
24°C*8.6*control	0.887 ^h				
28°C*7.5*1.0:0.1	1.186 ^{bcdefgh}				
28°C*7.5*5.0:0.1	1.105 ^{bcdefgh}				
28°C*7.5*10.0:1.0	1.081 ^{cdefgh}				
28°C*7.5*control	1.413 ^{bcde}				
28°C*8.2*1.0:0.1	1.132 ^{bcdefgh}				
28°C*8.2*5.0:0.5	1.271 ^{bcdefg}				
28°C*8.2*10.0:1.0	1.179 ^{bcdefgh}				
28°C*8.2*control	1.442 ^{bcd}				
28°C*8.6*1.0:0.1	1.169 ^{bcdefgh}				
28°C*8.6*5.0:0.5	1.069 ^{defgh}				
28°C*8.6*10.0:1.0	1.352 ^{bcdef}				
28°C*8.6*control	1.260 ^{bcdefg}				
33°C*7.5*1.0:0.1	1.279 ^{bcdef}				
33°C*7.5*5.0:0.1	1.337 ^{bcdef}				
33°C*7.5*10.0:1.0	1.345 ^{bcdef}				
33°C*7.5*control	1.779 ^a				
33°C*8.2*1.0:0.1	1.464 ^b				
33°C*8.2*5.0:0.5	1.457 ^{bc}				
33°C*8.2*10.0:1.0	1.447 ^{bcd}				
33°C*8.2*control	1.385 ^{bcdef}				
33°C*8.6*1.0:0.1	1.320 ^{bcdef}				
33°C*8.6*5.0:0.5	1.294 ^{bcdef}				
33°C*8.6*10.0:1.0	1.828 ^a				
33°C*8.6*control	1.268 ^{bcdefg}				

Tabla S3. Comparación de parámetros ecofisiológicos evaluados en *H. scabra* y *D. ciliolata*.

Aspectos ecofisiológicos	<i>H. scabra</i>	<i>D. ciliolata</i>
Grupo Taxonómico	Chlorophyta	Phaeophyta
Morfología	Calcificante	Carnosa aplanada
Tipo de reproducción	Sexual (no detectada) y asexual por fragmentación	Sexual y asexual por fragmentación
Biomasa	Estacionalmente similar	Decrece en lluvias (verano)
Sustrato	Sobre rocas (disco basal)	Sobre rocas (disco basal y rizoides)
Pigmentos	Se incrementan en secas	Se incrementan en secas
Fotosíntesis máxima	Estacionalmente similar (1.76±0.4 secas a 2.00±0.5 lluvias)	Estacionalmente similar (14.52±1.0 secas a 14.8±1.6 lluvias)
Respiración	Superior en lluvias (-1.25±0.39 Secas a -3.12±0.41 Lluvias)	Superior en lluvias (-5.09±0.87 Secas a -9.92±1.61 Lluvias)
$\delta^{13}C$	-23.96‰	-20.4‰
Incorporación de $NaH^{13}CO_3$	Incorporan ^{13}C en aspartato en luz y en oscuridad.	No evaluada
Anhidrasa carbónica externa	No inhibición de la P_{max} por AZ	No inhibición de la P_{max} por AZ
Anhidrasa carbónica interna	Inhibición del 22% de la P_{max}	Inhibición del 58% de la P_{max}
MCC	Probable actividad de fotosíntesis C4	No identificado
Respuesta fotosintética al efecto interactivo de t°C, pH y nutrientes	Incrementa su P_{gross} en alta temperatura del agua de mar con pH alcalino y altos niveles de nutrientes. Una disminución del pH con alta temperatura y concentración de nutrientes disminuyen su rendimiento fotosintético	No evaluado, pero incrementa su abundancia en la estación de secas cuando la temperatura es más baja
Monosacáridos	No identificados	Manitol, Rha, Ara, GlcN, Gal, Glc, Man, Xyl, Fruc y GlcA