

Caracterización bioquímica del pasto marino *Zostera marina* en el límite sur de su distribución en el Pacífico Norte

Biochemical characterization of the eelgrass *Zostera marina* at its southern distribution limit in the North Pacific

Alejandro Cabello-Pasini¹

Raquel Muñiz-Salazar¹

David H. Ward²

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada, Baja California 22800, México
E-mail: acabello@uabc.mx

² U.S. Geological Survey, Alaska Science Center
1011 E. Tudor Rd.
Anchorage, Alaska 99503, USA

Recibido en octubre de 2002; aceptado en marzo de 2003

Resumen

El pasto marino *Zostera marina* L. se distribuye a lo largo de la península de Baja California (México) y está expuesto a un amplio rango de irradiancias y temperaturas que podrían modificar su composición bioquímica. En consecuencia, el objetivo de este estudio fue el de caracterizar las variaciones en la concentración de clorofila, carbohidratos, proteínas, fibra, ceniza y calorías en los haces de *Z. marina* de poblaciones del norte (San Quintín) y el sur (Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio) de Baja California, México. En las lagunas costeras del sur, la temperatura de la columna de agua fue aproximadamente 5–6°C más alta que en la laguna del norte de la península. Al igual que la temperatura, la irradiancia *in situ* fue dos veces mayor en las lagunas del sur que en la laguna del norte. Como resultado de los menores niveles de irradiancia, los niveles de clorofila en las hojas de *Z. marina* fueron aproximadamente dos veces mayores en las poblaciones del norte (1.7 mg gPH⁻¹) que en las del sur (0.8 mg gPH⁻¹) de Baja California. Al igual que la clorofila, los niveles de carbohidratos solubles en las hojas fueron mayores en las poblaciones del norte que en las del sur, lo cual sugiere que los altos niveles de clorofila son suficientes para compensar los bajos niveles de irradiancia en la laguna del norte, y mantener un balance de carbono positivo. Por el contrario, los niveles de proteínas en las hojas de *Z. marina* de la laguna costera del norte de la península fueron ligeramente menores que en las del sur. En general los resultados sugieren que las diferentes condiciones ambientales a las que están expuestas las poblaciones de *Z. marina* en Baja California impactan su composición bioquímica.

Palabras clave: *Zostera marina*, Baja California, composición química, clorofila, estacionalidad.

Abstract

The eelgrass *Zostera marina* L. is distributed along the Baja California Peninsula (Mexico) where it is exposed to a wide range of irradiances and temperatures that could promote changes in its biochemical composition. Consequently, the objective of this study was to characterize the variations in the levels of chlorophyll, carbohydrates, proteins, fiber, ash and calories in the shoots of *Z. marina* from the north (San Quintín) and south (Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons) of the peninsula. Temperature in the southern lagoons was 5–6°C higher than in the northern lagoon; likewise, *in situ* irradiance was two-fold greater in the south than in the north. As a result of the lower irradiance levels, the concentration of chlorophyll in the shoots of *Z. marina* was twice as high (1.7 mg gWW⁻¹) in the northern lagoon than in the southern ones (0.8 mg gWW⁻¹). Similar to chlorophyll levels, the concentration of soluble carbohydrates in the shoots was greater in the northern lagoon than in the southern ones, suggesting that the high levels of chlorophyll are enough to compensate for the low irradiance levels and to maintain a positive carbon balance at San Quintín. On the other hand, the levels of proteins in the shoots from the north of the peninsula were slightly lower than those from the southern populations. In general, these results suggest that the different environmental conditions to which *Z. marina* is exposed along the peninsula impact its biochemical composition.

Key words: *Zostera marina*, Baja California, chemical composition, chlorophyll, seasonality.

Introducción

Zostera marina L. es uno de los pastos con más amplia distribución y mayor abundancia en el litoral del Pacífico mexicano (Ibarra-Obando, 1989). En la península de Baja California, *Z. marina* habita lagunas costeras y zonas costeras semiprotegidas desde Ensenada (30°N) hasta Bahía Magdalena (24°N) (Cabello-Pasini, 1984; Riosmena-Rodríguez y Sánchez-Lizaso, 1996; Cabello-Pasini *et al.*, 2002; Cabello-Pasini *et al.*, 2003). Estas praderas están distribuidas discontinuamente a lo largo de la península formando poblaciones fenotípica y genotípicamente bien diferenciadas (Cabello-Pasini *et al.*, 2003; Muñiz-Salazar *et al.*, en prensa).

La morfología, densidad de haces, crecimiento, esfuerzo reproductor y características fotosintéticas varían en pastos expuestos a rangos amplios de temperatura e irradiancia (Keller y Harris, 1966; Backman y Barilotti, 1976; McMillan, 1978; Alcoverro *et al.*, 1999; Meling-López e Ibarra-Obando, 1999). El norte de la península de Baja California se caracteriza por ser una región templada y estar influenciada por eventos de surgencia recurrentes, mientras que el sur de la península es una región tropical con una importante influencia de Aguas Superficiales Ecuatoriales caracterizadas por sus altas temperaturas (Castro *et al.*, 2000). Lo anterior provoca que la temperatura del agua de mar en el sur de Baja California sea de 7°C a 15°C más alta que en las aguas de la región norte (Castro *et al.*, 2000; Durazo-Arvizu *et al.*, 2001). Por otro lado, la irradiancia incidente en el norte de la península es aproximadamente dos veces menor que en el sur (Cabello-Pasini *et al.*, 2003). Las concentraciones de nutrientes en la columna de agua son también más elevadas en la región norte que en el sur. Como resultado de estas variaciones en las condiciones ambientales, *Z. marina* se ha aclimatado o adaptado para sobrevivir a lo largo de su rango de distribución en Baja California. Los pastos del norte, por ejemplo, están expuestos a menores niveles de irradiancia, y son de dos a tres veces más largos y dos veces más anchos que los de las lagunas del sur, con lo cual aumentan su exposición a la irradiancia incidente (Cabello-Pasini *et al.*, 2003).

Las praderas de *Z. marina* juegan un papel crítico en la ecología de estuarios y lagunas costeras del mundo entero. En Baja California, además de modificar la química de la columna de agua y estabilizar los sedimentos, las praderas de *Z. marina* son hábitat y alimento de invertebrados y vertebrados marinos. Las hojas de este pasto, por ejemplo, son consumidas por tortugas (Felger *et al.*, 1980; Brand-Gardner *et al.*, 1999), mientras que la lapa *Tectura depicta* consume la región epitelial y epífitas de las hojas en California (Zimmerman *et al.*, 1996) y Baja California (A. Cabello-Pasini, obs. pers.). Además, decenas de miles de brantas negras (*Branta bernicla*) dependen exclusivamente del consumo de *Z. marina* para sobrevivir durante su migración invernal de Alaska y Canadá hacia las lagunas de Baja California (Reed *et al.*, 1998). En consecuencia, las variaciones en la composición bioquímica de *Z. marina* podrían ser

Introduction

Zostera marina L. is one of the most widely distributed and abundant seagrasses on the Pacific coast of Mexico (Ibarra-Obando, 1989). Along the Baja California Peninsula, it inhabits coastal lagoons and semi-protected coastal areas from Ensenada (30°N) to Magdalena Bay (24°N) (Cabello-Pasini, 1984; Riosmena-Rodríguez and Sánchez-Lizaso, 1996; Cabello-Pasini *et al.*, 2002; Cabello-Pasini *et al.*, 2003). These beds are discontinuously distributed, forming phenotypically and genotypically distinct populations (Cabello-Pasini *et al.*, 2003; Muñiz-Salazar *et al.*, in press).

The morphology, shoot density, growth, reproductive effort and photosynthetic characteristics vary in seagrasses exposed to wide ranges of temperature and irradiance (Keller and Harris, 1966; Backman and Barilotti, 1976; McMillan, 1978; Alcoverro *et al.*, 1999; Meling-López and Ibarra-Obando, 1999). The north of the Baja California Peninsula is a temperate region that is influenced by recurrent upwelling events, while the south is a tropical region that is strongly influenced by warmer Equatorial Surface Waters (Castro *et al.*, 2000); hence, water temperatures are 7–15°C higher in the south than in the north (Castro *et al.*, 2000; Durazo-Arvizu *et al.*, 2001). On the other hand, irradiance in the north of the peninsula is approximately two times lower than in the south (Cabello-Pasini *et al.*, 2003). Nutrient concentration in the water column is also greater in the north than in the south. As a result of these differences in environmental conditions, *Z. marina* has acclimated or adapted to survive throughout its range of distribution along the Baja California Peninsula. Seagrasses in the north, for example, are exposed to lower levels of irradiance, and the leaves are two to three times longer and two times wider than those in the southern lagoons, thus increasing their exposure to the incident irradiance (Cabello-Pasini *et al.*, 2003).

Zostera marina beds play a critical role in the ecology of estuaries and coastal lagoons throughout the world. In Baja California, besides modifying the chemistry of the water column and stabilizing the sediments, *Z. marina* beds provide food and habitat for marine organisms. The leaves, for example, are consumed by sea turtles (Felger *et al.*, 1980; Brand-Gardner *et al.*, 1999), while the limpet *Tectura depicta* consumes the epithelial region and epiphytes of the leaves in California (Zimmerman *et al.*, 1996) and Baja California (A. Cabello-Pasini, pers. obs.). The goose black brant (*Branta bernicla*) feeds almost exclusively on *Z. marina* leaves during its winter stay in the coastal lagoons of Baja California after its migration from Alaska and Canada (Reed *et al.*, 1998). Consequently, variations in the biochemical composition of *Z. marina* could prove critical for the physiology of organisms that feed on this seagrass.

The biochemical composition of seagrasses and other marine autotrophs is also strongly regulated by environmental parameters such as light intensity and quality, photoperiod, temperature, nutrient concentration, and herbivory. For

críticas para la fisiología de los organismos que pastorean sobre este vegetal marino.

Al igual que la fisiología, la composición bioquímica de pastos y otros vegetales marinos está regulada en gran medida por parámetros ambientales tales como intensidad y calidad de luz, fotoperiodo, temperatura, nutrientes y pastoreo. Una reducción > 80% de la irradiancia por unas semanas debido a la resuspensión de sedimento, por ejemplo, resultó en la disminución de dos a cuatro veces la concentración inicial del contenido de carbohidratos solubles en las hojas de *Z. marina* (Burke *et al.*, 1996; Cabello-Pasini *et al.*, 2002). Por otro lado, la reducción experimental del fotoperiodo provocó un incremento en los niveles de clorofila en las hojas en *Z. marina* (Dennison y Alberte, 1985). En vegetales marinos de Baja California también se han observado cambios en los niveles de lípidos, proteínas, fibra y otros constituyentes químicos como resultado de cambios estacionales de temperatura e irradiancia en la columna de agua (Rodríguez-Montesinos y Hernández-Carmona, 1991). No obstante que existen diferencias en la temperatura e irradiancia incidente en el norte y sur de la península (Cabello-Pasini *et al.*, 2003), se desconoce si estas variaciones afectan la composición bioquímica de los pastos en Baja California. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue el de caracterizar las variaciones en la concentración de clorofila, carbohidratos, proteínas, fibra, ceniza y calorías en los haces de *Z. marina* del norte (San Quintín) y del sur (lagunas Ojo de Liebre y San Ignacio) de Baja California. Las diferencias en la composición metabólica fueron relacionadas con los cambios latitudinales y estacionales de irradiancia y temperatura en las diferentes lagunas.

Métodos

Áreas de estudio

Se muestrearon praderas de *Z. marina* de Bahía San Quintín (SQ), Laguna Ojo de Liebre (OL) y Laguna San Ignacio (SI), en la península de Baja California, aproximadamente cada dos meses de febrero de 1999 a marzo de 2000 (fig. 1). San Quintín se localiza cerca del límite norte de la distribución de *Z. marina* en Baja California, mientras que las praderas de OL y SI se encuentran localizadas cerca del límite sur de su distribución en la península, así como del límite sur de su distribución en la costa del Pacífico del Hemisferio Norte. San Quintín tiene un área aproximada de 42 km², mientras que OL y SI tienen un área de aproximadamente 430 y 230 km², respectivamente.

La temperatura de la columna de agua en las praderas de *Z. marina* de las lagunas costeras fue monitoreada cada 0.5 h a lo largo del periodo de estudio utilizando termistores submarinos programables (Onset Computers, EE.UU.). Los termistores submarinos fueron previamente calibrados en el laboratorio contra termómetros digitales. La radiación fotosintéticamente activa fue monitoreada cada 0.5 h en los sitios a lo largo del periodo de estudio utilizando sensores radiométricos

example, a reduction in irradiance of > 80% for a few weeks because of resuspended sediment resulted in a decrease of two to four times the initial soluble carbohydrate content in *Z. marina* leaves (Burke *et al.*, 1996; Cabello-Pasini *et al.*, 2002). On the other hand, the reduction of the experimental photoperiod caused an increase in the chlorophyll levels in *Z. marina* leaves (Dennison and Alberte, 1985). Changes in the levels of lipids, proteins, fiber and other chemical constituents as a result of seasonal changes in temperature and irradiance in the water column have also been observed in submerged aquatic vegetation of Baja California (Rodríguez-Montesinos and Hernández-Carmona, 1991). Even though there are differences in temperature and incident irradiance in the north and south of the peninsula (Cabello-Pasini *et al.*, 2003), it is not known whether these differences affect the biochemical composition of the seagrasses. Consequently, the objective of this study was to characterize the variation in the concentration of chlorophyll, carbohydrates, proteins, fiber, ash and calories in *Z. marina* shoots from the north (San Quintín) and south (Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons) of the Baja California Peninsula. The differences in metabolic composition were related to latitudinal and seasonal variations of incident irradiance and water temperature at the three sites.

Methods

Study sites

Zostera marina meadows from San Quintín, Ojo de Liebre Lagoon and San Ignacio Lagoon along the Baja California Peninsula (fig. 1) were sampled approximately every two months from February 1999 to March 2000. San Quintín is

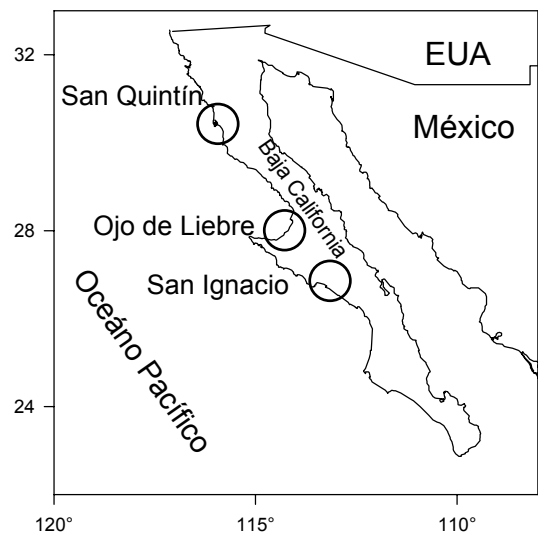


Figura 1. Localización de Bahía San Quintín, y las lagunas Ojo de Liebre y San Ignacio en la costa del Pacífico de Baja California, México.

Figure 1. Location of San Quintín Bay, and Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons on the Pacific coast of the Baja California Peninsula, Mexico.

submarinos 4 π (LI-193SA, LI-COR, EE.UU.). En las tres lagunas costeras, los sensores fueron fijados justo sobre el dosel de las praderas de los pastos. Cada dos meses se limpió la acumulación de pequeñas cantidades de bioincrustación de los sensores, sin embargo, no se observó un efecto de estos depósitos sobre las mediciones de luz. La irradiancia sobre las praderas de *Z. marina* fue integrada diariamente del amanecer al atardecer, y calculada como mol cuanta $m^{-2} d^{-1}$.

Caracterización bioquímica

Se recolectaron manualmente haces de *Z. marina* durante marea baja aproximadamente cada dos meses en SQ, OL y SI. En cada laguna se recolectaron haces sin raíces ni rizomas de la profundidad intermedia de distribución de las praderas. Los haces fueron colocados en hieleras con agua de mar a aproximadamente 17°C y transportados al laboratorio en Ensenada, Baja California. Los análisis de clorofilas, carbohidratos solubles y proteínas se realizaron en el laboratorio con tejido fresco 24–48 h después de la recolección del material. El resto del material fue deshidratado a 60°C, y posteriormente, se realizaron los análisis de ceniza, fibra y calorías.

El contenido de clorofila en las hojas de *Z. marina* se evaluó por medio de extracción con acetona. Aproximadamente 0.1 g de tejido ($n = 6$) de la hoja no. 2 se pulverizó con un homogeneizador de tejido de vidrio y 5 mL de acetona al 90% (v/v). El homogeneizado se centrifugó a $2000 \times g$ por 15 min, y los niveles de clorofila $a + b$ se determinaron espectrofotométricamente utilizando las ecuaciones descritas por Jeffrey y Humphrey (1975).

El contenido de cenizas en tejido de los haces de *Z. Marina* de las tres zonas de estudio se evaluó cada dos meses. Se deshidrataron aproximadamente 0.5 g de tejido de haces ($n = 5$) a 60°C hasta obtener peso constante en navecillas de aluminio previamente pesadas (~72 horas). Las muestras se incineraron en una mufla a 500°C por 4 h. La cantidad de ceniza obtenida por la diferencia entre el peso antes y después de la combustión fue expresada como porcentaje de peso seco de la muestra.

Los carbohidratos solubles se extrajeron de las hojas de *Z. marina* ($n = 6$) mediante la homogeneización de aproximadamente 0.1 g de tejido de la hoja no. 2 en un homogeneizador de vidrio y etanol al 90% (v/v). La muestra se centrifugó a $2000 \times g$ se separó el sobrenadante. El homogeneizado se extrajo dos veces más con etanol al 90% (v/v) a 80°C por 15 min y los sobrenadantes se mezclaron en un solo tubo. La extracción etanólica se evaporó a temperatura ambiente con una bomba de vacío y los azúcares se resuspendieron en 1 mL de agua destilada. La concentración de azúcar (sucrosa + glucosa + fructosa) se determinó espectrofotométricamente con antrona de acuerdo con la metodología descrita por Yemm y Willis (1954). La concentración de azúcares fue determinada utilizando glucosa como estándar. El almidón se extrajo de la fracción insoluble del homogeneizado añadiendo 1 mL de KOH 0.1 M e incubando por 12 h. La concentración de

located near the northern limit of distribution of *Z. marina* in Baja California, while the other two lagoons are located near the southern limit of distribution of this species along the peninsula and the southern limit of its distribution on the Pacific coast of the Northern Hemisphere. San Quintín has an approximate area of 42 km², Ojo de Liebre Lagoon of 430 km² and San Ignacio Lagoon of 230 km².

Water temperature in the *Z. marina* beds of all three coastal lagoons was monitored every 0.5 h throughout the study period using programmable underwater thermistors (Onset Computers, USA). The thermistors were calibrated in the laboratory against certified digital thermometers. At all three sites, photosynthetically active radiation (PAR) was monitored every 0.5 h using 4 π submarine radiometric sensors (LI-193SA, LI-COR, USA), and sensors were placed just above the canopy of the eelgrass beds. The accumulation of small quantities of bioincrustation was removed every two months; however, these deposits were not found to affect the irradiance measurements, as determined by the irradiance levels before and after the cleaning of the sensors. Daily irradiance levels above the *Z. marina* beds were integrated from sunrise to sundown and calculated as mol cuanta $m^{-2} d^{-1}$.

Biochemical characterization

Zostera marina shoots were collected manually at low tide approximately every two months at San Quintín Bay, and the Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons. The shoots without roots or rhizomes were collected at the intermediate depth of distribution of the meadow at each lagoon. They were placed in ice coolers with seawater at approximately 17°C and transported to the laboratory in Ensenada, Baja California. Chlorophyll, soluble carbohydrates and proteins were analyzed using fresh tissue 24–48 h after collection of the material. The rest of the samples were dried at 60°C, and the calories, ash and fiber in the shoots were analyzed later.

Shoot chlorophyll content was determined after acetone extraction. Approximately 0.1 g of tissue ($n = 6$) of leaf number 2 was crushed in a glass tissue homogenizer with 5 mL of 90% (v/v) acetone. The homogenate was centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min, and the chlorophyll $a + b$ content determined spectrophotometrically using the equations described by Jeffrey and Humphrey (1975).

Ash content in the tissue of *Z. marina* from the three sites was determined every two months. Approximately 0.5 g of shoot tissue ($n = 5$) was dried at 60°C in aluminum weighing boats until constant weight was obtained (~72 h). Samples were incinerated in a furnace oven at 500°C for 4 h. Ash content was determined by weight difference between the dried and incinerated samples and expressed as percent dry weight.

Soluble carbohydrates were extracted from the *Z. marina* leaves ($n = 6$) by crushing approximately 0.1 g of tissue of leaf number 2 in a glass homogenizer and 90% (v/v) ethanol. The extract was centrifuged at $2000 \times g$ and the supernatant was saved. The sample was extracted with 90% (v/v) ethanol twice

almidón (equivalentes de glucosa) fue determinada con antrona de acuerdo con la metodología previamente mencionada.

El contenido de fibra ácida (celulosa) y neutra (lignina) en el tejido de *Z. marina* de las zonas de estudio fue evaluado de acuerdo con Tejada-Hernández (1992). Se secaron las muestras de haces ($n = 6$) en un horno a 60°C hasta obtener peso constante y después se molieron en un molino de tejido de acero inoxidable. El contenido de fibra ácida en el tejido de los haces se obtuvo al reducir aproximadamente 0.25 g de muestra deshidratada en 25 mL de una solución 1 N de H₂SO₄, 50 mM de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB, por sus siglas en inglés) y una gota de agente antiespumante. La mezcla se hirvió con reflujo por 1 h y se filtró a través de un filtro Whatman GC de fibra de vidrio previamente incinerado a 530°C por 3 h y pesado. El filtrado se enjuagó dos veces con aproximadamente 50 mL de agua destilada hirviendo, y posteriormente con suficiente acetona para eliminar todos los pigmentos. El filtro con la muestra se deshidrató en horno a 105°C hasta obtener peso constante. El contenido de fibra ácida se calculó utilizando las ecuaciones propuestas por Tejada-Hernández (1992). El contenido de fibra neutra en el tejido de los haces se obtuvo al incubar aproximadamente 0.25 g de muestra deshidratada en 25 mL de una solución 100 mM de SDS, con 50 mM de EDTA, 100 mM de NaOH, 35 mM de Mg₂B₄O₇, 30 mM de Na₂HPO₄ al 1% (v/v) y una gota de agente antiespumante. La mezcla se hirvió con reflujo por 1 h y se filtró a través de un filtro Whatman GC de fibra de vidrio precombustionado a 530°C por 3 h y prepesado. El filtrado se enjuagó dos veces con aproximadamente 50 mL de agua destilada hirviendo y posteriormente con suficiente acetona para eliminar todos los pigmentos. El filtro conteniendo la muestra se deshidrató en horno a 105°C hasta obtener peso constante. El contenido de fibra ácida se calculó utilizando las ecuaciones propuestas por Tejada-Hernández (1992).

El contenido calórico de los haces se evaluó por medio de combustión total de acuerdo a Tejada-Hernández (1992). Se deshidrataron los haces de *Z. marina* ($n = 5$) a 60°C hasta obtener peso constante y se maceraron en un molino hasta obtener partículas de aproximadamente 2 o 3 mm. Las partículas fueron prensadas en un empastillador y colocadas en una bomba calorimétrica (Parr Instrument Co., EE.UU.) con 30 atm de oxígeno y 2000 ± 0.25 g de agua destilada. La temperatura de la bomba fue monitoreada cada 0.25 s con un termómetro digital acoplado a un sistema de adquisición de datos (DATAQ-190, EE.UU.). La bomba fue calibrada con pastillas de 1 g de ácido benzoico. Los residuos de la combustión fueron inicialmente titulados con una solución 0.0725 N de Na₂CO₃. Sin embargo, el contenido calórico de esta titulación representó menos del 0.5% del contenido calórico total de la muestra y fue omitido posteriormente.

Las proteínas totales e hidrosolubles fueron extraídas de aproximadamente 0.1 g de tejido de la hoja no. 2 ($n \geq 6$) con un homogeneizador de vidrio y una solución tampón que contenía 0.1 M de fosfato (pH 6.8), 2 mM de DTT, 5 mM de EDTA y 0.5 mM de AEBSEF. El homogenizado fue incubado por 30 min

more at 80°C for 15 min and the supernatants pooled. The ethanol extraction was evaporated at room temperature and under vacuum, and sugars resuspended in 1 mL of distilled water. The concentration of soluble sugars (sucrose + glucose + fructose) was determined spectrophotometrically with anthrone according to the method described by Yemm and Willis (1954). The concentration of sugars was determined using glucose as a standard. Starch was extracted from the insoluble fraction of the homogenate with 1 mL of 0.1 M KOH and incubating it for 12 h. The concentration of starch (glucose equivalents) was determined with anthrone as described above.

Acid detergent fiber (cellulose) and neutral detergent fiber (lignin) content in the tissue was determined at all three sites according to the method described by Tejada-Hernández (1992). Shoot tissue ($n = 6$) was dried at 60°C until constant weight was obtained and then crushed in a stainless steel tissue mill. The content of neutral detergent acid in the shoot tissue was obtained by reducing approximately 0.25 g of dried sample with 25 mL of 1 N H₂SO₄, 50 mM cetyltrimethyl ammonium bromide and one drop of antifoam agent. The solution was boiled for 1 h with reflux and then filtered through a preburned (530°C, 3 h) and preweighed GC fiberglass Whatman filter. The filtered sample was washed twice with approximately 50 mL boiling distilled water and then with acetone until all pigments were extracted. Filter and sample were dehydrated at 105°C until constant weight was obtained. The content of acid detergent fiber was calculated using the equations proposed by Tejada-Hernández (1992). Neutral detergent fiber content in the *Z. marina* shoots was determined by incubating approximately 0.25 g of dried sample with 25 mL of a solution containing 100 mM SDS, with 50 mM EDTA, 100 mM NaOH, 35 mM Mg₂B₄O₇, 30 mM Na₂HPO₄ at 1% (v/v) and a drop of antifoam agent. The solution was boiled with reflux for 1 h and then filtered through a preburned (530°C, 3 h) and preweighed GC fiberglass Whatman filter. The filtered sample was washed twice with approximately 50 mL boiling distilled water and then with acetone until all pigments were extracted. Filter and sample were dehydrated at 105°C until constant weight was obtained. The content of acid detergent fiber was calculated using the equations proposed by Tejada-Hernández (1992).

Caloric content in the *Z. marina* shoots was determined through combustion according to Tejada-Hernández (1992). The shoots ($n = 5$) were dehydrated at 60°C until constant weight was obtained and then crushed in a stainless steel tissue mill until particles 2–3 mm in length were obtained. Approximately 0.5 g of crushed sample were compressed with a pellet press and loaded inside a calorimetric bomb (Parr Instrument Co., USA) with 30 atm of oxygen and 2000 ± 0.25 g distilled water. The temperature of the calorimetric bomb was monitored every 0.25 s with a calibrated digital thermometer coupled to a data logger (DATAQ-190, USA). The bomb was calibrated with benzoic acid. Combustion residues were titrated with a 0.0725 N Na₂CO₃ solution; however, the caloric

a 4°C y las proteínas totales fueron evaluadas espectrofotométricamente de acuerdo con Bradford (1976) usando suero de albúmina bovina como estándar. El homogeneizado fue posteriormente centrifugado a $10,000 \times G$ por 15 min a temperatura ambiente y las proteínas hidrosolubles fueron evaluadas en el sobrenadante utilizando la metodología descrita anteriormente.

Análisis estadístico

Se evaluaron las diferencias temporales y espaciales en la concentración de clorofila, ceniza, carbohidratos, fibra, contenido calórico y proteínas en las hojas de *Z. marina* mediante un análisis de varianza de dos vías (sitio \times tiempo) después de probar normalidad y homoscedasticidad en los datos (Sokal y Rohlf, 1981). Los datos que no se ajustaron a los criterios de normalidad y homoscedasticidad fueron transformados con una función log. Todas las comparaciones múltiples fueron realizadas con pruebas Tukey estableciendo el nivel de significancia en $P < 0.05$.

Resultados

La temperatura media diaria del agua varió a lo largo del año en las tres lagunas (fig. 2). Las mayores temperaturas

content of these samples was less than 0.5% of the total caloric content of the sample and was later omitted.

Total and soluble proteins were extracted from approximately 0.1 g of tissue sample from leaf number 2 ($n \geq 6$) with a glass tissue homogenizer and a buffer solution containing 0.1 M NaH_2PO_4 (pH 6.8), 2 mM DTT, 5 mM EDTA and 0.5 mM AEBSF. The homogenate was incubated for 30 min at 4°C and total proteins were determined spectrophotometrically according to Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard. Soluble proteins were as described previously after centrifuging the homogenate at $10,000 G$ for 15 min at room temperature.

Statistical analysis

Temporal and spatial differences in the levels of chlorophyll, ash, carbohydrates, caloric content and proteins in the leaves of *Z. marina* were determined by a two-way analysis of variance (site \times time) after testing for normality and homoscedasticity of the data (Sokal and Rohlf, 1981). The data that did not meet normality and homoscedasticity were transformed using a log function. All multiple comparisons were conducted using a Tukey test with a significance level of $P < 0.05$.

Results

The mean daily water temperature varied throughout the year at the three coastal lagoons (fig. 2). The highest summer temperatures were 22°C at San Quintín, 25°C at Ojo de Liebre Lagoon and 27°C at San Ignacio Lagoon. The lowest winter temperatures were 15°C at San Quintín and 16°C at the two southern lagoons. Daily integrated *in situ* irradiance in the south of the peninsula was twice as high as in the north and these values presented a classic sinusoidal pattern; however, *in situ* irradiance at San Quintín did not vary significantly throughout the year (fig. 2). Maximum incident irradiance values for the north ($15 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) and south ($35 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ d}^{-1}$) of the peninsula were recorded in March. At the three sites, maximum irradiances occurred approximately three to four months before the highest temperatures.

The chlorophyll levels in *Z. marina* leaves from the two southern lagoons were statistically similar ($P > 0.05$) throughout the year, except in April 1999, and approximately two times lower than in San Quintín (table 1, fig. 3). The concentration of chlorophyll *a + b* in the leaves presented statistical differences ($P < 0.05$) in terms of the season, study site, and interaction between time and site (table 1). At the three coastal

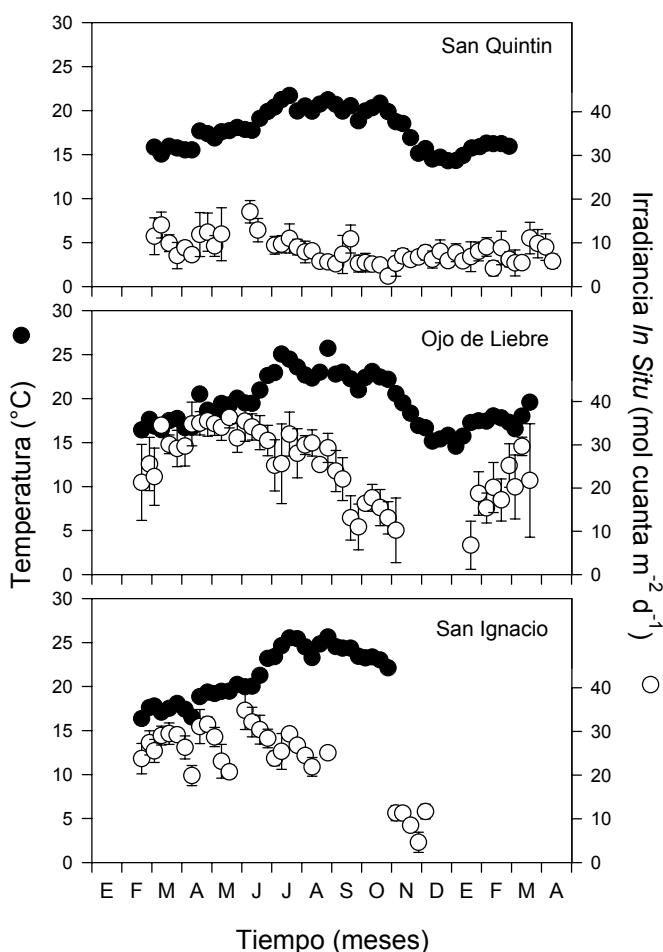


Figura 2. Variación estacional de la temperatura superficial media diaria (●) y la integración diaria de irradiancia *in situ* (○) en San Quintín, Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio de enero de 1999 a abril del 2000.

Figure 2. Seasonal variation of the daily mean surface temperature (●) and integrated daily *in situ* irradiance (○) at San Quintín, Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons from January 1999 to April 2000.

observadas durante el verano fueron de 22°C, 25°C y 27°C en SQ, OL y SI, respectivamente. Las menores temperaturas observadas durante el invierno fueron de 15°C en el norte y de 16°C en las lagunas del sur. En general, la irradiancia *in situ* integrada diariamente fue dos veces mayor en las lagunas del sur de la península que en la laguna del norte. Los valores de irradiancia *in situ* integrada diaria presentó un clásico patrón sinusoidal en OL y SI; sin embargo, en la laguna costera del norte la irradiancia *in situ* no varió significativamente a lo largo del año (fig. 2). Los valores máximos de irradiancia incidente para el norte (15 mol cuanta m⁻² d⁻¹) y el sur (35 mol cuanta m⁻² d⁻¹) de Baja California se registraron en marzo. En las tres lagunas, las irradiancias máximas se presentaron aproximadamente tres a cuatro meses antes que las mayores temperaturas en el campo.

En las lagunas costeras del sur los niveles de clorofila en las hojas de *Z. marina* fueron estadísticamente similares ($P > 0.05$) a lo largo del año, excepto en abril de 1999, y fueron aproximadamente dos veces más bajos que en los pastos de la laguna del norte de la península (tabla 1, fig. 3). La concentración de clorofila *a + b* en las hojas de *Z. marina* mostraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en función de la época del año, el sitio de estudio y la interacción entre tiempo y sitio de estudio (tabla 1). En los tres sitios de estudio, los máximos niveles de clorofila fueron observados durante verano, y los mínimos durante primavera e invierno.

Los niveles de azúcar en las hojas de *Z. marina* durante el invierno fueron similares en las tres lagunas; sin embargo, en el verano los niveles de carbohidratos fueron aproximadamente el doble ($P < 0.05$) para los pastos de SQ con respecto a los pastos de las lagunas del sur (fig. 4). A diferencia del azúcar, los niveles de almidón en los pastos de SQ a lo largo del año fueron dos veces más altos que los de los pastos del sur de la

lagoons, the maximum levels of chlorophyll were recorded in summer and the minimum in spring and winter.

The winter sugar levels in the *Z. marina* leaves were similar at the three sites; however, in summer the levels of carbohydrates in the seagrass from San Quintín were approximately double those from the two southern lagoons (fig. 4). Unlike sugar, the levels of starch in the San Quintín seagrass were twice as high as those from the south throughout the year. The levels of sugar in the *Z. marina* shoots were approximately five times higher than those of starch. The concentration of sugar and starch in the leaves showed statistical differences ($P < 0.05$) for the season, study site, and interaction between time and site (table 1).

The concentration of soluble and total proteins in the *Z. marina* leaves showed significant differences ($P < 0.05$) for the season, study site, and interaction between time and site (fig. 5, table 1). The levels of soluble proteins were similar in all three coastal lagoons throughout most of the year (~7 mg gDW⁻¹); however, the concentration of proteins increased two-fold in winter 1999 and spring 2000. The levels of total proteins in the leaves presented different patterns for the three study sites: at

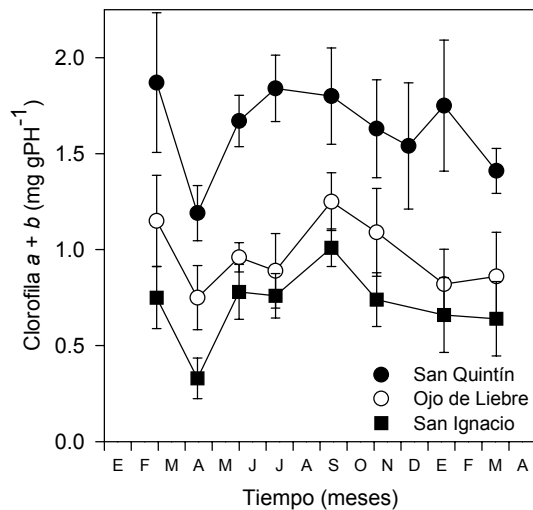


Figura 3. Niveles de clorofila ($\bar{x} \pm DE$, $n = 6$) en las hojas de *Zostera marina* de San Quintín, Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio.

Figure 3. Chlorophyll levels ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$) in the shoots of *Zostera marina* from San Quintín, Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons.

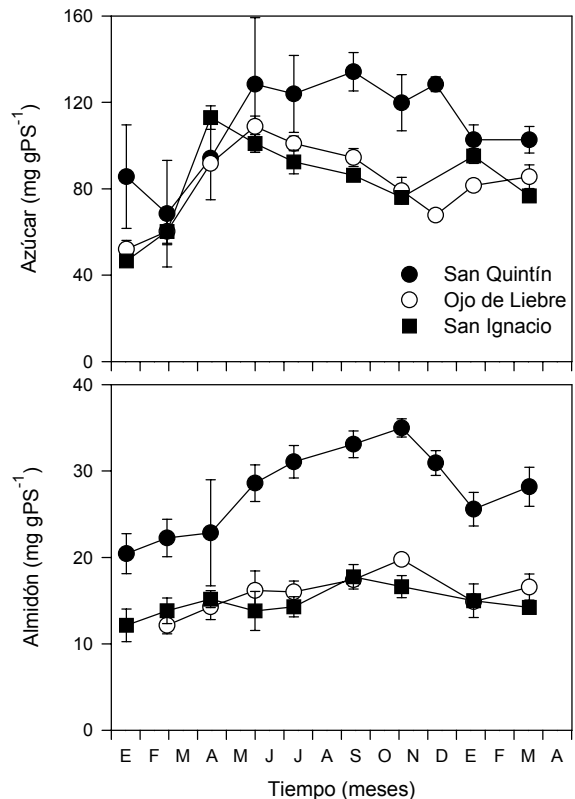


Figura 4. Variación estacional de los niveles de azúcar (sucrosa + glucosa + fructosa, $\bar{x} \pm DE$, $n = 6$) y almidón ($\bar{x} \pm DE$, $n = 6$) en las hojas de *Zostera marina* de San Quintín, Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio. Las barras de error no dibujadas son menores que los símbolos.

Figure 4. Seasonal fluctuation of the concentration of sugar (sucrose + glucose + fructose, $\bar{x} \pm SD$, $n = 6$) and starch ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$) in the leaves of *Zostera marina* from San Quintín, Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons. Error bars not shown are smaller than the symbol size.

Tabla 1. Resultados del análisis de varianza de dos vías para evaluar el efecto del tiempo y el sitio de estudio sobre la concentración de clorofila, azúcar, almidón, proteínas solubles, proteínas totales, fibra neutra, fibra ácida, ceniza y calorías en los haces de *Zostera marina*.**Table 1.** Results of the two-way analysis of variance to evaluate the effect of time and study site on the concentration of chlorophyll, sugar, starch, soluble proteins, total proteins, neutral fiber, acid fiber, ash and calories in the shoots of *Zostera marina*.

Variable dependiente	Variable independiente	g.l.	CP	F	P	Significancia
Clorofila (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	7	0.53	13.7	<0.001	***
	Sitio	2	10.43	269.8	<0.001	***
	Tiempo × sitio	14	0.17	4.4	<0.001	***
	Residual	114	0.03			
Azúcar (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	8	9,434	54.9	<0.001	***
	Sitio	2	5,023	29.3	<0.001	***
	Tiempo × sitio	16	1,195	6.9	<0.001	***
	Residual	135	171			
Almidón (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	7	123	31.3	<0.001	***
	Sitio	2	2,760	700.3	<0.001	***
	Tiempo × sitio	14	27	6.9	<0.001	***
	Residual	120	4			
Proteínas solubles (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	7	358	171.5	<0.001	***
	Sitio	2	45	20.8	<0.001	***
	Tiempo × sitio	14	47	22.9	<0.001	***
	Residual	120	2			
Proteínas totales (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	7	3,172	13.1	<0.001	***
	Sitio	2	13,262	54.9	<0.001	***
	Tiempo × sitio	14	1,217	5.1	<0.001	***
	Residual	120	241			
Fibra neutra (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	7	58,240	23.1	<0.001	***
	Sitio	2	3,286	1.3	0.277	ns
	Tiempo × sitio	14	12,589	4.9	<0.001	***
	Residual	91	2,523			
Fibra ácida (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	6	14,550	49.4	<0.001	***
	Sitio	2	1,301	4.4	0.016	*
	Tiempo × sitio	12	6,359	21.6	<0.001	***
	Residual	70	294			
Ceniza (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	6	27,155	12.4	<0.001	***
	Sitio	2	6,880	3.2	0.046	*
	Tiempo × sitio	12	25,782	11.8	<0.001	***
	Residual	137	2,181			
Calorías (mg gPS ⁻¹)	Tiempo	7	0.69	65.8	<0.001	***
	Sitio	2	0.44	41.6	<0.001	***
	Tiempo × sitio	14	0.11	10.1	<0.001	***
	Residual	85	0.01			

península. En general, los niveles de azúcar en los haces de *Z. marina* fueron aproximadamente cinco veces mayores que los niveles de almidón. La concentración de azúcar y almidón en las hojas de *Z. marina* mostraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en función de la época del año, el sitio de estudio, y la interacción entre el tiempo y el sitio de estudio (tabla 1).

La concentración de proteínas solubles y totales en las hojas de *Z. marina* mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$) en función de la época del año, el sitio de estudio, y la interacción entre tiempo y sitio de estudio (fig. 5, tabla 1). Los niveles de proteínas solubles fueron similares en los pastos

San Quintín, the maximum values occurred in summer and decreased towards winter; at Ojo de Liebre, the levels increased from the beginning of 1999 until spring 2000; and at San Ignacio, no clear pattern was found.

The concentrations of neutral fiber and acid fiber were 400 and 350 mg gDW⁻¹, respectively, throughout the year for the three coastal lagoons, except in June and July, when the values increased by approximately 30% (fig. 6). The levels of neutral fiber in the *Z. marina* leaves presented statistical differences ($P < 0.05$) for the season and the interaction between time and site, but not for the study site, whereas the levels of acid fiber

de las tres lagunas durante casi todo el año (aprox. 7 mg gPS⁻¹); sin embargo, la concentración de proteínas aumentó a aproximadamente el doble durante el invierno de 1999 y la primavera de 2000. Los niveles de proteínas totales en las hojas de *Z. marina* mostraron patrones diferentes en los tres sitios de estudio. En SQ los máximos valores se observaron en el verano y disminuyeron hacia el invierno, mientras que en OL los niveles aumentaron desde principios de 1999 hasta la primavera de 2000. En SI los niveles de proteínas totales en los haces no mostraron un patrón claro.

Las concentraciones de fibra neutra y fibra ácida fueron de 400 y 350 mg gPS⁻¹, respectivamente, a lo largo del año para los pastos de las tres lagunas, excepto durante junio y julio, cuando los valores aumentaron en aproximadamente 30% (fig. 6). Los niveles de fibra neutra en las hojas de *Z. marina* mostraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en función de la época del año, y de la interacción entre tiempo y sitio de estudio, pero no con relación al sitio de estudio, mientras que los niveles de fibra ácida mostraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en función de la época del año, el sitio de estudio y la interacción entre tiempo y sitio de estudio (tabla 1). En las

showed statistical differences ($P < 0.05$) for all three (table 1). At the three sites the levels of acid fiber represented approximately 75% of the neutral fiber in the shoots.

Ash content in the *Z. marina* shoots from the three coastal lagoons decreased from winter (400 mg gDW⁻¹) to spring and summer (200 mg gDW⁻¹) (fig. 7). A general 10% decrease in ash content was also observed at all three sites. On the other hand, the caloric content of the shoots increased from approximately 2.5 kcal gDW⁻¹ in January 1999 to approximately 3 kcal gDW⁻¹ in March 2000. Contrary to the decrease in ash content, a general increase in the caloric content of the leaves was observed at all three lagoons. The concentrations of ash and calories in the shoots presented statistical differences ($P < 0.05$) for the season, study site, and interaction between time and site (table 1).

The composition of neutral fiber, total proteins, carbohydrates (sugar + starch) and ash was similar in the seagrass from the three coastal lagoons throughout the year (fig. 8). In general, these compounds represented 100% of the metabolic composition of the shoots in late spring and early summer, decreasing towards winter. The levels of chlorophyll

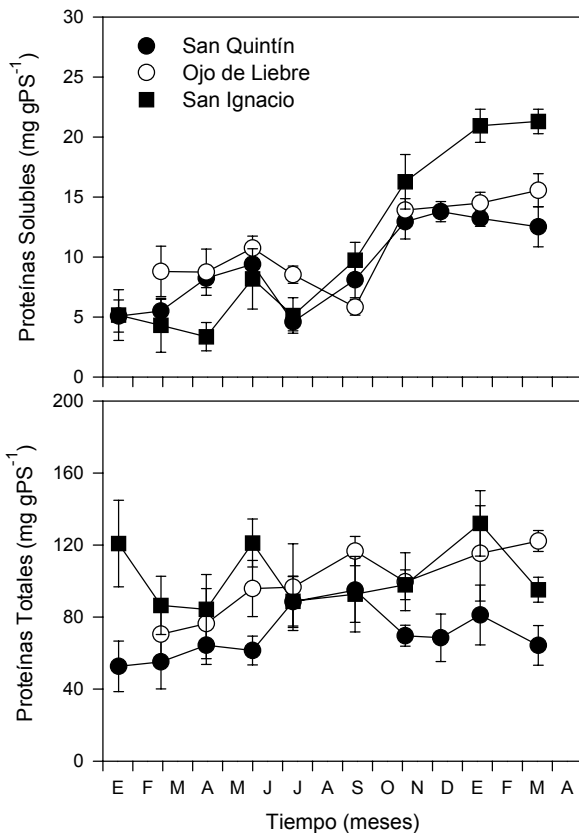


Figura 5. Niveles de proteínas solubles y totales ($\bar{x} \pm DE$, $n = 6$) en las hojas de *Zostera marina* de San Quintín, Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio a lo largo del periodo de estudio. Las barras de error no dibujadas son menores que los símbolos.

Figure 5. Concentration of soluble and total proteins ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$) in the shoots of *Zostera marina* from San Quintín, Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons throughout the study period. Error bars not shown are smaller than the symbol size.

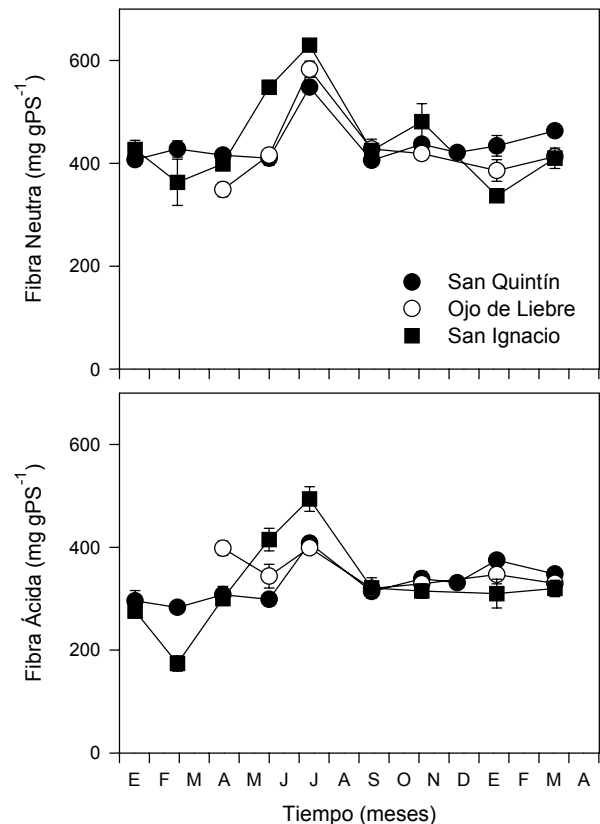


Figura 6. Variación estacional de fibra neutra y ácida ($\bar{x} \pm DE$, $n = 6$) en las hojas de *Zostera marina* de San Quintín, Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio a lo largo del periodo de estudio. Las barras de error no dibujadas son menores que los símbolos.

Figure 6. Seasonal fluctuation of neutral and acid detergent fiber ($\bar{x} \pm SD$, $n = 6$) in the shoots of *Zostera marina* from San Quintín, Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons throughout the study period. Error bars not shown are smaller than the symbol size.

tres lagunas los niveles de fibra ácida representaron aproximadamente el 75% de los la fibra neutra en los haces de *Z. marina*.

En las tres lagunas el contenido de ceniza en los haces de *Z. marina* disminuyó de invierno (400 mg gPS⁻¹) a primavera y verano (200 mg gPS⁻¹) (fig. 7). Se observó además una disminución general del 10% del contenido de ceniza en los pastos de las tres lagunas estudiadas. Por otro lado, el contenido calórico de los haces de *Z. marina* se incrementó de aproximadamente 2.5 kcal gPS⁻¹ en enero de 1999 a aproximadamente 3 kcal gPS⁻¹ en marzo de 2000. Contrario a la disminución de los niveles de ceniza, se observó un incremento general del contenido calórico de las hojas de *Z. marina* de los tres sitios estudiados. La concentración de ceniza y calorías en los haces de *Z. marina* mostraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en función de la época del año, el sitio de estudio y la interacción entre tiempo y sitio de estudio (tabla 1).

Las composiciones de fibra neutra, proteínas totales, carbohidratos (azúcar + almidón) y ceniza mostraron un comportamiento similar en los pastos de las tres lagunas a lo largo del año (fig. 8). En general, estos compuestos representaron el

represented less than 1% of the organic matter content in the *Z. marina* leaves.

Discussion

The Baja California Peninsula has both tropical and temperate regions; consequently, the organisms that occur there are exposed to a wide range of irradiance and temperature. The results of this study reveal that the *Z. marina* found in the southern lagoons of Ojo de Liebre and San Ignacio is exposed to mean temperatures 5–6°C higher and irradiances two-fold greater than that from San Quintín throughout the year. Even though the levels of the organic components are similar to those reported for other populations (Dawes and Lawrence, 1979; Brand-Gardner *et al.*, 1999), there are differences in the concentration of chlorophyll, sugar, starch, proteins and other metabolites in the *Z. marina* shoots from the north and south of the peninsula. These differences probably affect the metabolism of the herbivores that inhabit the diverse coastal lagoons of Baja California.

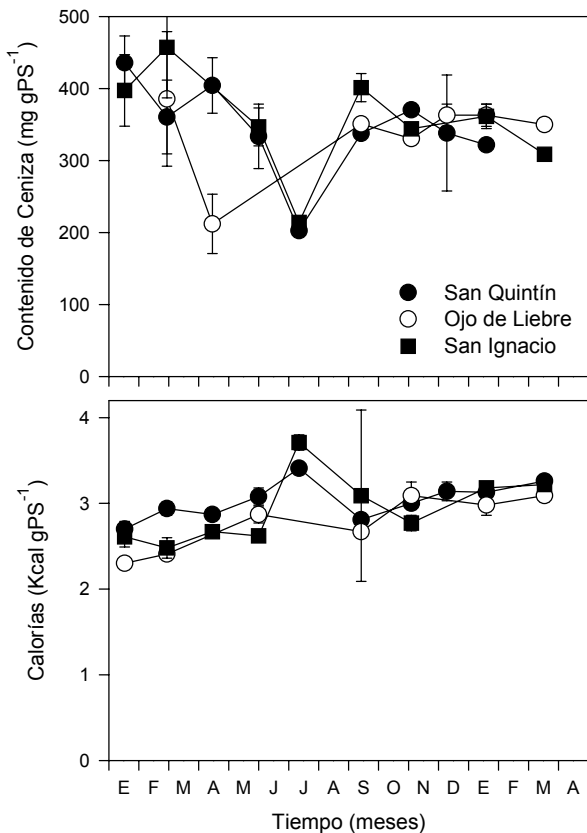


Figura 7. Niveles de ceniza ($\bar{x} \pm DE$, $n = 5$) y calorías ($\bar{x} \pm DE$, $n = 5$) en las hojas de *Zostera marina* de San Quintín, Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio a lo largo del periodo de estudio. Las barras de error no dibujadas son menores que los símbolos.

Figure 7. Concentration of ash ($\bar{x} \pm SD$, $n = 5$) and calories ($\bar{x} \pm SD$, $n = 5$) in the shoots of *Zostera marina* from San Quintín, Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons throughout the study period. Error bars not shown are smaller than the symbol size.

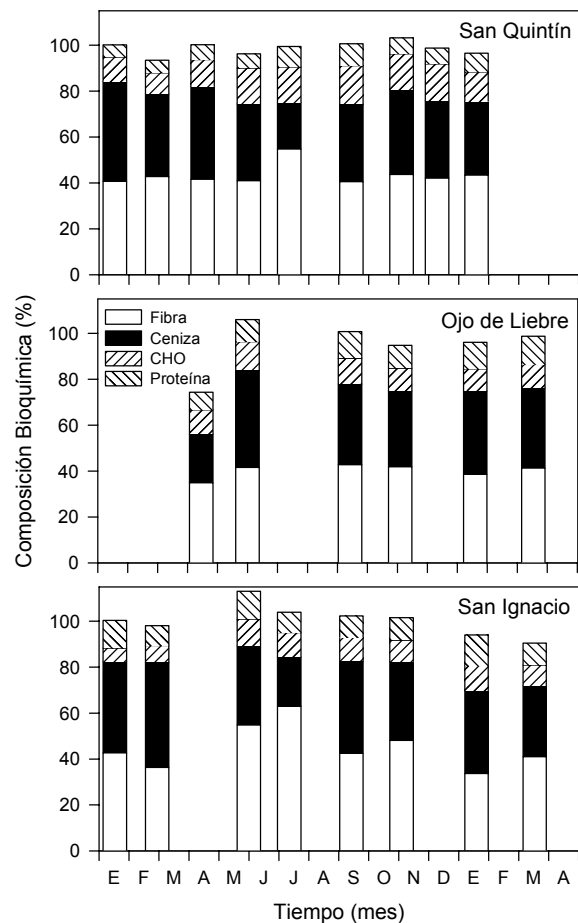


Figura 8. Concentración de los componentes bioquímicos mayores de las hojas de *Zostera marina* de San Quintín, Laguna Ojo de Liebre y Laguna San Ignacio a lo largo del periodo de estudio.

Figure 8. Biochemical composition of the shoots of *Zostera marina* from San Quintín, Ojo de Liebre and San Ignacio lagoons throughout the study period.

100% de la composición metabólica de los haces a finales de la primavera y principios del verano, disminuyendo hacia el invierno. Los niveles de clorofila representaron menos del 1% del contenido de materia orgánica en las hojas de *Z. marina*.

Discusión

Baja California abarca regiones tropicales y templadas, consecuentemente, existe una gran variación en los niveles de irradiancia y temperatura a los que están expuestos los organismos distribuidos a lo largo de esta península. Los resultados de este estudio revelan que, a lo largo del año, los pastos que habitan las lagunas del sur de la península están expuestos a temperaturas medias de 5–6°C más altas e irradiancias dos veces mayores que los pastos del norte de Baja California. No obstante que los niveles de constituyentes orgánicos son similares a los reportados previamente para otras poblaciones (Dawes y Lawrence, 1979; Brand-Gardner *et al.*, 1999), existen diferencias en los niveles de clorofila, azúcar, almidón, proteínas y otros metabolitos entre los haces del pasto marino *Z. marina* del norte y los del sur. En consecuencia, estas diferencias posiblemente impacten el metabolismo de los herbívoros que habitan las diferentes lagunas costeras de Baja California.

Los niveles de clorofila en el tejido de vegetales marinos responden a fluctuaciones estacionales de irradiancia en el campo (Mazzella y Alberte, 1986; Lindqvist y Lignell, 1997; Cabello-Pasini *et al.*, 2002). Generalmente, los niveles de clorofila *a* y pigmentos accesorios aumentan en épocas del año con irradiancias o fotoperíodos menores (Lewey y Gorham, 1984). De igual manera, los niveles de pigmentos son generalmente más elevados en *Z. marina* de zonas con menores niveles de irradiancia (Zimmerman *et al.*, 1995). En la laguna del norte de la península (SQ), los haces de *Z. marina* probablemente responden a las bajas irradiancias *in situ* aumentando la concentración de clorofilas con respecto a los pastos de las lagunas del sur. De hecho, los pastos de las lagunas del sur de Baja California se encuentran establecidos a aproximadamente 1 m más de profundidad que los pastos del norte. Cabello-Pasini *et al.* (2003) han especulado que la colonización de zonas más profundas por *Z. marina* en las lagunas del sur es el resultado de una mayor disponibilidad de luz en la columna de agua con respecto a la laguna del norte. Los niveles mayores de pigmentos en las hojas de los pastos en la laguna del norte probablemente sean también el resultado de la mayor disponibilidad de nutrientes en la región norte con respecto a la región sur de la península.

No obstante que los niveles de irradiancia son menores en SQ con respecto a las lagunas del sur, se observó una mayor acumulación de carbohidratos durante el verano en los pastos de SQ. Por otro lado, las características fotosintéticas de *Z. marina* resultaron ser similares en las tres lagunas a lo largo de un ciclo anual (Cabello-Pasini *et al.*, 2003). Lo anterior sugiere que los niveles elevados de pigmentos en los pastos de la laguna del norte están compensando los bajos niveles de

Chlorophyll content in the tissue of marine plants responds to seasonal fluctuations of irradiance in the field (Mazzella and Alberte, 1986; Lindqvist and Lignell, 1997; Cabello-Pasini *et al.*, 2002). The levels of chlorophyll *a* and accessory pigments increase at the time of year when irradiances are lower and photoperiods shorter (Lewey and Gorham, 1984). Likewise, the levels of pigments are generally higher in *Z. marina* from areas of lower irradiance (Zimmerman *et al.*, 1995). At San Quintín, *Z. marina* shoots probably respond to the low *in situ* irradiance by increasing the concentration of chlorophyll, in relation to those from the southern lagoons. In fact, the southern seagrasses are found approximately 1 m deeper than those from the north. Cabello-Pasini *et al.* (2003) have speculated that colonization of deeper zones by *Z. marina* in the southern lagoons is the result of greater availability of light in the water column relative to San Quintín. The higher pigment concentrations in the seagrass leaves from San Quintín are also probably the result of greater availability of nutrients in the northern region relative to the southern region of the peninsula.

Even though the levels of irradiance are lower at San Quintín than at San Ignacio and Ojo de Liebre lagoons, the northern seagrass was found to have greater accumulation of carbohydrates during the summer. On the other hand, the photosynthetic characteristics of *Z. marina* were similar at the three coastal lagoons throughout the year (Cabello-Pasini *et al.*, 2003). This suggests that the high levels of pigments in the San Quintín eelgrass compensate the low levels of irradiance that the plants are exposed to in the north relative to the south of the peninsula. On the other hand, the decrease in the concentration of sugar in *Z. marina* shoots from the south is consistent with the decrease in irradiance in this area. This decrease of *in situ* irradiance is probably associated with increased turbidity resulting from high wind speeds during summer. It has been shown that an increase in turbidity in the water column can be responsible for the reduced sugar levels in the leaves of *Z. marina*, especially in subtidal populations (Cabello-Pasini *et al.*, 2002). The higher concentration of pigments and the higher position in the mesolittoral likely enables the San Quintín eelgrass to maintain the high rates of photosynthesis and sugar production.

During the study period, the reason for the annual increasing trend in the content of proteins and carbohydrates (sugar + starch + fiber) was not evident. However, sampling began at the end of an El Niño event that was characterized by anomalies of up to 4°C in surface temperature, whereas 1999 and 2000 were characterized by an anomaly of approximately –1°C in surface water temperature as a result of a strong La Niña (Ladah *et al.*, 1999; Durazo-Arvizu *et al.*, 2001). In fact, the water temperature at the three coastal lagoons presented a general decrease of 1°C throughout this study. As in other parts of the world, the abundance of marine vegetation in Baja California decreases as a result of an increase in temperature and of a decrease in nutrients during El Niño events (Gerard, 1984; Ladah *et al.*, 1999). The physiology of these plants is

irradiancia a las que estos pastos están expuestos, con respecto a los pastos del sur. Por otro lado, la disminución en los niveles de azúcar en los haces de *Z. marina* del sur de la península es consistente con la disminución de la irradiancia *in situ* en esta zona. Esta disminución en la irradiancia *in situ* probablemente está asociada con el incremento de la turbidez debido al aumento de la velocidad del viento durante el verano. Se ha demostrado que un aumento en la turbidez de la columna de agua puede ser responsable de la reducción de los niveles de azúcar en las hojas de *Z. marina*, especialmente en poblaciones submareales (Cabello-Pasini *et al.*, 2002). Es probable que la mayor concentración de pigmentos y la posición más alta en el mesolitoral de los pastos en la laguna del norte sean suficientes para mantener altas tasas fotosintéticas y altas tasas de producción de azúcares.

Durante el periodo de estudio no fue clara la razón de la tendencia anual del aumento del contenido de proteínas y carbohidratos (azúcar + almidón + fibra). Sin embargo, el inicio de la serie de muestreo se caracterizó por ser el final de un evento de El Niño caracterizado por anomalías de hasta 4°C en la temperatura superficial, mientras que 1999 y 2000 se caracterizaron por presentar una anomalía de la temperatura superficial del agua de aproximadamente -1°C, como resultado de un fuerte año La Niña (Ladah *et al.*, 1999; Durazo-Arvizu *et al.*, 2001). De hecho a lo largo de este estudio, la temperatura del agua en las tres lagunas presentó una disminución general de 1°C. Como en otros lugares del mundo, la abundancia de vegetales marinos en Baja California disminuye como consecuencia del incremento de la temperatura y de la disminución de los nutrientes durante fenómenos El Niño (Gerard, 1984; Ladah *et al.*, 1999). De igual manera, la fisiología de estos vegetales se ve afectada como resultado de las anomalías térmicas. El contenido de nitrógeno y proteínas en el tejido de la Phaeophyta *Macrocystis pyrifera*, por ejemplo, disminuyó al incrementarse la temperatura durante El Niño de 1983/84 (Gerard, 1984). Es probable que los bajos niveles de proteínas y carbohidratos en las hojas de *Z. marina* al inicio del estudio hayan sido el resultado de la anomalía térmica sobre la fisiología del pasto y/o de la disminución en la disponibilidad de nutrientes provocadas por El Niño.

El incremento en los niveles de calorías en los pastos de las tres lagunas a lo largo del año es atribuible al aumento durante el mismo periodo de los niveles de proteínas y carbohidratos, y la disminución en el contenido de ceniza en el tejido. Los contenidos calóricos de proteínas y carbohidratos de vegetales son de 5.73 y 4.18 kcal g⁻¹, respectivamente. A lo largo del año se observó un aumento de 30.88 ± 12.02 mg gPS⁻¹ en el nivel de proteínas totales en los haces de *Z. marina* de las tres lagunas estudiadas, representando un incremento de 0.18 kcal gPS⁻¹. De manera similar, el aumento de 40.71 ± 0.15 mg gPS⁻¹ en los niveles de carbohidratos (azúcar + almidón + fibra) representa un incremento de 0.17 kcal gPS⁻¹. De manera conjunta, el incremento de proteínas y carbohidratos representó un aumento de 0.35 kcal gPS⁻¹. Lo anterior sugiere que el aumento de los niveles de carbohidratos y proteínas a lo largo

also affected by thermal anomalies. For example, the content of nitrogen and proteins in the tissue of *Macrocystis pyrifera* decreased as the temperature increased during the 1983/84 El Niño (Gerard, 1984). The low levels of proteins and carbohydrates in the *Z. marina* leaves at the beginning of this study were probably due to the effect of the thermal anomaly on the physiology of the eelgrass or to the decrease in the availability of nutrients caused by the El Niño event.

The increase in the concentration of calories in *Z. marina* from the three lagoons throughout the year is due to an increase in the protein and carbohydrate levels during the same period, and to a decrease in the tissue's ash content. The caloric contents of proteins and carbohydrates in plants are 5.73 and 4.18 kcal g⁻¹, respectively. An increase was observed throughout the year of 30.88 ± 12.02 mg gDW⁻¹ in the level of total proteins in *Z. marina* shoots from all three study sites, representing an increase of 0.18 kcal gDW⁻¹. Likewise, the increase of 40.71 ± 0.15 mg gDW⁻¹ in the levels of carbohydrates (sugar + starch + fiber) represents an increase of 0.17 kcal gDW⁻¹. Overall, the increase in proteins and carbohydrates represented an increase of 0.35 kcal gDW⁻¹. This suggests that the increase in the levels of carbohydrates and proteins throughout the year is responsible for the ~53% increase of the caloric content in *Z. marina* tissue. The rest of the caloric content in the leaves must be explained by changes in the levels of lipids, pigments, organic acids, etc. Even though lipids have a higher caloric content than carbohydrates and proteins (Gnaiger, 1983), lipid content in the leaves of seagrasses and other marine macrophytes is low and ranges from < 1% to 2% dry weight (Dawes and Lawrence, 1979; Westermeir and Gomez, 1996). Hence, lipids and pigments could be responsible for a change of ~15% in caloric content.

The content of fiber, carbohydrates (sugar + starch), protein and ash represents more than 95% of the biochemical composition of the tissue of *Z. marina* leaves throughout the year; however, in leaves of *Thalassia testudinum*, these same components represent only 50% of the tissue dry weight. The pigment levels in the leaves of *Z. marina* are responsible for less than 0.8% of the dry weight. This suggests that fiber, carbohydrates (sugar + starch), protein and ash are the most abundant components in the tissue of *Z. marina*.

Several marine herbivores depend on the quality, quantity and availability of plants to meet their caloric requirements. Any change in these parameters could affect the organism's ability to survive and reproduce. For example, the brant goose population in Europe (*B. b. bernicla*) and Eastern North America (*B. b. horta*) suffered dramatic declines in population directly through starvation and indirectly through reduced breeding and recruitment after the wasting disease caused a major die-off of eelgrass in the North Atlantic during the early 1930s (Reed *et al.*, 1988). Likewise, the same herbivores may also influence the dynamics of seagrass and possibly the biochemical composition of the eelgrass tissue as has been shown in terrestrial plant-herbivore systems (McNaughton, 1979). This paper reveals differences in the content of proteins,

del año es responsable del incremento de aproximadamente 53% del contenido calórico del tejido de *Z. marina*. El resto del contenido calórico en las hojas de los pastos debe ser explicado por cambios en los niveles de lípidos, pigmentos, ácidos orgánicos, etc. Aunque los lípidos tienen un contenido calórico más alto que los carbohidratos y proteínas (Gnaiger, 1983), el contenido de lípidos en las hojas de pastos marinos y otros macrofitos marinos es bajo y varía desde < 1% hasta 2% del peso seco (Dawes y Lawrence, 1979; Westermeir y Gomez, 1996). Por lo anterior, los lípidos y pigmentos podrían ser tan sólo responsables de un cambio de aproximadamente 15% del contenido calórico.

El contenido de fibra, carbohidratos (azúcar + almidón), proteína y ceniza son responsables de más del 95% de la composición bioquímica del tejido de las hojas de *Z. marina* a lo largo del año. Esto es inconsistente con lo observado en las hojas de *Thalassia testudinum* en las que estos mismos componentes representan sólo el 50% del peso seco del tejido. Por otro lado, los niveles de pigmentos en las hojas de *Z. marina* son responsables de menos del 0.8% del peso seco. Lo anterior sugiere que fibra, carbohidratos (azúcar + almidón), proteína y ceniza son los componentes más abundantes del tejido de *Z. marina*.

Una serie de herbívoros marinos dependen de la calidad, cantidad y disponibilidad de plantas para satisfacer sus requerimientos calóricos. Cualquier cambio en estos parámetros podría afectar la capacidad de sobrevivencia y reproducción de los organismos. Por ejemplo, tanto la población de brantas de Europa (*B. b. bernicla*) con la del este de Norteamérica (*B. b. horta*) disminuyeron drásticamente, directamente por inanición e indirectamente por la reducción del éxito reproductivo y del reclutamiento después de que la enfermedad conocida como *wasting* causara el abatimiento de los mantos de *Z. marina* en el Atlántico Norte a principios de los años treinta (Reed *et al.*, 1988). Igualmente, los mismos herbívoros pueden influenciar la dinámica de los pastos marinos y posiblemente la composición bioquímica del tejido de *Z. marina* como se ha demostrado en herbivoría de sistemas terrestres (McNaughton, 1979). Este estudio revela diferencias en los contenidos de proteínas, carbohidratos solubles e insolubles y ceniza en las hojas del pasto marino *Z. marina* a lo largo del año en las diferentes lagunas de Baja California; sin embargo, se desconoce si las variaciones en la concentración de estos metabolitos afectan la fisiología de los herbívoros que habitan en ellas.

Agradecimientos

Agradecemos a Eduardo Carrera, Richard y Dorothy Wheeler, Kuyimá, Danielle Mather, Adrian Gall, Dan Rizoli, Fernando Heredia, Edmundo Elorduy, Edgar Arroyo y Adrián López por su ayuda en el campo. Este estudio fue apoyado con fondos de Ducks Unlimited de México (DUMAC), Exportadora de Sal, S.A. (ESSA), CONACYT (I26655), Universidad Autónoma de Baja California (4023, 4078-13), U.S. Fish and

soluble and insoluble carbohydrates, and ash in the leaves of the eelgrass *Z. marina* throughout the year in different coastal lagoons of the Baja California Peninsula; however, it is not known whether variations in the concentration of these metabolites are affected by the physiology of the herbivores that live there.

Acknowledgements

We thank Eduardo Carrera, Richard and Dorothy Wheeler, Kuyimá, Danielle Mather, Adrian Gall, Dan Rizoli, Fernando Heredia-Urbe, Edmundo Elorduy, Edgar Arroyo, and Adrián López for their help in the field work. This study was funded by Ducks Unlimited de México (DUMAC), Exportadora de Sal, S.A., CONACYT (I26655), Universidad Autónoma de Baja California (4023, 4078-13), U.S. Fish and Wildlife Service-North American Conservation Act, and U.S. Geological Survey-Alaska Science Center.

English translation by Alejandro Cabello-Pasini and Christine Harris.

Wildlife Service-North American Conservation Act, y U.S. Geological Survey-Alaska Science Center.

Referencias

- Alcoverro, T., Zimmerman, R.C., Kohrs, D.G. and Alberte, R.S. (1999). Resource allocation and sucrose mobilization in light-limited eelgrass *Zostera marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 187: 121–131.
- Backman, T.W. and Barilotti, D.C. (1976). Irradiance reduction: effects on standing crops of the eelgrass *Zostera marina* in a coastal lagoon. *Mar. Biol.*, 34: 33–40.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.
- Brand-Gardner, S.J., Lanyon, J.M. and Limpus, C.J. (1999). Diet selection by immature turtles *Chelonia mydas*, in subtropical Moreton Bay, south-east Queensland. *Aust. J. Zool.*, 47: 181–191.
- Burke, M.K., Dennison, W.C. and Moore, K.A. (1996). Non-structural carbohydrate reserves of eelgrass *Zostera marina*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 137: 195–201.
- Cabello-Pasini, A. (1984). Transplantes de *Zostera marina* L. en el Estero de Punta Banda, Baja California, México, durante el verano de 1983 y su comportamiento a través de otoño e invierno. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Baja California, Baja California, México, 40 pp.
- Cabello-Pasini, A., Lara-Turrent, C. and Zimmerman, R.C. (2002). Effect of storms on photosynthesis, carbohydrate content and survival of eelgrass populations in a coastal lagoon and the adjacent open ocean. *Aquat. Bot.*, 74: 149–164.
- Cabello-Pasini, A., Muñoz-Salazar, R. and Ward, D.H. (2003). Annual variations of biomass and photosynthesis in *Zostera marina* L. along the Pacific coast of Baja California, Mexico. *Aquat. Bot.*, in press.
- Castro, R., Mascarenhas, A.S., Durazo-Arvizu, R. and Collins, C. (2000). Seasonal variation of the temperature and salinity at

- the entrance to the Gulf of California, Mexico. *Cien. Mar.*, 26: 561–583.
- Dawes, C.J. and Lawrence, J.M. (1979). Effect of blade removal on the proximate composition of the rhizome of the seagrass *Thalassia testudinum* Banks ex Koning. *Aquat. Bot.*, 7: 255–266.
- Dennison, W.C. and Alberte, R.S. (1985). Role of daily light period in the depth distribution of *Zostera marina* (eelgrass). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 25: 51–61.
- Durazo-Arvizu, R., Baumgartner, T., Bograd, S., Collins, C., de la Campa de Guzmán, S., García, J., Gaxiola-Castro, G., Huyer, A., Hyrenchbach, K., Loya, D., Lynn, R.J., Schwing, F.B., Smith, R., Sydeman, W. and Wheeler, P.A. (2001). The state of the California Current, 2000–2001: A third straight La Niña year. *CalCOFI Rep.*, 42: 29–60.
- Felger, R., Moser, M. and Moser, E. (1980). Seagrasses in Seri Indian Culture. In: R.C. Phillips and C.P. McRoy (eds.), *Handbook of Seagrass Biology: An Ecosystem Perspective*. Garland STPM Press, New York, pp. 261–276.
- Gerard, V.A. (1984). Physiological effect of El Niño on giant kelp in southern California. *Mar. Biol. Lett.*, 5: 317–322.
- Gnaiger, E. (1983). Calculation of energetic and biochemical equivalents of respiratory oxygen consumption. In: E. Graiger and H. Forstner (eds.), *Polarographic Oxygen Sensors*. Springer-Verlag, New York, pp. 337–345.
- Ibarra-Obando, S.E. (1989). Las praderas de pastos marinos del Pacífico mexicano con énfasis en *Zostera marina* Linneo. En: J. Rosa-Vélez y F. González-Farías (eds.), *Temas de Oceanografía Geológica en México*. Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, pp. 337.
- Jeffrey, S.W. and Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167: 191–194.
- Keller, M. and Harris, S.W. (1966). The growth of eelgrass in relation to tidal depth. *J. Wildlife Management*, 30: 280–285.
- Ladah, L.B., Zertuche-González, J.A. and Hernández-Carmona, G. (1999). Giant kelp (*Macrocystis pyrifera*, Phaeophyceae) recruitment near its southern limit in Baja California after mass disappearance during ENSO 1997–1998. *J. Phycol.*, 35: 1106–1112.
- Lewey, S.A. and Gorham, J. (1984). Pigment composition and photosynthesis in *Sargassum muticum*. *Mar. Biol.*, 80: 109–115.
- Lindqvist, K. and Lignell, R. (1997). Intracellular partitioning of ¹⁴CO₂ in phytoplankton during a growth season in the northern Baltic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 152: 41–50.
- Mather, R., Montgomery, W. and Portig, A. (1998). Exploitation of intertidal *Zostera* species by brent geese (*Branta bernicla* Hrota): Why dig for you dinner? *Biology and Environment: Proc. R. Irish Acad.*, 98B: 147–152.
- Mazzella, L. and Alberte, R. S. (1986). Light adaptation and the role of autotrophic epiphytes in primary production of the temperate seagrass, *Zostera marina* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 100: 165–180.
- McMillan, C. (1978). Morphogeographic variation under controlled conditions in five seagrasses, *Thalassia testudinum*, *Halodule wrightii*, *Syringodium filiforme*, *Halophila engelmannii*, and *Zostera marina*. *Aquat. Bot.*, 4: 169–189.
- Meling-López, A.E. and Ibarra-Obando, S.E. (1999). Annual life cycles of two *Zostera marina* L. populations in the Gulf of California: contrasts in seasonality and reproductive effort. *Aquat. Bot.*, 65: 59–69.
- Reed, A., Ward, D.H., Derksen, D.V. and Seding, J.S. (1998). Brant: *Branta bernicla*. *The Birds of North America*, 337: 1–32.
- Riosmena-Rodríguez, R. and Sánchez-Lizaso, J.L. (1996). The southern distributional limit of *Zostera marina* L. and *Phyllospadix torreyi* Watson for northwestern Mexico. *Oceanides*, 11: 45–48.
- Rodríguez-Montesinos, Y.E. and Hernández-Carmona, G. (1991). Seasonal and geographic variations of *Macrocystis pyrifera* chemical composition at the western coast of Baja California. *Cien. Mar.*, 17: 91–107.
- Sokal, R.R. and Rohlf, F.J. (1981). *Biometry*. W.H. Freeman and Co., New York, 859 pp.
- Tejada-Hernández, I. (1992). *Control de Calidad y Análisis de Alimento para Animales*. Secretaría de Educación Pública, Mexico, D.F., 397 pp.
- Westermeyer, R. and Gomez, I. (1996). Biomass, energy contents and major organic compounds in the brown alga *Lessonia nigrescens* (Laminariales, Phaeophyceae) from Mehuin, South Chile. *Bot. Mar.*, 39: 553–559.
- Yemm, E.W. and Willis, A.J. (1954). The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem. J.*, 57: 508–514.
- Zimmerman, R.C., Reguzzoni, J.L. and Alberte, R.S. (1995). Eelgrass (*Zostera marina* L.) transplants in San Francisco Bay: Role of light availability on metabolism, growth and survival. *Aquat. Bot.*, 51: 67–86.
- Zimmerman, R.C., Kohrs, D.G. and Alberte, R.S. (1996). Top-down impact through a bottom-up mechanism: The effect of limpet grazing on growth, productivity and carbon allocation of *Zostera marina* L. (eelgrass). *Oecologia*, 107: 560–567.