

00366



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



EFFECTO DE LA DIVERSIDAD DE SIMBIONTES  
ESPECÍFICOS EN EL PATRÓN DE ZONACIÓN VERTICAL  
DE CORALES HERMATÍPICOS

TESIS

que para obtener el grado académico de

Maestro en Ciencias  
(Biología Marina)

Presenta

Víctor Hugo Beltrán Ramírez.

Directores de Tesis: Dr. Roberto Iglesias Prieto.  
Dra. Patricia Thomé Ortiz.

Comité Tutorial: Dra. Anastazia Banaszak.  
Dra. Deni C. Rodríguez.  
Dr. Eric Jordán Dahlgren.

Puerto Morelos, Q. Roo 2002.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN FÍSICA  
Y QUÍMICA

*Dedicatoria.*

*A mis queridos Padres, Salvador y Genoveva, y a mis hermanos Julio y David.*

*A mi amada esposa Griselda.*

*A los arrecifes coralinos mexicanos..*

## Agradecimientos:

Quisiera agradecer en especial a los Doctores Patricia Thomé Ortiz, y Roberto Iglesias Prieto sus atinados comentarios para que este manuscrito fuera claro, además del conocimiento y atención que me brindaron y la oportunidad de desarrollar mi formación de posgrado bajo su tutela.

A los miembros del comité tutorial, los Doctores. Eric Jordán, Anastazia Banaszak, y Deni Rodríguez, por los comentarios al trabajo y la ayuda brindada sobre todo en los últimos momentos cuando el tiempo parecía no estar de mi lado.

Quisiera agradecer a los Doctores Héctor Reyes Bonilla y Dinhora Herrero, y al Biólogo Marino Sergio Scarry por su valiosa ayuda en los muestreos.

Por otro lado quisiera agradecer a todos mis compañeros de maestría y amigos de la estación con los que compartí experiencias inolvidables en Pto. Morelos: Bióloga Guadalupe Barba, Hidrobiólogo Alejandro Zugasti C , Oceanólogo César Meiners, Biólogo Luis González, Biólogo Daniel Gasca, Biólogo Marino Kor van Dijk, Bióloga Gabriela Reyes, Bióloga Norma Pantoja, Bióloga Marina Norma Estrada, Bióloga Marina Gloria Ramos, Biólogo Miguel Maldonado.

A mis compañeros de laboratorio que en algún momento aportaron comentarios o ideas o simplemente me regalaban del café que habían preparado: Ingeniera Química Natalia Ayala, Biólogo Xavier Hernández, Hidrobióloga Aime Rodríguez, y Ocenóloga Marissa Calderón.

Agradezco además a todas aquellas personas académicas y administrativas del ICMYL que me ayudaron en su momento creando el ambiente propicio para que mi estancia en este posgrado fuera placentera y productiva.

Un agradecimiento muy especial a la que ahora es mi esposa la Bióloga Griselda Avila Soria por tantos y tantos momentos de escuchar la misma historia contada de diferentes formas, por su apoyo incondicional y por no permitirme dormir cuando sabía que ya faltaba poco.

La mayor parte de mis estudios de maestría fueron auspiciados por todos aquellos mexicanos que pagan sus impuestos, a través de una beca otorgada por el CONACyT.

# EFFECTO DE LA DIVERSIDAD DE SIMBIOTES ESPECÍFICOS EN EL PATRÓN DE ZONACIÓN VERTICAL DE CORALES HERMATÍPICOS.

## Contenido.

	Página.
Indice general .....	i
Indice de figuras, y tablas .....	iii
Resumen .....	iv
I Introducción.....	1
I 1 Antecedentes.....	3
I 2 Objetivo general.....	6
I.2.1 Objetivos particulares .....	6
II Metodología .....	8
II.1 Descripción del área de estudio.....	8
II.2 Trabajo de Campo.....	8
II.2.1 Colecta y preservación de las muestras .....	9
II.2.2 Experimento a largo plazo de trasplantes recíprocos de corales al opuesto de su distribución.....	9
II.2.3 Medición del desempeño fisiológico de los simbioses por fluorometría .....	10
II.3 Trabajo de laboratorio .....	12
II.3.1 Aislamiento y preservación de los simbioses .....	12
II.3.2 Determinación de cantidad de clorofila a por célula.....	12
II.3.3 Taxonomía molecular (aislamiento del DNA total; amplificación por PCR de los marcadores SSUrRNA, ITS, e ITS2, RFLP de SSUrRNA; DGGE de ITS2, y análisis de secuencias de 5.8S).....	13
III Resultados .....	18
III.1 Taxonomía molecular.....	18
III.1.1 Comparación del tamaño de los marcadores genéticos utilizados para diferenciar a los simbioses .....	18
III.1.2 Análisis de RFLP de SSUrRNA de los dinoflagelados simbioses ...	19
III.1.3 Análisis de DGGE de ITS-2 de los dinoflagelados simbioses ...	20
III.1.4 Posición filética de los simbioses a partir del gen 5.8S .....	21

## Contenido (continuación).

	Página
III.2 Fotofisiología.....	24
III.2.1 Análisis de los datos de Qm con muestras relajadas en la oscuridad .....	24
III.2.2 Análisis de los datos de Qm con muestras sin relajar en la oscuridad.....	25
III.2.3 Análisis de los datos de presión sobre PSII de trasplantes recíprocos de ambas especies coralinas.....	26
III.2.4 Análisis del comportamiento de los pigmentos fotosintéticos intracelulares respecto a la profundidad .....	27
IV Discusión .....	28
V Conclusiones .....	34
Bibliografía citada .....	36

## Índice de figuras, y tablas.

Figura	Página
1	Comparación de distintos parámetros fotofisiológicos dependientes de la luz medidos sobre los dinoflagelados simbiotes de dos especies de corales hermatípicos colectados en la laguna arrecifal de Pto Morelos, Quintana Roo .....7
2	Tamaño aparente de los tres marcadores genéticos (SSUrRNA, ITS, ITS-2) amplificados por PCR .....18
3	Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de SSUrRNA con <i>Taq 1</i> de dinoflagelados simbiotes .....19
4	Comparación de los perfiles de DGGE de la región ITS-2 de las algas simbiotes de ambas especies de corales .....20
5	Alineamiento de las secuencias del gen 5 8S de los diferentes dinoflagelados simbiotes .....22
6	Reconstrucción filogenética de dinoflagelados simbiotes hecha a partir de secuencias del gen 5.8S .....23
7	Efecto de la profundidad en Qm (medida con un minuto de adaptación en la oscuridad) de los simbiotes de dos corales hermatípicos .....24
8	Efecto de la profundidad en Qm (medida sin un minuto de adaptación en la oscuridad) de los simbiotes de dos corales hermatípicos .....25
9	Efecto del cambio de cantidad de luz en el desempeño fisiológico de los simbiotes de los corales transplantados.....26
10	Efecto de la profundidad en la concentración de clorofila a en las células simbiotes de <i>P. verrucosa</i> y <i>P. gigantea</i> ..... 27
Tabla	
1	Base de reconocimiento de las secuencias y del filotipo al que pertenecen los simbiotes actualmente aislados y clave asignada para comparar las secuencias del gen 5 8S .....17

## Resumen.

El presente estudio prueba la hipótesis de que dos especies dominantes de corales hermatípicos (*Pocillopora verrucosa* y *Pavona gigantea*) se distribuyen verticalmente debido a las capacidades fotoaclimatorias de sus simbiontes específicos. Los patrones de zonación vertical en estas comunidades coralinas del Pacífico Oriental Tropical han sido explicados en base a presiones de selección por depredación selectiva por peces. La hipótesis se puso a prueba demostrando que ambas especies de corales poseían dos entidades simbióticas genéticamente distintas, con adaptaciones particulares para explotar la luz y con un alto grado de especificidad con su hospedero. Para la identificación se utilizaron comparaciones de secuencias, electroforesis desnaturalizante (DGGE) y polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP) de tres marcadores genéticos, el gen 5.8S, la región ITS2, y la subunidad pequeña ribosomal (SSUrRNA). El desempeño fotofisiológico de los simbiontes *in hospite* (Q<sub>m</sub>) de cada especie de coral fue evaluado mediante las emisiones de fluorescencia de la clorofila *a*. Los parámetros utilizados de esta señal fueron la eficiencia de separación de carga real en el fotosistema dos (Fv/fm) medida a medio día relativa al la eficiencia de separación de carga potencial medida al atardecer ( $\Delta F/fm'$ ). Se realizaron experimentos de transplatación recíproca de 5 individuos de cada especie al opuesto de su rango de distribución con el fin de evaluar el grado de especificidad mediante análisis genéticos y capacidad fotoaclimatoria de sus simbiontes. Los resultados de RFLP de SSUrRNA para distinguir la afinidad filética, muestran que los simbiontes de *Pocillopora verrucosa* pertenecen al filotipo (clade) D, y los de *Pavona gigantea* al filotipo C. Análisis de DGGE de ITS2 y filogenia de fragmentos completos del gen 5.8S demuestran la existencia de dos posibles especies de dinoflagelados simbióticos con un parentesco filogenético distante. Los datos de Q<sub>m</sub> muestran que ambas taxa aprovechan diferencialmente la luz. Adicionalmente en situaciones de estrés metabólico provocado por el cambio en la cantidad de flujo de fotones, ambos dinoflagelados demostraron una pobre capacidad de aclimatación y un alto grado de especificidad con su hospedero. Tomado juntos los resultados demuestran que la zonación vertical de *P. verrucosa* y *P. gigantea*, puede ser explicada por la presencia de simbiontes con diferentes capacidades de explotar la luz. lo cual refleja una verdadera diversificación del nicho en un ecosistema arrecifal

# Efecto de la diversidad de simbioses específicas en el patrón de zonación vertical de corales hermatípicos

## I. Introducción

Los arrecifes coralinos son uno de los ecosistemas marinos más biodiversos y que llegan a formar estructuras geológicas vivientes de gran escala. Esta estructura cementada en carbonato de calcio ofrece refugio y alimento para múltiples especies de organismos de casi todas las filos reconocidos en la actualidad, convirtiendo a estos ecosistemas en complejas redes tróficas en medio de un océano somero, oligotrófico y con estrechos intervalos anuales de temperatura, característicos de las regiones tropicales (Yonge, 1973; Goreau *et al.*, 1979; Falkowski *et al.*, 1984; Veron, 1995). Estos ecosistemas son utilizados además para una amplia gama de actividades humanas que van desde las puramente recreativas, hasta aquellas donde comunidades basan su economía en la explotación de los recursos a nivel artesanal e industrial (Roberts y Polunin, 1993). Los corales hermatípicos, los principales constructores del arrecife, son organismos modulares con crecimiento indeterminado que pueden llegar a alcanzar tallas de hasta 10 m de diámetro y edades de cientos de años (Veron, 1995). Dentro de su tejido viven dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium*, conocidos comúnmente como "zooxantelas" los cuales pueden llegar a alcanzar densidades de varios millones de individuos por centímetro cuadrado de tejido animal. Esta simbiosis surgió aproximadamente hace 220 m.a., de manera que las asociaciones que observamos hoy día han desarrollado un alto grado de especificidad e integración ecológica y nutricional por parte de ambas entidades, para formar una sola unidad funcional llamada holosimbionte, el cual posee la ventaja selectiva de los dos componentes (Trench, 1992; Iglesias-Prieto y Trench, 1994, 1997a).

En esta asociación, el animal le ofrece al dinoflagelado refugio contra la depredación al mantenerse creciendo dentro del tejido, el cual se encuentra sobre un esqueleto rígido calcáreo. Se ha hipotetizado que este limitado espacio para el desarrollo de los simbioses favoreció la aparición de adaptaciones hacia un hospedero en particular, debido a la presión de selección de competencia por espacio (Rowan, 1998). El simbiote además, aprovecha los desechos metabólicos del hospedero en forma de amonio y bióxido de carbono para la construcción de sus proteínas y la reducción del carbono inorgánico para la producción de biomasa vía fotosíntesis (Falkowski *et al.*, 1984). Por otro lado, el simbiote al ser un organismo fotosintético, le brinda al hospedero carbono orgánico principalmente en forma de glicerol, el cual es sustrato respirable para el animal. Este aporte cubre en la mayoría de los casos más del 100% de los requerimientos metabólicos basales del hospedero (Muscatine y Porter, 1977; Muscatine, 1980; Porter *et al.*, 1984). La fotosíntesis del alga además de contribuir a la producción neta en el arrecife, esta

asociada con altas tasas de depositación de carbonato de calcio, favoreciendo al crecimiento de la matriz arrecifal (Goreau, 1963). De hecho, sería difícil concebir a los arrecifes coralinos tal como los conocemos en la actualidad, si no fuera gracias a la simbiosis de estos dinoflagelados con los corales escleractíneos (Stanley y Stewart, 1995). Esta ventaja que tiene un holosimbionte de combinar la heterotrofia con la autotrofia, se refleja en el éxito de este grupo a lo largo de la historia evolutiva, dominando en los mares cálidos y someros del planeta.

Esta simbiosis ecológicamente obligada limita la distribución de los corales hermatípicos a la zona eufótica, debido a la importancia del metabolismo del alga en la calcificación y nutrición de la asociación intacta. En este espacio los integrantes de una comunidad arrecifal se ven sujetos a diferentes gradientes ambientales. Entre estos, la luz, la energía del oleaje, y la cantidad de zooplancton tienen un efecto sobre la fisiología de estos organismos, la cual puede ser representada teóricamente como una gaussiana, en donde el pico señala las condiciones óptimas ambientales para algún proceso fisiológico en particular. Los extremos de la distribución representan los límites de tolerancia del organismo ante dicho factor ambiental (Levins, 1968). A escalas evolutivas dicha representación del desempeño de una especie coralina en función a un factor ambiental, que en este caso se encuentra asociado a la profundidad, puede crear asociaciones predecibles a lo largo de dicho gradiente, convirtiendo el paisaje arrecifal en zonas de dominancia de ciertas especies (comúnmente denominada zonación) adaptadas a las variaciones ambientales a las que se encuentran sujetas (Iglesias Prieto y Trench, 1994, 1997a, b).

Este fenómeno ecológico de zonación ha sido explicado con base en procesos biológicos como capacidad potencial de crecimiento, habilidad competitiva, y depredación selectiva. En este caso se ha documentado que las especies ramificadas en general poseen una tasa de crecimiento mas elevada con respecto a aquellas de crecimiento masivo y tienden a desarrollarse preferentemente en las partes superiores del arrecife, de igual forma, algunas especies son más agresivas que otras, generando dominancia en ambos casos (Huston, 1985). Wellington (1982) por su parte, encontró que los patrones de zonación de dos especies dominantes en una comunidad coralina típica del Pacífico Oriental Tropical podrían ser explicados por la distribución vertical diferencial de peces, ya que la presencia o ausencia de estos significa el desarrollo preferente de una especie de coral.

En la actualidad se reconoce la existencia de varias especies del género *Symbiodinium* formalmente descritas con base en análisis cariotípicos, bioquímicos, y de micrografía electrónica, (Trench y Blank, 1987, Banaszak *et al.*, 1993). Algunas de estas especies simbióticas mantenidas en cultivo, demostraron poseer atributos fotoaclimatorios especie-específicos consistentes con la ubicación ecológica del hospedero del cual fueron aislados (Iglesias-Prieto y Trench, 1994; Iglesia-Prieto y Trench, 1997a). Este hallazgo en conjunción con la premisa de que estas asociaciones simbióticas tienden a la especificidad (Trench, 1993), dió las bases para postular la hipótesis de que la distribución vertical del hospedero estaría limitada por la capacidad fotoaclimatoria de sus simbioses.

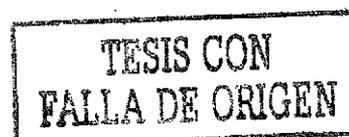
En el presente estudio se probó esta hipótesis utilizando dos especies de corales hermatípicos dominantes con una zonación bien marcada en el Pacífico Oriental Tropical. Para tal efecto se emplearon formas eficaces de identificación de las algas simbióticas de los aislamientos en fresco sin necesidad del cultivo. Se emplearon además métodos no invasivos para determinar las capacidades fotoaclimatorias (a lo largo de la entera distribución de cada especie de coral) del simbionte *in hospite*. Y por último se comprobó la especificidad (ya que en ausencia de ésta el alga simplemente "escogerá" al hospedero que se encuentre dentro de sus requerimientos lumínicos), de las asociaciones por medio de trasplantes.

## 1.1 Antecedentes.

En la actualidad se reconoce que el género *Symbiodinium* es monofilético y que posee una diversidad comparada a la de dinoflagelados de vida libre pertenecientes a diferentes órdenes. Estos hallazgos fueron hechos a partir del análisis de secuencias de los genes altamente conservados que codifican para la subunidad grande y pequeña de RNA ribosomal (Sogin *et al.*, 1986) (SSUrRNA, y LSUrRNA, respectivamente). Adicionalmente con el empleo de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP \*) se les pudo agrupar en tres grandes clados o filotipos, A, B, y C (Rowan y Powers, 1991a, 1991b). Estas categorías no taxonómicas agrupan a organismos dentro del género *Symbiodinium* filogenéticamente relacionados entre sí (Rowan y Powers, 1991a; 1991b, 1992; Rowan y Knowlton, 1995; Trench, 1997; LaJeunesse, 2001). Esta herramienta a pesar de haber abierto un campo importante en el estudio de la diversidad taxonómica del género, no es capaz de diferenciar entre algunas de las especies formalmente descritas, entendiéndose por esto, que dentro de cada clado podían albergarse varias especies, cada una con una historia ecológica distinta. En respuesta a esta baja resolución se emplearon regiones espaciadoras intergenes (ITS \*) las cuales se caracterizan por ser sitios altamente variables. Los ITS se localizan entre los genes SSUrRNA y LSUrRNA, y están centralmente divididos por el gen 5.8S (Coleman *et al.*, 1994), y han demostrado tener cierta similitud entre especies relacionadas, lo cual ayuda a su alineamiento y comparación en análisis filogenéticos (Coleman *et al.*, 1994).

Estas regiones no codificantes han sido utilizadas para resolver problemas de identificación a nivel especie en dinoflagelados del género *Alexandrium*, y algas verdes volvocales (Adachi *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1994). Para *Symbiodinium*, se encontró que las regiones ITS pueden ser un buen marcador interespecífico para evaluar la diversidad de este género por comparación de secuencias (Hunter *et al.*, 1997), o mediante los patrones de bandeo que son secuencia-específicos, cuando son amplificadas por reacción en cadena de polimerasa (PCR \*) (Saiki *et al.*, 1988) con uno de los extremos sujeto a una pinza rica en guanina y citocina, posteriormente separadas por electroforesis en gradiente desnaturante (DGGE \*) (LaJeunesse y Trench, 2000; LaJeunesse, 2001). El empleo de este marcador ha tenido éxito en distinguir entre las especies formalmente descritas, e incluso ha sido utilizado como marcador cercano a nivel especie en

\* Por sus siglas en inglés.



estudios sobre estructura comunitaria en un arrecife coralino y patrones biogeográficos de especificidad en dinoflagelados del género *Symbiodinium* (LaJeunesse y Trench, 2000; LaJeunesse, 2001; 2002).

Aunado a esta diversidad genética, se ha encontrado que algunos de los representantes de los distintos clados o filotipos poseen características fenotípicas propias. Todos los individuos del clade A, son capaces de sintetizar aminoácidos parecidos a la micosporina, las cuales son moléculas que les proveen ventajas adaptativas sobre todo en ambientes con alta incidencia de radiación UV, ya que estas sustancias funcionan como filtros que protegen contra los daños inducidos por esta radiación de alta energía (Banaszak *et al.*, 2000). Por otro lado, estudios de desempeño fotosintético realizados *in vitro* sobre tres especies de dinoflagelados simbiotes (cada una de distinto filotipo) mantenidos en cultivo, demostraron que las capacidades fotoaclimatorias eran especie-específicas, y que dichas respuestas correspondían a la ubicación ecológica del hospedero (Iglesias-Prieto y Trench 1994). Estos hallazgos sin embargo no son capaces de mostrar una tendencia fotoaclimatoria dentro de un filotipo, debido a que la caracterización fisiológica, así como la taxonomía de este grupo, son actualmente escasas como para hacer una generalización.

Debido a la importancia de la fotosíntesis del simbiote en el mantenimiento del holosimbiote, recientemente se han empleado técnicas de fluorescencia de la clorofila *a* de estos organismos *in hospite* como una medida no invasiva de monitoreo de parámetros relacionados con la fotosíntesis y vías de disipación de la energía de excitación de estos productores primarios. Esto datos han ayudado a comprender mejor los fenómenos como el blanqueamiento de coral, fotoprotección, fotoinhibición (Brown *et al.*, 1999, Jones y Hoegh-Guldberg, 2001). La energía del fotón es transferida a la molécula de clorofila, la cual transfiere esta excitación hacia el centro de reacción donde se realiza la separación de carga, la hidrólisis del agua, y el subsecuente transporte de electrones. Sin embargo no siempre la energía de excitación es utilizada para hacer fotoquímica, ya que cuando la cantidad de fotones absorbidos sobrepasan la capacidad de las reacciones de oxido-reducción en el centro de reacción, esta excitación se regresa a las antenas y es emitida en forma de fluorescencia, la cual puede ser detectada. A través de esta señal es posible cuantificar la eficiencia de los procesos fotoquímicos y no fotoquímicos, los cuales están relacionados con fotoprotección (evitan el daño oxidativo en el aparato fotosintético) a costa de una disminución en la eficiencia de los procesos fotoquímicos (Long *et al.*, 1994) Esta disminución puede atribuirse además, a daños producidos por el exceso de fotones en el aparato fotosintético (Kyle *et al.*, 1984; Prasil *et al.*, 1992).

Como ejemplo se incluyen datos de fluorimetría de dos especies de corales simbióticos (*Porites astreoides*, A3, y *Diploria strigosa*, B1 ) (Fig 1a y 1b, respectivamente) colectadas en la laguna arrecifal de Pto. Morelos, Quintana Roo. En ambas gráficas se observa que los simbiotes de estos corales presentan una oscilación diurna en la capacidad de separación de carga (representado por el cociente  $F_v/F_m$ ) (Fig 1a, b círculos oscuros). En las primeras horas del día

cuando todos los centros de reacción se encuentran abiertos y las proteínas dañadas un día anterior han sido reparadas, la cosecha cuántica es alta. Sin embargo conforme avanzamos a lo largo de la mañana y la cantidad de luz aumenta (Fig. 1a, b, cruces) (photosynthetically active radiation, PAR, 400-700 nm), se comienzan a inducir los mecanismos fotoprotectores (Fig. 1a, b, triángulos) representados en estas gráficas como el coeficiente de desactivación no fotoquímica (nonphotochemical quenching, NPQ), resultando en una disminución en la cosecha cuántica. Sin embargo las capacidades fotoprotectoras de cada "tipo" de simbiote son distintas. Las microalgas de *Diploria strigosa*, (Fig. 1b) poseen mecanismos de disipación del exceso de excitación menos eficientes comparados con las microalgas de *Porites astreoides*, (Fig. 1a). Estas diferencias en las capacidades fotosintéticas y fotoprotectoras de cada tipo de alga se magnifican cuando la cantidad de PAR es máxima, próximo al cenit solar, en donde la cosecha cuántica es mínima, con respecto a los valores del amanecer o el atardecer (no se muestran datos). Estas claras diferencias en las capacidades fotosintéticas de estos dos corales ayudan a introducirnos en el concepto denominado presión máxima sobre el fotosistema dos, o  $Q_m$  (Fig. 1a, b, círculos claros) el cual fue utilizado en este estudio como una medida del desempeño fisiológico del simbiote (Iglesias-Prieto *et al.*, 2002).  $Q_m$  representa la medida de la amplitud de la oscilación de la cosecha cuántica (producto de los mecanismos de fotoprotección y fotodaño) medida a medio día ( $\Delta F/F_m'$ ), relativa al valor máximo de cosecha cuántica al amanecer o al atardecer ( $F_v/F_m$ ), es decir,  $Q_m = 1 - [(\Delta F/F_m' \text{ a medio día}) / (F_v/F_m)]$  (Iglesias-Prieto *et al.*, 2002). Este valor de desempeño fisiológico va de cero a uno. En los extremos, la traslocación de productos de la fotosíntesis hacia el hospedero es deficiente pudiendo poner en peligro la asociación si esto se mantiene por largos períodos de tiempo. De esa forma en el caso específico de los corales utilizados para ejemplificar este fenómeno, *Diploria strigosa* experimenta casi tres veces más presión a una misma intensidad luminosa ( $1400 \mu \text{ mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) que *Porites astreoides* (Fig. 1b y 1a, respectivamente). *D. strigosa* tiende a predominar en las zonas más profundas alrededor de los 10 m, mientras que *P. astreoides* es más abundante en la zona de la rompiente donde la cantidad de luz incidente es mayor (Jordán, 1980).

Con respecto a los patrones de especificidad, gracias al empleo de RFLP de SSrRNA Baker y Rowan (1997) encuentran que la mayoría de los corales hermatípicos del Pacífico oriental tropical poseen simbioses del filotipo C, y sus contrapartes del Caribe poseen A, B, o C, por colonia. Este patrón se repite con frecuencia indicando alta especificidad, entendiendo por ésta que las combinaciones hospedero-alga no son aleatorias, (Trench, 1988, 1993, 1997). Esto se ha explicado con base en el tipo de simbiosis, ya que en los sistemas cerrados, esta especificidad está garantizada, mientras que en los sistemas abiertos se han propuesto dos mecanismos que la favorecen. Uno de ellos está relacionado con el desarrollo de mecanismos moleculares de reconocimiento, en donde ciertos ligandos de la pared celular de las microalgas reaccionan específicamente con receptores en las membranas animales (Trench, 1988; 1992). Otra propuesta indica que la especificidad es el resultado de las habilidades diferenciales de sobrevivencia de

diferentes "tipos" de simbioses en un hospedero (Rahat, y Reich, 1988). Por otro lado Rowan y Knowlton (1995), y Rowan *et al.*, (1997) documentaron la existencia de asociaciones polimórficas, en donde existe una combinación de varios filotipos en proporciones variables. Este polimorfismo ha sido interpretado como una ausencia de especificidad suponiendo que las asociaciones son promiscuas, en respuesta a variaciones ambientales (Baker, 2001). Sin embargo, la suposición de especificidad no implica que la asociación microalga-invertebrado sea uno a uno.

Dado los antecedentes de la existencia de una alta diversidad taxonómica dentro del género *Symbiodinium*, y la forma eficaz de evaluarla, aunado a las respuestas fisiológicas especie-específicas *in vitro*, asociadas con la distribución del hospedero que ahora pueden evaluarse *in hospite*, se decidió probar la hipótesis de que los corales hermatípicos, como holosimbioses, se distribuyen espacialmente en el gradiente vertical con base en sus capacidades particulares para explotar la luz. Con este propósito se escogió una comunidad coralina simple ubicada en el sur del golfo de California. Esta comunidad posee características de zonación vertical de dos especies dominantes (*Pocillopora verrucosa*, y *Pavona gigantea*) bien definida, que además se cumple también para la mayoría de las comunidades coralinas del Pacífico Oriental Tropical, (Cortés y Murillo, 1985; Glynn y Leyte Morales, 1997; Carriquiry y Reyes-Bonilla, 1997; Reyes-Bonilla y López-Perez, 1998; Beltrán-Ramírez, 1999), lo que lo convierte en sitio ideal para probar esta hipótesis.

## 1.2 Objetivo general.

Explorar la posibilidad de que la distribución espacial vertical de dos especies de corales hermatípicos dominantes en el Pacífico Oriental Tropical esté en función de las habilidades fotosintéticas de sus endosimbioses específicos.

### 1.2.1 Objetivos particulares.

- 1.- Demostrar que ambas especies de corales albergan dos entidades simbióticas genéticamente distintas.
- 2.- Demostrar que estas entidades genéticamente distintas, poseen adaptaciones particulares que les permitieran explotar diferencialmente el campo lumínico al que se encuentran sujetas.
- 3.- Demostrar que estas asociaciones son específicas independientemente de las condiciones ambientales prevalentes.

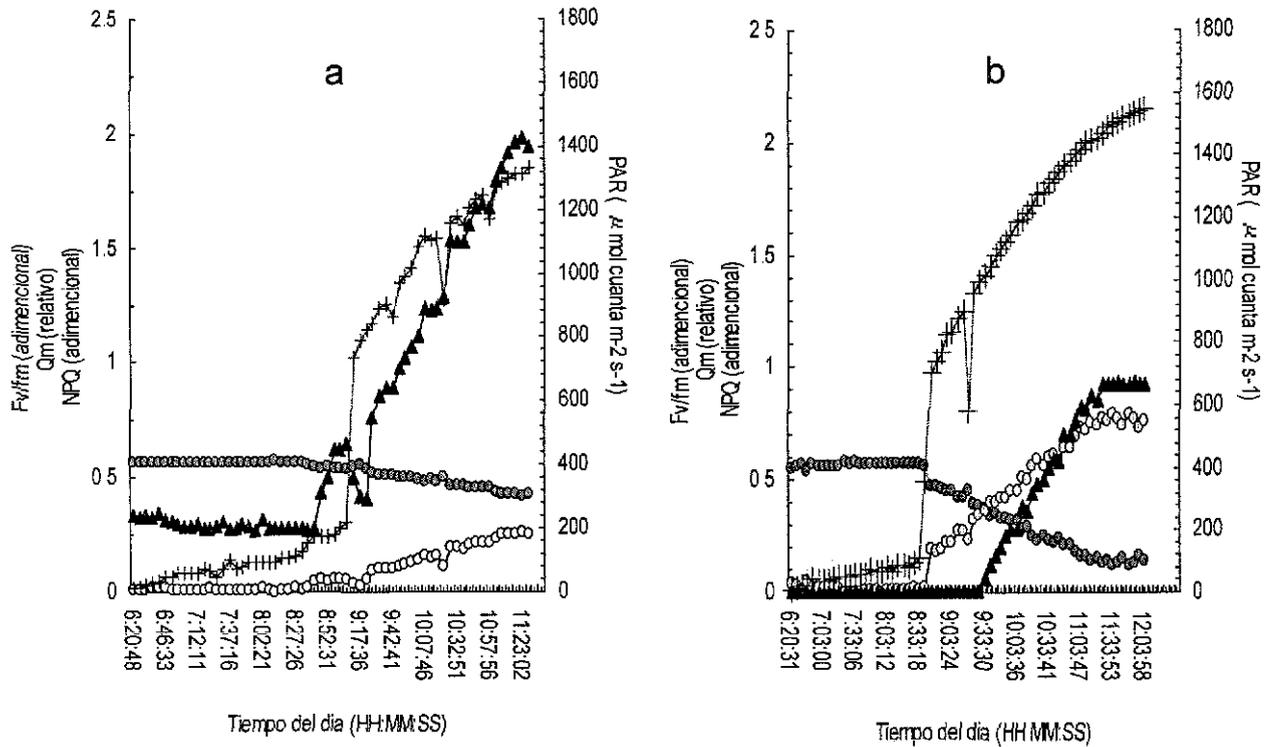


Figura 1. Comparación de distintos parámetros fisiológicos dependientes de la luz medidos sobre los dinoflagelados simbiotes de dos especies de corales hermatípicos colectados en la laguna arrecifal de Pto. Morelos, Quintana Roo. a) *Porites astreoides*, Filotipo A3; b) *Diploria strigosa*, Filotipo B1. Las cruces, (eje "y" secundario) representan la cantidad de luz (photosynthetically active radiation, PAR, 400-700 nm), los triángulos representan la desactivación no fotoquímica, o NPQ, los círculos claros representan la presión sobre el fotosistema dos o  $Q_m$ , y los círculos oscuros representan la capacidad de separación de carga o cosecha cuántica en el fotosistema dos.

## II. Metodología

### II.1 Descripción del área de estudio.

Se estudió una comunidad coralina de la isla la Gaviota, localizada dentro de la bahía de la Paz B. C. S., México (24° 17' N, 110° 20' W). El promedio anual de temperatura medido en la superficie es de 24.3°C, con un intervalo anual entre los meses de verano e invierno de 17°C (COADS, 1996). La región sur del Golfo de California se caracteriza por la escasa nubosidad la mayor parte del año.

La comunidad coralina esta compuesta por siete especies hermatílicas ubicadas en cuatro géneros (Beltrán-Ramírez, 1999). Este manchón coralino se encuentra asentado sobre una franja rocosa que se extiende de la línea de marea unos 20-25 m hacia el mar, con una pendiente aproximada de 66° encontrando después fondo arenoso, donde ocasionalmente se puede encontrar pequeñas colonias de *Psammocora stellata*. La especie ramificada dominante es *Pocillopora verrucosa*, la cual se distribuye del nivel medio de marea hasta aproximadamente los 6 m de profundidad llegando a formar grandes colonias de aproximadamente 5 m de diámetro y 2-3 m de alto. De los 6 a los 15 m de profundidad tiende a predominar la especie masiva *Pavona gigantea*, y distribuido indistintamente respecto a la profundidad, se encuentran colonias de forma incrustante de *Porites panamensis* (Beltrán-Ramírez, 1999). Después de los 15 m de profundidad la cobertura coralina es sumamente escasa debido al alto coeficiente de extinción de la luz en el agua y la presencia de una termoclina somera.

El conjunto de las características mencionadas a continuación hizo que esta comunidad coralina fuera escogida para probar la hipótesis; (i) En esta isla el patrón de zonación vertical de estas dos especies dominantes (*P. verrucosa*, y *P. gigantea*) se cumple también para la mayoría de las comunidades coralinas del Pacífico Oriental Tropical, (ii) la escasa diversidad de esta comunidad en comparación con sus similares del Indo Pacífico y el Caribe, ayuda a simplificar la comprensión de los resultados, (iii) el rango de distribución se encuentra compactado en los primeros 15 m lo que favoreció la colecta de datos por esfuerzo de muestreo, (iv) por las características de ubicación de la comunidad (alineada hacia el sur) durante todo el día se encuentra iluminada, es decir no se proyecta sombra alguna sobre ella, aunado con las características atmosféricas de escasa nubosidad de la zona, estos dos últimos aspectos fueron claves para la toma de datos fisiológicos en los simbiontes *in situ*.

### II.2 TRABAJO DE CAMPO.

El trabajo de campo consistió en la colecta de fragmentos de coral de dos especies (*Pocillopora verrucosa* y *Pavona gigantea*) para determinar diferencias genéticas de sus simbiontes, simultáneamente se muestrearon parámetros fotofisiológicos *in situ* de ambas especies

a lo largo de su distribución vertical. Las mediciones fotofisiológicas se hicieron empleando técnicas no invasivas sobre el holosimbionte (ver sección II.2.3). Se realizaron también trasplantes recíprocos de ambas especies al opuesto de su distribución con el fin de probar el grado de especificidad de la asociación y respuesta fisiológica frente a situaciones de estrés por cambios en la cantidad de luz incidente.

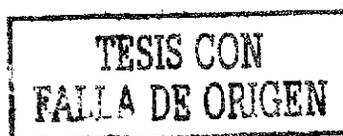
Se realizaron varias visitas a la localidad desde septiembre de 1998 hasta julio de 2001. En las primeras se realizaron trasplantes experimentales y toma de datos de fluorometría. Para julio de 2000 ya se tenían datos sobre sobrevivencia diferencial de ambas especies frente al trasplante, y se había optimizado la toma de datos de fluorometría de manera que se procedió al inicio formal del experimento con la colecta de fragmentos, relocalización de algunos de estos, y toma masiva de datos fisiológicos de la asociación intacta, como se detalla a continuación.

### II.2.1 Colecta y preservación de las muestras.

Se colectaron 13 fragmentos de coral con cincel y martillo de la parte expuesta directamente al sol de cada especie (*P. verrucosa*, y *P. gigantea*) a lo largo de todo el gradiente de distribución vertical de cada una de ellas. Estos fueron transportados al laboratorio incluidos en un buffer salino de preservación (20% de DMSO; 0.25M de EDTA; saturado con NaCl) (Seutin *et al.*, 1991) con los datos de la fecha, especie, y profundidad de colecta. Algunas de estas muestras fueron a su vez fragmentadas para ser transportadas en un poco de agua de mar a 4°C y congeladas inmediatamente a -70°C cuando llegaron al laboratorio, esto con el fin de evitar al máximo la interferencia del preservador en los análisis de pigmentos y proteínas de los dinoflagelados simbioses. Este mismo procedimiento se realizó un año después con los corales transplantados.

### II.2.2 Experimento a largo plazo de trasplantes recíprocos de corales al opuesto de su distribución.

Previo al inicio del experimento (septiembre de 1998) se realizaron trasplantes de ambas especies de coral (tres de cada una) de 10 a 3 m para *P. gigantea*, y de 3 a 10 m para *P. verrucosa* con el fin de observar la viabilidad de los mismos, así como monitorear el estado fisiológico de los simbioses por fluorometría. Una vez observado que los individuos de la especie *Pocillopora verrucosa* no eran viables después de seis meses, se decidió no realizar los trasplantes con esta especie. De los trasplantes hechos con *Pavona gigantea* sólo una colonia sobrevivió. Esta colonia permaneció por espacio de 22 meses fuera de su hábitat antes de ser colectada para los análisis genéticos. De esta manera se decidió iniciar el experimento con 5 fragmentos de *P. gigantea*, cada uno de diferente colonia, los cuales se movieron de 10 a 3 m (julio de 2000). El criterio para escoger a estos fragmentos fue que la ubicación de los mismos en la colonia fuera normal a la superficie. Cada fragmento fue adherido por la parte de abajo con cemento para construcción a



una roca plana localizada a 3 m de profundidad libre de sombra todo el día. Después de un año se colectaron fragmentos de los tres trasplantes sobrevivientes (ver métodos de colecta) para evaluar la identidad filética de sus simbioses.

### II.2.3 Medición del desempeño fotofisiológico de los simbioses por fluorometría.

Se determinó el desempeño fisiológico del simbionte *in hospite* a partir de la medición de la presión máxima de fotones sobre el PSII de los simbioses de coral (variante de la descrita por Maxwell *et al.*, (1995) donde la presión de excitación en el fotosistema dos (PSII \*) se calculó como la unidad menos el coeficiente de desactivación fotoquímica). Para calcularlo se tomaron lecturas *in situ* de emisiones de fluorescencia del PSII de los simbioses de ambas especies de corales (*P. gigantea*, *P. verrucosa*) con un fluorómetro sumergible de amplitud modulada (Diving-PAM Walz Effeltrich, Alemania). Los datos fueron tomados escogiendo las zonas del coral pigmentadas y que estuvieran normales a la superficie para evitar el efecto del auto-ensombrecimiento. Los muestreos se realizaron durante varios días despejados entre septiembre de 1998, y julio de 2000 a todo lo largo de los rangos de distribución de ambas especies de corales (0.5 a 14 m) cubriendo un área aproximada de 1200 m<sup>2</sup>.

En un principio (datos de septiembre de 1998, marzo y junio de 1999) se hicieron pruebas antes del registro masivo de datos en julio de 2000. Estas consistieron en dejar relajar en la obscuridad (por un minuto) el aparato fotosintético antes de la toma de datos. Esto se lograba insertando la fibra óptica del Diving-PAM en el centro de un disco opaco de PVC que estaba sujeto a la colonia. Sin embargo pruebas hechas posteriormente sin previa relajación en la obscuridad dieron resultados similares, lo cual aumentó el número de observaciones.

Se registró además la profundidad a cada disparo del fluorómetro con un sensor acoplado a éste con una resolución de  $\pm 0.1$  m. Con el fin de determinar el coeficiente de extinción vertical de luz y ubicar la termoclina, al final del muestreo, se realizó un transecto vertical desde las partes mas profundas donde había corales hasta la superficie tomando datos de PAR con un sensor plano corregido por coseno y sensor de temperatura cada 0.5 m, ambos sensores acoplados al Diving-PAM.

Para el cálculo del desempeño fotofisiológico de los simbioses, los datos de fluorometría se registraron a dos distintas horas del día. A medio día, durante 30 minutos antes y después del cenit solar, con el fin de aprovechar al máximo la ventana de luz directa. De esta medición se obtuvo la capacidad real de separación de carga en el PSII respecto a la cantidad de fotones incidentes ( $\Delta F/F_m'$  a medio día). La segunda medición se realizó cercano el anochecer (cuando la mayor parte de los centros de reacción se encuentran abiertos). De esta se obtuvo la capacidad potencial de separación de carga en el PSII ( $F_v/F_m$ ). Los valores de  $F_v/F_m$  (promedio  $\pm$  desviación estándar) para *P. verrucosa* fueron  $0.59 \pm 0.056$   $n = 61$  y para *P. gigantea* fueron  $0.629 \pm 0.047$   $n =$

\* Por sus siglas en inglés.

39. Los dos cocientes se sustituyeron en la siguiente fórmula para obtener el valor de  $Q_m$  para cada tipo de alga de las dos especies de holosimbiontes (Iglesias-Prieto, *et al.*, 2002):

$$Q_m = 1 - [(\Delta F/F_m \text{ a medio día}) / (F_v/F_m)]$$

Donde:

$Q_m$  = Presión máxima sobre el fotosistema II (unidades relativas).

$\Delta F/F_m \text{ a medio día}$  = capacidad real de separación de carga en el PSII respecto a la cantidad de fotones incidentes mediada en el cenit solar, y esta se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\Delta F/F_m = (F_m - F_s)/F_m$$

Donde:

$F_m$  = Fluorescencia máxima en muestras aclimatadas a la luz ambiente.

$F_s$  = Fluorescencia sostenida de la clorofila en muestras aclimatadas a la luz ambiente.

$F_v/F_m$  = Capacidad potencial de separación de carga en el PSII tomada al atardecer, calculada a partir de:

$F_v = F_m - F_0$ . Fluorescencia variable en muestras aclimatadas a la obscuridad (adimensional).

$F_m$  = Rendimiento máximo de fluorescencia de la clorofila en muestras aclimatadas a la obscuridad.

$F_0$  = Rendimiento mínimo de la fluorescencia de la clorofila en muestras aclimatadas a la obscuridad.

Para la obtención de  $F_0$ , el coral se expuso a pulsos débiles de luz roja ( $<1 \mu \text{ mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Para la obtención de  $F_m$ , el coral recibió un pulso saturante de luz blanca ( $>3000 \mu \text{ mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Dado que los simbiotes se desarrollan en un espacio confinado su tasa de reproducción es muy baja en comparación con otros organismos fotosintéticos de vida libre (Muscatine *et al.*, 1989). En los organismos de vida libre la tasa de reproducción va a depender de la cantidad de carbono fijado por fotosíntesis menos los costos de mantenimiento propios. En los dinoflagelados simbiotes este carbono utilizado para crear nueva biomasa es trasladado hacia el hospedero el cual a su vez lo ocupa como sustrato respirable. De esta manera la cantidad de fotosintetatos trasladados hacia el hospedero va a depender de la cantidad de carbono fijado menos los costos de mantenimiento propios del simbiote.

El valor de desempeño empleado en este trabajo va de cero a uno, en los extremos el organismo se encuentra en estrés metabólico, por un lado, con valores cercanos a uno es tal la presión de excitación que se ejerce sobre el PSII que el superávit de carbono que anteriormente era trasladado al hospedero ahora es ocupado para los costos de mantenimiento propios que incluyen síntesis *de novo* de proteínas dañadas y mecanismos de fotoprotección. Por otro lado, cuando la presión máxima es cercana a cero, implica que la cantidad de luz que recibe el aparato fotosintético es insuficiente para fijar carbono requerido para los costos de mantenimientos propios, de modo que no existe una traslocación de fotosintetatos hacia el hospedero. En ambos casos

extremos la asociación tiende a colapsarse dada la dependencia nutricional del hospedero hacia estos fotosintetatos trasladados.

A los datos de presión por profundidad para cada especie de coral se le aplicó un análisis de regresión lineal teniendo a la profundidad e irradiancia como variables independientes.

### II.3 TRABAJO DE LABORATORIO.

El trabajo de laboratorio consistió en el análisis de pigmentos y de las posibles diferencias a nivel genético así como la comprobación del grado de especificidad en los trasplantes que ayudaran a comprender de manera mas integrativa las diferencias encontradas en el desempeño fotofisiológico, medido como  $Q_m$ .

#### II.3.1 Aislamiento y preservación de los simbioses.

Para el aislamiento de los simbioses cada fragmento de colonia se limpió de epibiontes y se lavó ligeramente con agua deionizada para eliminar el mucus, y preservador (en algunas pruebas hechas con organismos vivos esto favoreció la descarga de los nematocistos) El tejido del hospedero se separó del esqueleto calcáreo por chorros a presión de una solución de agua de mar filtrada (0.8  $\mu$ m) con 5 mM EDTA. El tejido animal y simbioses se filtraron con una gasa estéril para tratar de eliminar los fragmentos mas grandes de esqueleto y de tejido animal. Esta mezcla se pasó por un homogenizador celular (Pyrex No. 7727-15) y las microalgas fueron separados por centrifugación (3500 r.p.m. por 5 min.). La pastilla celular se resuspendió en una mezcla del mismo buffer de extracción de simbioses con la adición de Triton X-100 a una concentración final de 0.01%, esto con el fin de tratar de disolver las membranas celulares del hospedero. Esta mezcla se agitó vigorosamente por vórtex durante 2 min. y vuelto a centrifugar (3000 r.p.m. por 5 min.). La pastilla se resuspendió en el buffer de extracción de simbioses y se agitó para eliminar el exceso de Triton X-100. Este proceso se repitió una vez más para terminar de lavar las células. El pellet celular se resuspendió en 3 volúmenes de buffer salino de preservación (20% DMSO, 0.25M EDTA y NaCl saturado) y se mantuvo a temperatura ambiente con poca luz, mientras que para las muestras de coral que solo habían sido congeladas, el procedimiento de extracción de simbioses fue el mismo con la variante final que las células se resuspendieron en 3 volúmenes de buffer de extracción de simbioses y se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

#### II.3.2 Determinación de cantidad de clorofila a por célula.

Se determinó la cantidad de clorofila a de las algas simbióticas normalizada por célula a lo largo del gradiente vertical de distribución de las muestras de sus respectivos hospederos siguiendo la metodología de Iglesias-Prieto *et al.*, (1992) Al concentrado celular congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$  se le tomó 100  $\mu$ L para determinar cantidad de pigmento y 10  $\mu$ L para hacer los conteos celulares, previo a tomar las submuestras se homogeneizó por vórtex cada tubo por espacio de 40

seg. Para los conteos, el volúmen celular se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se agitaron por vórtex por 1 min., se tomó 1  $\mu\text{L}$  para hacer los conteos celulares en un hematocitómetro por triplicado. Para la determinación de pigmentos, las células se lavaron con agua deionizada, se resuspendieron en 1 ml de acetona 100% fría a 4°C, y se agitaron por vórtex aproximadamente 1 min., hecho esto se centrifugó a 8000 r.p.m. por 10 seg. y el sobrenadante se recuperó. A la pastilla celular se le agregó 50  $\mu\text{L}$  de DMSO y se agitó por vórtex, después se le agregó el sobrenadante de la centrifugación anterior (acetona + pigmentos), y esta mezcla se dejó reposar toda la noche en tubos cubiertos de la luz a -20°C. Las lecturas de espectrofotometría se realizaron en un AMINCO DW-2C, y la cantidad de clorofila *a* [ $\text{Chl}a$  *a*] =  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , fue determinada con base en la fórmula (Jeffrey y Humphrey, 1975):

$$[\text{Chl}a\ a] = (11.43 * (\text{Abs } 663 - \text{Abs } 750)) - (0.64 * (\text{Abs } 630 - \text{Abs } 750))$$

Cada valor de concentración de clorofila fue dividido entre el número total de células con el fin de obtener la cantidad normalizada de pigmento por célula. Estos datos ya normalizados se correlacionaron contra la profundidad de cada muestra.

### II.3.3 Taxonomía molecular (aislamiento del DNA total; amplificación por PCR de los marcadores SSUrRNA, ITS, e ITS2; RFLP de SSUrRNA; DGGE de ITS2, y análisis de secuencias de 5.8S).

La extracción de DNA se hizo siguiendo el método descrito por Rowan y Powers (1991a, 1992) con algunas modificaciones. De cada preparación de simbiontes preservados en DMSO se realizaron extracciones de DNA total a partir de fractura con nitrógeno líquido de aproximadamente 100  $\mu\text{L}$  de concentrado celular el cual fue previamente lavado dos veces con agua deionizada para evitar la interferencia del preservador. El pellet de células lavadas se resuspendió en 100-150  $\mu\text{L}$  de DNAB [0.4 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8.0] y se homogenizó por pipeteo. Las células se virtieron gota por gota en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido para ser pulverizadas. El polvo resultante se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  de DNAB con SDS al 1% e incubado a 65°C por una hora. Posteriormente se incubó a 37-40°C con la adición de Proteinasa K (Sigma) a una concentración final de [0.5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ] por 6 horas en constante agitación (150-200 r.p.m.), concluido este paso se incubó a 65°C por una hora con la adición de NaCl a una concentración final de 0.8 M, 20 $\mu\text{g}$  de tRNA (el cual funcionaba como acarreador de DNA), y 1% de CTAB (Aldrich Co) invirtiendo los tubos tres o cuatro veces durante el proceso. La extracción de los ácidos nucleicos se hizo agregando igual volúmen de muestra y solventes orgánicos con una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Esta mezcla se agitó a 250 r.p.m. por 15 min. y al término se centrifugó a 10000 r.p.m. por 10 min. Del paso anterior sólo se tomó la parte acuosa con puntas de orificio amplio y vuelta a reextraer lo cual ayudó a la correcta desproteinización. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo con igual volúmen de cloroformo para eliminar las trazas

de fenol y se reextrajo por agitación y centrifugación descritas anteriormente. La fase no orgánica se transfirió a otro tubo con 2 volúmenes de etanol 100% y 0.1 volúmenes de 3 M de acetato de sodio. Esta mezcla se dejaba toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se centrifugó a 10000 r.p.m. por 15 min y el sobrenadante se desechó. La pastilla de DNA resultante se lavó con 600  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% (10000 r.p.m. por 2 min). Una vez lavado se resuspendió en 50 o 100  $\mu\text{L}$  de TE pH 8.0 (10 mM TrisCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) precalentado a  $65^{\circ}\text{C}$  para facilitar la disolución del DNA. Esta mezcla se dejó disolver por lo menos una hora, después de lo cual se utilizaba para *amplificación por PCR o mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.*

El DNA total se evaluó por electroforésis en geles de agarosa al 1% con una concentración final de bromuro de etidio de [0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ], a un voltaje constante de 70 V., y dependiendo del peso (preferentemente se seleccionaba material de alto peso molecular) y estructura de la banda (se buscaba material que no estuviese degradado) la extracción fue elegida para amplificar por PCR las regiones del genoma de interés de los simbiontes. Un segundo criterio que se utilizó para conocer la concentración de DNA de una muestra, fue a partir de espectrofotometría, mediante la técnica descrita por Maniatis *et al.*, (1989), en la cual se leía una dilución de 1:1000 (DNA : blanco) a 260, y 280 nm. Conociendo que 1.0 de densidad óptica (D.O.) es aproximadamente igual a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de DNA de doble hebra, se obtuvo la concentración de la lectura de absorbancia a 260 nm y la pureza con la razón de Abs 260/ Abs 280.

En el presente estudio se utilizaron tres marcadores genéticos (SSUrRNA, 5.8S, e ITS2) para diferenciar a los grupos de simbiontes.

En el caso de la amplificación de 18S (SSUrRNA) para evitar la contaminación de DNA del hospedero se utilizaron primers internos que hibridaban en regiones altamente conservadas entre dinoflagelados simbiontes, esto gracias a que esta molécula posee dominos variables conservados entre taxa filogenéticamente relacionados (Sogin *et al.*, 1986)

El gen SSUrRNA fue amplificado por PCR siguiendo los siguientes criterios: aproximadamente de 100 a 200 ng de DNA total se añadieron a una mezcla fría a  $4^{\circ}\text{C}$  conteniendo: 200  $\mu\text{M}$  de dNTP's; 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 0.4  $\mu\text{M}$  del primer SS3Z-B (5'-AGCACTGCGT CAGTCCGAATAATTCACCGG-3'), 0.68  $\mu\text{M}$  de una mezcla equimolar de dos primers SS5Z-B1, (5'-GCAGTTATAATTTATTTGATGGTCACTGCTAC-3'), y SS5Z-B2 (5'-GCAGTTATAGTTTATTT GATGGTTGCTGCTAC-3'), (Rowan y Powers, 1991a); 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 a 3 unidades de *Taq* DNA polimeraza recombinante (GibcoBRL Life Technologies), y el resto de agua estéril deionizada, para un volumen total por tubo de 25 ó 50  $\mu\text{L}$  de reacción. Esta mezcla se incubó en el termociclador (Perkin Elmer 2400) bajo el siguiente perfil "touchdown" (Don *et al.*, 1991) de amplificación con el fin de asegurar especificidad: empezando con una incubación a  $95^{\circ}\text{C}$  por 3:30 min., seguido por 18 ciclos [desnaturalización a  $94.0^{\circ}\text{C}$  por 0:40 seg; alineamiento a  $57.0^{\circ}\text{C}$  por 0:50 seg; y polimerización a  $72.0^{\circ}\text{C}$  por 1:30 min] con una disminución de  $0.5^{\circ}\text{C}$  cada ciclo en la temperatura de alineamiento, y 19 ciclos [desnaturalización a  $94.0^{\circ}\text{C}$  por 0:40 seg;

alineamiento a 57.0°C por 0:50 seg; y polimerización a 72.0°C por 1:30 min.] donde se mantuvo constante la temperatura de alineamiento. Por último, un período de 10 min a 72°C para asegurar la extensión final de todos los fragmentos. Posterior a esto se tomó una muestra del producto de amplificación (5 µL) y se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y dependiendo de la calidad de la amplificación (alta concentración y/o presencia de bandas extra), y correspondencia con el tamaño (≈1635 pares de bases), el amplicón se purificó del gel (CONCERT gel purification system) según el protocolo del fabricante, o directamente se digirió con endonucleasas para obtener la identidad filética del simbionte, como se describe posteriormente.

Para la amplificación de las regiones ITS junto con el gen 5.8S por PCR se siguieron los siguientes criterios: aproximadamente de 100 a 200 ng de DNA total se añadieron a una mezcla fría a 4°C conteniendo: 200 µM de DNTP's, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.4 µM del primer ITSA (5'-GGGATCCGTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3'), 0.4 µM del primer ITSB, (5'-GGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'), (Coleman *et al.*, 1994 ), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 a 3 unidades de *Taq* DNA polimeraza recombinante (GibcoBRL Life Technologies), y el resto de agua estéril deionizada para un volumen total por tubo de 25 ó 50 µL de reacción. Esta mezcla se incubó en el termociclador (Perkin Elmer 2400) bajo el siguiente perfil: un período previo de incubación a 95.0°C por 3:30 min., seguido de 35 ciclos con temperatura de desnaturalización de 94°C por 40 seg.; alineamiento de los primers a 50°C por 1:00 min. y polimerización a 72°C por 2 min. Al término de estos 35 ciclos se dejó incubar la reacción por 10 min. a 72°C para asegurar la extensión final de todos los fragmentos. El amplicón se evaluó por electroforesis en agarosa al 1.0%, esperando productos de ≈ 650 pares de bases. En todos los casos fue necesario purificar la banda de interés del gel (CONCERT gel purification system) según el protocolo del fabricante.

Para la amplificación de la región interna espaciadora II (ITS2) por PCR se siguieron los siguientes criterios: aproximadamente de 100 a 200 ng de DNA total se añadieron a una mezcla fría a 4°C conteniendo: 200 µM de DNTP's; 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0.4 µM del primer ITSint-for2 (5'-GAATTGCAGAACTCCGTG-3'), 0.4 µM del primer ITS2CLAMP (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGGGATCCATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'), (Sheffield *et al.*, 1989), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 a 3 unidades de *Taq* DNA polimeraza recombinante (GibcoBRL Life Technologies) y el resto de agua estéril deionizada para un volumen total por tubo de 25 o 50µL de reacción. Esta mezcla se incubó en el termociclador (Perkin Elmer 2400) bajo el siguiente perfil "touchdown" de amplificación con el fin de asegurar especificidad (Don *et al.*, 1991): empezando con una incubación a 95°C por 3:30 min., seguido por 20 ciclos [desnaturalización a 94.0°C por 0:45 seg; alineamiento a 60 0°C por 0:40 seg.; y polimerización a 72.0°C por 0:30 seg ] con una disminución de 0.5°C cada ciclo en la temperatura de alineamiento, y 15 ciclos [desnaturalización a 94.0°C por 0:45 seg.; alineamiento a 50.0°C por 0:40 seg ; y polimerización a 72.0°C por 0:30 seg.] donde se mantuvo constante la temperatura de

alineamiento. Por último, un período de 10 min. a 72°C para asegurar la extensión final de todos los fragmentos. El producto se evaluó por electroforesis de agarosa al 1.3% teñidos con bromuro de etidio, esperando observar una banda (a 340 nm) de  $\approx$  330-360 pares de bases. Para esta región no hubo necesidad de purificación del fragmento, y en su lugar se obtuvo suficiente concentración de DNA amplificado para ser separado por electroforesis en un gradiente desnaturizante (DGGE) con el fin de identificar la posición a nivel de subclade de los simbioses.

La identificación de los simbioses a nivel clado se hizo mediante el análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En este caso se tomó aproximadamente 500 ng del amplicon del gen 18S (SSUrRNA) y se digirió a 65°C con aproximadamente 2  $\mu$ L (20 unidades) de la endonucleasa *Taq1* (Gibco BRL Life Technologies) por espacio de 6 h. Los fragmentos resultantes se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5% teñidos con bromuro de etidio, junto con un control de pesos moleculares y digestiones de organismos a los cuales ya se tiene identificado su patrón de bandeo por literatura. Hecho esto, se fotografió el patrón de bandas para ser comparadas con los resultados de la bibliografía existente (Rowan y Powers 1991a; Rowan y Knowlton, 1995; Baker y Rowan, 1997).

Para la identificación a nivel subclade (presumiblemente a nivel especie, *sensu* LaJeunesse, 2001) se empleó la técnica de separación de productos de PCR de ITS2 por electroforesis en un gradiente desnaturizante (DGGE). Esta técnica se basa en la migración diferencial de una molécula de DNA parcialmente desnaturizada por temperatura y agentes químicos, y es capaz de distinguir un par de diferencia entre fragmentos que se presumen iguales (Myers *et al.*, 1985). Este criterio ha sido utilizado con anterioridad para diferenciar taxa que se presumen estrechamente relacionados a niveles de variación intergenómica en loci parálogos (Buckler *et al.*, 1997). En este caso, aproximadamente 20  $\mu$ L de reacción de PCR fueron cargados en cada pozo junto con buffer de cargado de Ficol al 2% (Ficol-400 2%, 10 mM Tris HCl, pH 7.8, 1 mM EDTA, 1% de azul de bromofenol) en un gel de 8% de acrilamida con un gradiente desnaturizante del 40 al 75%, el 100% consistía de 7 M de urea, y 40% de formamida. Las electroforesis transcurrieron por espacio de 11 a 14 horas a 90 V con temperatura constante de 60°C. Al término de la prueba, el gel era teñido en una solución de 1X TAE y 5-10  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio por espacio de 15 min, al término se eliminó el exceso con lavados en agua deionizada y el gel era observado bajo luz UV y fotografiado.

El análisis filogenético fue hecho a partir de secuencias de la región completa del gen 5.8S de 17 dinoflagelados (Tabla 1), cuatro de los cuales pertenecen al presente estudio.

Para la obtención de las secuencias, los productos de PCR de la región entera ITS fueron purificados y directamente secuenciados por el método dideoxy (Sanger *et al.*, 1977) tanto para la cadena normal como para la complementaria en un equipo ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems).

Tabla 1. Base de reconocimiento de las secuencias y del filotipo al que pertenecen los simbioses actualmente aislados y clave asignada para comparar las secuencias del gen 5.8S. N. A = no aplica.

Hospedero	Simbionte	Clave de acceso	Filotipo	Referencia
<b>Phylum Cnidaria</b>				
<b>Clase Scyphozoa</b>				
<i>Cassiopea xamachana</i>	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	AF333505	A1	(LaJeunesse, 2001)
<i>Linuche unguiculata</i>	<i>Gymnodinium linucheae</i>	AF333509	A4	(LaJeunesse, 2001)
<b>Clase Zoanthidea</b>				
<i>Zoanthus sociatus</i>	<i>Symbiodinium pilosum</i>	AF333506	A2	(LaJeunesse, 2001)
<i>Anthopleura elegantissima</i>	<i>Symbiodinium californium</i>	AF334659	E	(LaJeunesse, 2001)
<i>Anthopleura elegantissima</i>	<i>Symbiodinium muscatinei</i>	AF333510	B4	(LaJeunesse, 2001)
<b>Clase Escleractinia</b>				
<i>Pocillopora verrucosa</i> . (1.5m)	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF411415	D1	Presente estudio
<i>Pocillopora verrucosa</i> (3.5m)	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF411415	D1	Presente estudio
<i>Pavona gigantea</i> (7m)	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF411414	C	Presente estudio
<i>Pavona gigantea</i> (7.5m)	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF411413	C	Presente estudio
<i>Montastrea annularis</i>	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF334660	D1	(LaJeunesse, 2001)
<i>Meandrina meandrites</i>	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF333516	F	(LaJeunesse, 2001)
<i>Porites porites</i>	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF180129	C	(Hunter <i>et al.</i> , 1997)
<i>Porites lobata</i>	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF180127	C	(Hunter <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pocillopora damicornis</i>	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF180124	B	(Hunter <i>et al.</i> , 1997)
<i>Heliopora actiniformis</i>	<i>Symbiodinium</i> sp.	AF038914	C	(Takabayashi <i>et al.</i> , 1998)
<i>Montipora verrucosa</i>	<i>Symbiodinium kawagutii</i>	AF333517	F	(LaJeunesse, 2001)
Vida libre	<i>Gymnodinium</i> sp.	AF201747	N A	(Baillie <i>et al.</i> , 2000)

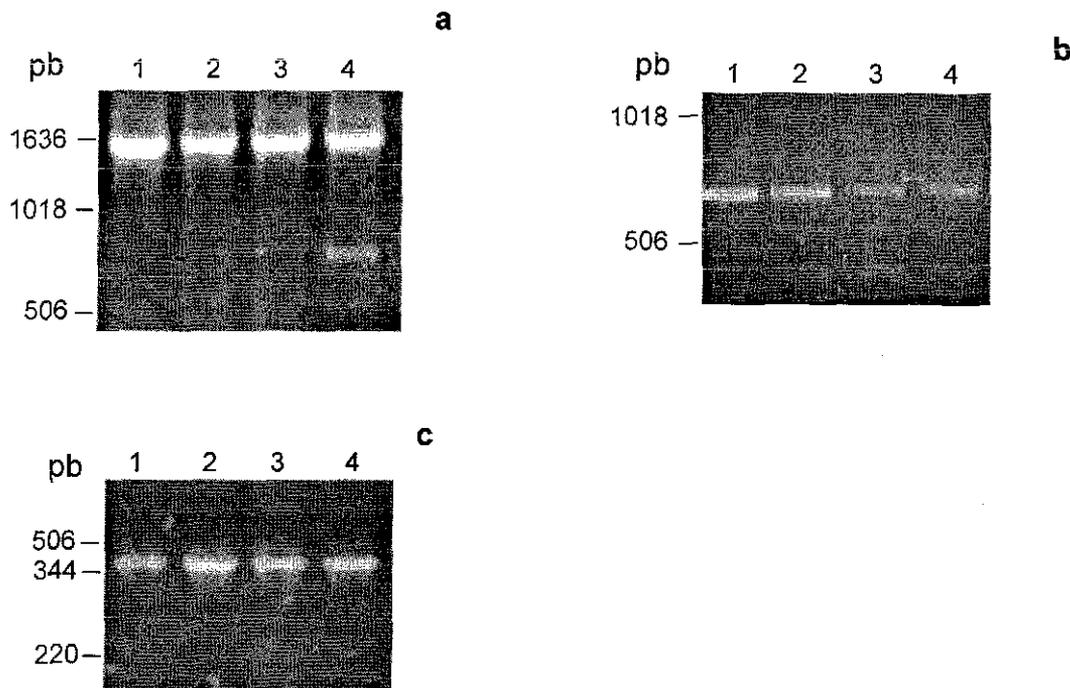
Las secuencias obtenidas en este estudio y las de otros organismos simbióticos fueron alineadas utilizando CLUSTAL W 1.4 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), siguiendo todos los atributos por omisión (Thompson *et al.*, 1994). Para las comparaciones filogenéticas se utilizó sólo la región entera del gen 5.8S cuyos límites fueron determinados por inspección ocular del alineamiento (Todd C. LaJeunesse, University of Georgia *com pers*). Estas comparaciones se hicieron con el paquete computacional MEGA 2.1 (<http://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.*, 2001) con el método de Kimura dos-parámetros para el cálculo de las distancias entre secuencias y 'neighbor-joining' (Saitou y Nei, 1987) para la construcción del árbol filogenético, utilizando 500 réplicas de remuestreo para el soporte relativo en cada ramificación (Felsenstein, 1985).

### III. Resultados.

#### III.1 Taxonomía molecular.

##### III.1.1 Comparación del tamaño de los marcadores genéticos utilizados para diferenciar a los simbios.

Las reacciones de PCR de SSUrRNA de los simbios de *P. verrucosa* y *P. gigantea* produjeron amplicones de aproximadamente 1.6 kb aunque en algunos casos se produjo una banda extra sólo en las amplificaciones de las algas de *P. verrucosa* (de aproximadamente 600 pb la cual ha sido descrita antes por Rowan y Powers (1991a) pero que no interfería con la reacción de RFLP (Fig. 2a, carril 4). Los amplicones de la región entera de ITS de los dinoflagelados simbios mostró consistencia en el tamaño (aprox. 630 pb) para ambas especies de hospederos (Fig. 2b), en este caso no se observó amplificación de productos de otro tamaño. El tercer marcador utilizado para diferenciar a los simbios fue la región ITS-2 la cual según los productos de PCR fueron de aproximadamente 340 pb (Fig. 2c). Los tamaños de los tres marcadores utilizados fueron constantes tanto interespecíficamente como intraespecíficamente a lo largo de la distribución vertical del hospedero. Las tres figuras muestran resultados típicos (n = 26).



**Figura 2.** Tamaño aparente de los tres marcadores genéticos (a) SSUrRNA, (b) ITS, y (c) ITS-2 amplificados por PCR. a) SSUrRNA de *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) de 7, y 10 m (carriles 1 y 2), y (*P. verrucosa*) de 3, y 6 m (carriles 3 y 4); b) ITS de *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) de 7 y 10 m (carriles 1 y 2), y (*P. verrucosa*) de 3, y 6 m (carriles 3 y 4); c) ITS-2 de *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) de 7 y 10 m (carriles 1 y 2), y (*P. verrucosa*) de 3 y 6 m (carriles 3 y 4).

### III.1.2 Análisis de RFLP de SSUrRNA de los dinoflagelados simbiotes.

Los patrones de digestión con *Taq* 1 de la región SSUrRNA de los simbiotes de los 30 corales hermatípicos (incluyendo los trasplantes) analizados mostraron tres genotipos distintos. Los simbiotes de *P. gigantea* presentaron un solo patrón de bandeo (0.9 + 0.7 kb) correspondiente al filotipo C (Fig. 3a, carril 3, Fig. 3b, carriles 6, 7). Este mismo patrón se conservó en los trasplantes que permanecieron por espacio de un año fuera de su rango original de distribución lo que confirma la alta especificidad de la asociación (Fig. 3b, carriles 3-5). En el caso de los simbiotes de *P. verrucosa* presentaron dos patrones de bandeo (0.7 + 0.7 + 0.2, y 0.9 + 0.7 + 0.6 + 0.3 kb) característicos del recientemente descrito filotipo D (Fig. 3a, carriles 4, 5 y Fig. 3b carriles 8, 9). Este polimorfismo no presentó una tendencia clara respecto a la profundidad, siendo el patrón de bandeo de los carriles 4 (Fig. 3a) y 9 (Fig. 3b) predominante en la mayoría de las muestras (n = 13). El caso del patrón de bandeo del carril 10 (Fig. 3b) es producto de la digestión de un amplicón clonado en bacterias demostrando la posibilidad de la existencia de mas de una forma de este gen por individuo.

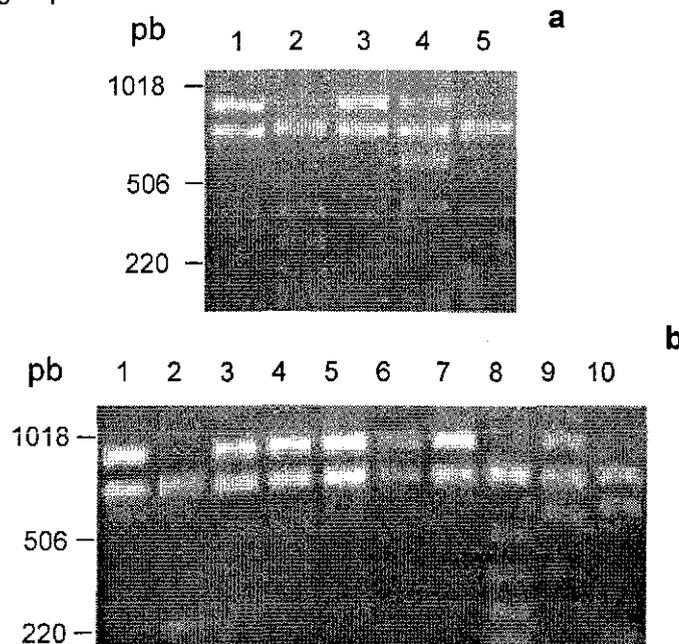
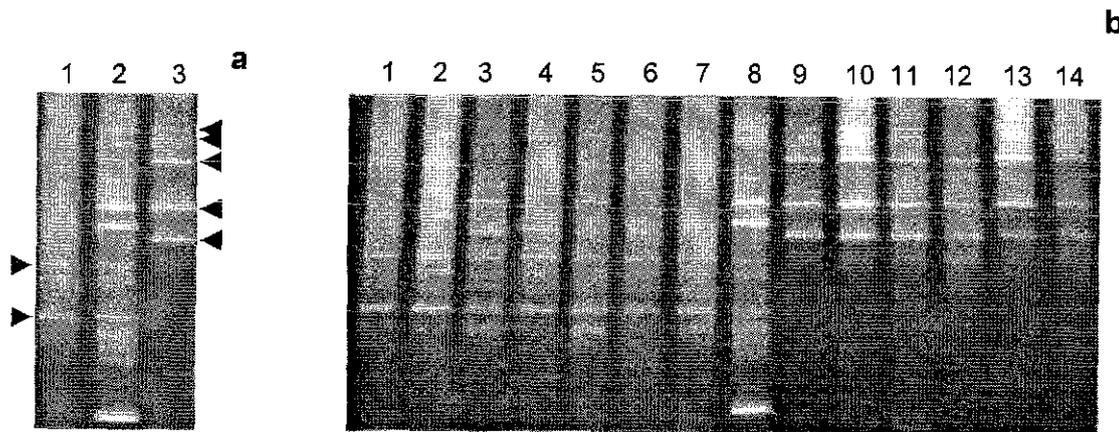


Figura 3. Análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de SSUrRNA con *Taq* 1 de dinoflagelados simbiotes. **a)** Resultados típicos, n = 26. Carriles: **1, 2)** Estándares con patrón de bandeo conocido por literatura, *S. kawagutii* (*M. verrucosa*). Filotipo C, y *Symbiodinium* sp. (*M. annularis*). Filotipo D1 respectivamente, **3)** *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) 5 m Filotipo C; **4, 5)** *Symbiodinium* sp. (*P. verrucosa*) 3 y 6 m, respectivamente. Filotipo D. **b)** Comparación de los trasplantes y sin transplantar. Carriles: **1, 2)** Estándares con patrón de bandeo conocido por literatura, *S. kawagutii* (*M. verrucosa*). Filotipo C; y *Symbiodinium* sp. (*M. annularis*) Filotipo D1, respectivamente; **3- 5)** *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) Trasplantes de 10 a 3 m, después de un año Filotipo C; **6, 7)** *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) creciendo a 1.5 y 9 m, respectivamente Filotipo C; **8, 9)** *Symbiodinium* sp. (*P. verrucosa*) creciendo a 1 y 6 m, respectivamente Filotipo D, **10)** *Symbiodinium* sp. (*P. verrucosa*) creciendo a 3 m. Filotipo D. Clonada.

### III.1.3 Análisis de DGGE de ITS-2 de los dinoflagelados simbios.

La prueba de electroforesis DGGE de la región ITS2 se ha utilizado para evaluar la identidad genética de los simbios a un nivel de resolución próximo al de especie, y para detectar posibles poblaciones polimórficas (LaJeunesse y Trench, 2000; LaJeunesse, 2001). Los simbios de ambas especies de corales presentaron diferentes patrones de bandeo. Las algas de *P. verrucosa* exhibieron dos bandas principales (Fig 4a, carril 1) que migraron mas en comparación con la firma dejada por las algas de *P. gigantea* que consistió en cinco bandas principales (Fig 4a, carril 3) con menor longitud de migración y menor espacio entre ellas. Dichas firmas al ser comparadas con un patrón de bandeo conocido corresponden a las subclades descritas con anterioridad como D1 y C (no descrito), respectivamente. (Fig 4a, carril 2). Este mismo patrón de bandeo se conservó en todo el gradiente de distribución vertical de cada especie de hospedero (Fig. 4b carriles 1 - 7 y 9 - 14 para *P. verrucosa*, y *P. gigantea* respectivamente), salvo algunas bandas extra no asociadas con la profundidad, en los individuos de *P. verrucosa* (Fig. 4b, carriles 3 - 5). Estas variaciones son consideradas como normales dentro de una población, o podrían deberse a conformaciones secundarias del amplicón. Un transplante de *P. gigantea* de 10 a 3 m que sobrevivió por 2 años conservó la firma característica de aquellos individuos sin transplantar (Fig. 4b, carril 9).



**Figura 4.** Comparación de los perfiles de DGGE de la región ITS-2 de las algas simbios de ambas especies de corales. **a)** Identificación de la firma de cada subclade. Carriles: 1) *Symbiodinium* sp. (*P. verrucosa*) colectado de 7 m, subclade D1; 2) marcador hecho con una mezcla de cantidades iguales de producto de PCR de algas pertenecientes a las subclades C1, A3, D1, y B1; 3) *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) transplante de 10 a 3 m después de 22 meses, subclade C no descrita. Se marcan con flechas las bandas que caracterizan a cada subclade. **b)** Reconstrucción de la zonación vertical de ambas especies. Carriles. 1-7) *Symbiodinium* sp. (*P. verrucosa*) colectado de 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 3.0, 3.6, y 7.0 m de profundidad respectivamente. 8) marcador como en la Fig. 4a; 9) *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) transplante de 10 a 3 m; 10-14) *Symbiodinium* sp. (*P. gigantea*) colectado de 7.0, 7.0, 7.5, 8.0 y 12 m de profundidad respectivamente. (Iglesias-Prieto *et al.*, 2002)

### III.1.4 Posición filética de los simbioses a partir del gen 5.8S.

El gen 5.8S mostró tener un tamaño aproximado de  $160 \pm 4$  nucleótidos. Estas diferencias de tamaño son consistentes entre secuencias de organismos emparentados (Fig 5). De hecho el ordenamiento de los taxa fue hecho posterior al análisis filogenético para maximizar las diferencias y similitudes existentes entre filotipos distintos.

El alineamiento mostró que existen posibles zonas informativas dentro de estas secuencias las cuales ayudan a identificar las afinidades entre filotipos cercanamente emparentados como es el caso de los filotipos E y D en la posición 100, y los filotipos C y F a la altura del nucleótido 112. Por otro lado existieron zonas de la secuencia que solo mostraron similitudes entre los organismos que pertenecen a un filotipo y carecen de similitud con otros como es el caso de los taxa pertenecientes al filotipo D a la altura de los nucleótidos 91, 144, y 157-164. Para los simbioses de *P. gigantea* y *H. actiniformis* en los nucleótidos 158 y 159 comparten similitud. Por último, a la altura del nucleótido 5, los individuos pertenecientes al filotipo A comparten esta posición.

En la reconstrucción filogenética hecha a partir del gen 5.8S de los dinoflagelados simbioses (Fig. 6) se observa una clara distinción de los filotipos descritos recientemente (LaJeunesse, 2001). En el encontramos al filotipo A como grupo ancestral a los demás. Los simbioses de *P. verrucosa* se agruparon fuertemente con sus similares de *M. annularis* en el filotipo D recientemente descrito. Como grupo hermano se encuentra *S. californium* perteneciente al filotipo E. Los simbioses de *P. gigantea* se agrupan con sus similares dentro del filotipo C que en este árbol aparece como el más diverso.

La topología del árbol filogenético basada en el método de "Neighbor-Joining" y verificado por remuestreo para evaluar el soporte relativo de cada ramificación, muestra congruencia con la información obtenida de otros marcadores ribosomales como son el SSUrRNA y LSUrRNA (Rowan y Powers, 1991a; Baker y Rowan 1997). Sin embargo como en el caso de los marcadores ribosomales altamente conservados no son capaces de evidenciar diferencias entre taxa estrechamente emparentados como es el caso de los pertenecientes al filotipo A en donde encontramos tres especies descritas, pero que este marcador no alcanza a detectar.

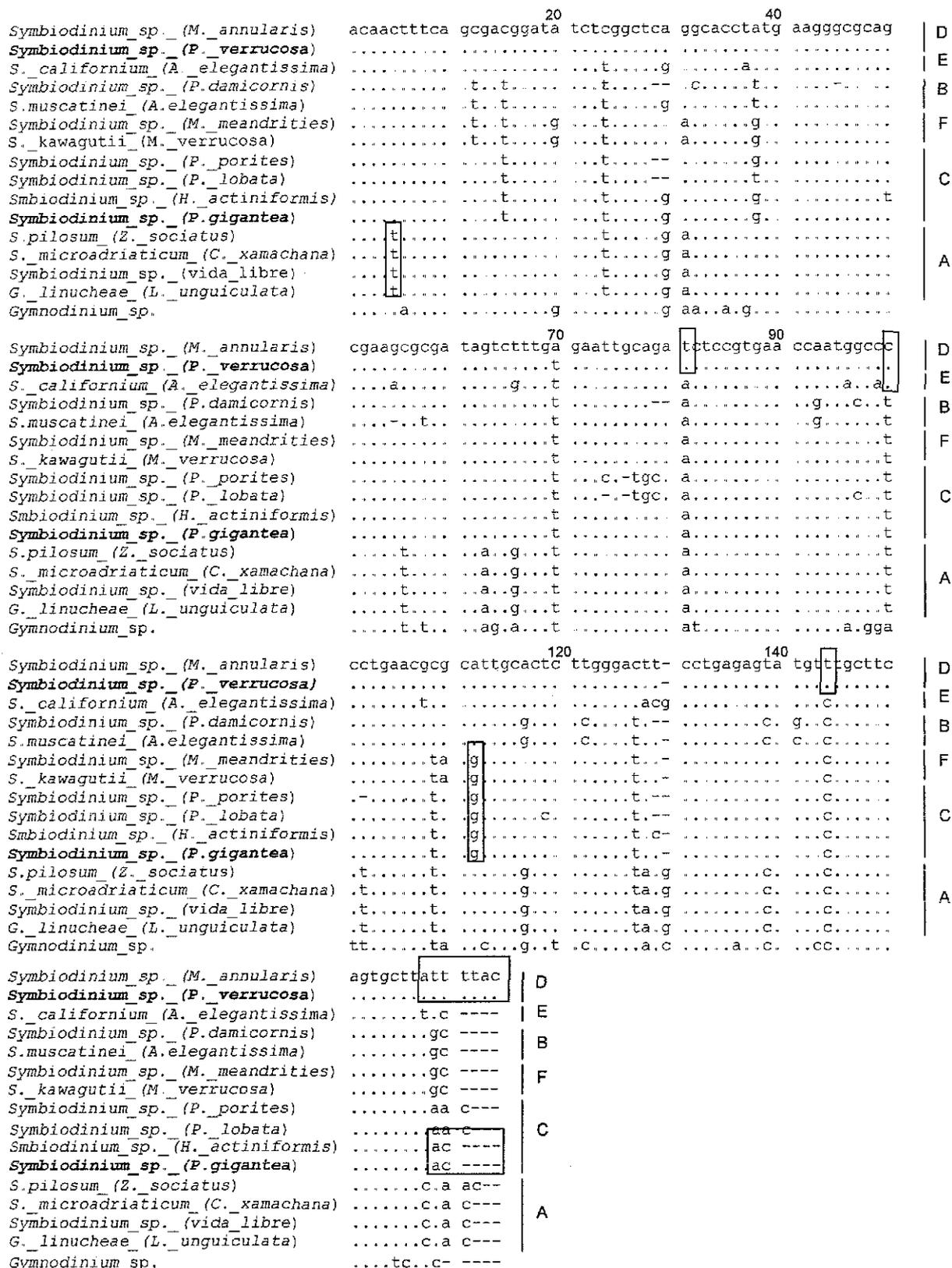
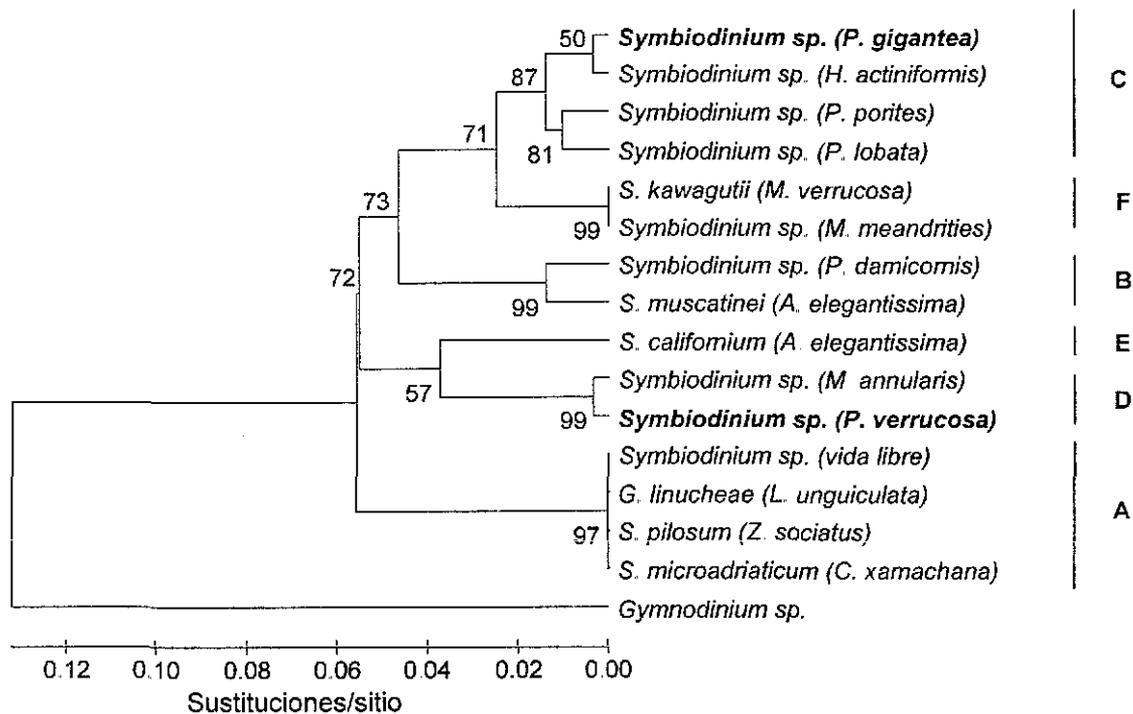


Figura 5. Alineamiento de las secuencias del gen 5.8S de los diferentes dinoflagelados simbioses. Sitios idénticos = . ; sitios ambiguos = N; inserciones = -. En negritas los organismos investigados en este estudio. La longitud del fragmento se encuentra sobre la primera secuencia. Al final de cada línea se marca el filotipo del simbionte. Los recuadros representan los sitios informativos.



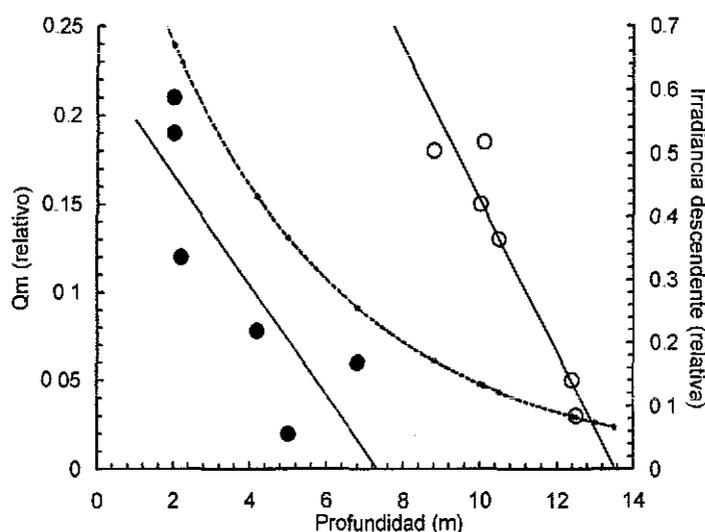
**Figura 6.** Reconstrucción filogenética de dinoflagelados simbiotes, hecha a partir de secuencias del gen 5.8S. El método de distancias empleado fue el de Kimura 2-parametros, y el algoritmo para la construcción del árbol fue el de "Neighbor-joining" con 500 réplicas de remuestreo para validar el soporte de cada ramificación. El número de sitios comparados fue de 148, y se ignoraron sitios ambiguos. Los nombres en negritas corresponden a los organismos tratados en este estudio. Los números arriba de cada ramificación son las consistencias de remuestreo (bootstrap) que soporta cada ramificación. (Iglesias-Prieto *et al.*, 2002)

## III.2 Fotofisiología.

### III.2.1 Análisis de los datos de $Q_m$ con muestras relajadas en la obscuridad.

Los datos de  $Q_m$  con un minuto de adaptación a la obscuridad, tomados *in situ* de los dinoflagelados de ambas especies de holosimbiontes, muestran una tendencia lineal negativa respecto a la profundidad (Fig. 7). El modelo de regresión aplicado a cada grupo de datos fue significativo ( $r^2 = 0.673$ ,  $P = 0.014$ , y  $r^2 = 0.901$ ,  $P = 0.003$  para *P. verrucosa* y *P. gigantea*, respectivamente). De igual forma el punto de ordenada al origen entre ambos modelos resultó significativamente distinto ( $0.273 \pm 0.040$  y  $0.638 \pm 0.085$  para *P. verrucosa* y *P. gigantea* respectivamente), indicativo de que la respuesta de los simbiosntes de cada especie de coral es distinta frente a variaciones de luz de orden exponencial (eje de abscisas secundario) dependientes de la profundidad. Esta diferencia implica que las algas de *P. gigantea* se encontrarían, según la predicción del modelo, en un constante estrés metabólico en profundidades someras, mientras que sus similares en *P. verrucosa* no. La intercepción de las líneas de regresión con el eje de la profundidad corresponden con el límite de distribución vertical de cada especie de coral.

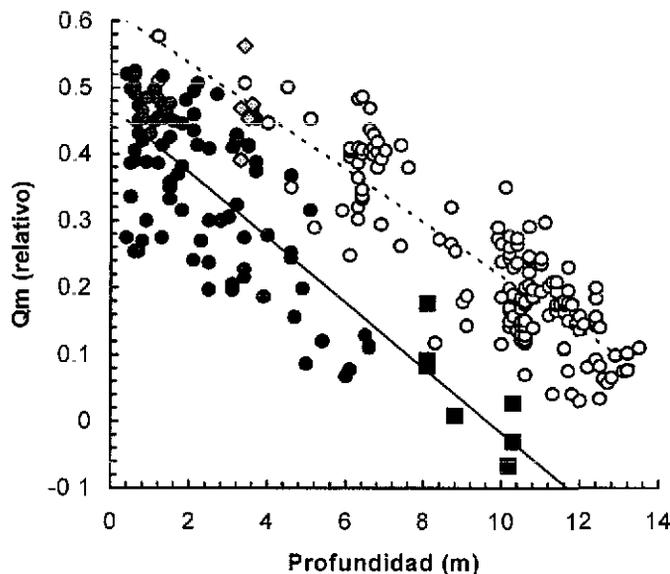
Los simbiosntes de las colonias *P. verrucosa* creciendo a 2.0 m experimentaron valores de  $Q_m$  similares a los observados en las algas de las colonias de *P. gigantea* desarrollándose a 9.0 m. Este resultado se vuelve aún más dramático al comparar la cantidad de luz incidente para ambas especies existiendo una diferencia de hasta 50% de irradiancia. Esto mismo sucede comparando los datos de  $Q_m$  de ambas especies a 4 y 11 m aunque dado el carácter exponencial de extinción de la luz, la diferencia entre ambos es menor (30%) que en la comparación anterior.



**Figura 7.** Efecto de la profundidad en  $Q_m$  (medida con un minuto de adaptación en la obscuridad) de los simbiosntes de dos corales hermatípicos. Los círculos oscuros representan a *P. verrucosa*, los círculos claros representan a *P. gigantea*, y la línea punteada corresponde a la irradiancia relativa en base a un  $K_d$  de  $0.20 \text{ m}^{-1}$ . Los datos fueron colectados entre octubre de 1998 y junio de 1999. La temperatura del agua en el lugar de muestreo fue de  $22.3 \pm 2.0 \text{ }^\circ\text{C}$ . (Iglesias-Prieto *et al.*, 2002)

### III.2.2 Análisis de los datos de $Q_m$ con muestras sin relajar en la obscuridad.

La medición de  $Q_m$  sin relajación en la obscuridad permitió un aumento considerable en el número de observaciones sin que existiera cambio en la tendencia ya que el comportamiento general de los datos fue muy similar a aquellos donde existía una relajación previa de un minuto antes de la toma de la lectura de  $\Delta F/Fm'$  a medio día. La respuesta de  $Q_m$  de los simbioses de ambas especies de coral mostró una variación lineal negativa respecto a la profundidad ( $r^2 = 0.673$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 98$ , y  $r^2 = 0.786$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 155$ , para *P. verrucosa* y *P. gigantea*, respectivamente) (Fig. 8) Los algas de *P. gigantea* desarrollan más presión a lo largo de todo el gradiente de irradiancia dependiente de la profundidad (Fig. 8 círculos claros) en comparación a sus similares en *P. verrucosa* (Fig. 8 círculos oscuros) Los trasplantes de 10 a 3 m de *P. gigantea* después de 24 h (Fig. 8, rombos) desarrollaron valores significativamente diferentes ( $0.47 \pm 0.025$ ,  $n = 5$ ) de los registrados por sus similares en *P. verrucosa* creciendo naturalmente bajo ese régimen de luz ( $0.318 \pm 0.024$ ,  $n = 18$ ). Por otro lado, algunas colonias de *P. verrucosa* que se desprendieron naturalmente (Fig. 8, cuadros) exhibieron valores significativamente mas bajos ( $0.041 \pm 0.034$ ,  $n = 7$ ) que los desarrollados por las colonias de *P. gigantea* creciendo bajo la misma cantidad de luz ( $0.219 \pm 0.022$ ,  $n = 13$ ). En ambos casos de los individuos muestreados fuera de su rango normal de crecimiento, los valores de  $Q_m$  cayeron dentro de las predicciones de los ajustes lineales hechos a partir de los datos de los organismos sin transplantar demostrando una baja capacidad de aclimatación.

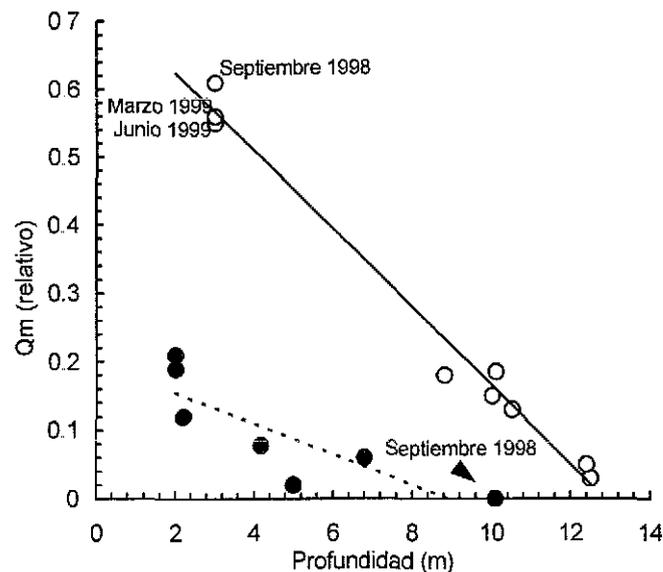


**Figura 8.** Efecto de la profundidad en  $Q_m$  (medida sin un minuto de adaptación en la obscuridad) de los simbioses de dos corales hermatípicos. Los círculos oscuros representan a *P. verrucosa* ( $n = 98$ ), los círculos claros representan a *P. gigantea* ( $n = 155$ ), los cuadros representan colonias de *P. verrucosa* naturalmente desprendidas ( $n = 7$ ), y los rombos representan colonias de *P. gigantea* transplantadas ( $n = 5$ ). Los datos fueron tomados en julio de 2000 con una temperatura del agua de  $27.8 \pm 2.0^\circ\text{C}$  y un  $K_d = 0.16 \text{ m}^{-1}$

### III.2.3 Análisis de los datos de presión sobre PSII de trasplantes recíprocos de ambas especies coralinas.

Los primeros trasplantes recíprocos hechos en septiembre de 1998 mostraron al cabo de 24 horas de exposición al nuevo régimen de luz, cambios en los niveles de  $Q_m$  en los simbios de ambas especies. (Fig 9). Por un lado las algas de las colonias de *P. gigantea* movidas de 10 a 3 m elevaron considerablemente la cantidad de presión sobre el PSII ( $0.627 \pm 0.021$ ,  $n = 3$ ) pudiendo experimentar fotoinhibición (Fig. 9 círculos claros) Los simbios de los individuos de *P. verrucosa* trasladados de 3 a 10 m mostraron niveles de  $Q_m$  muy bajos ( $0.015 \pm 0.005$ ,  $n = 3$ ) indicativo de que la cantidad de luz que percibieron fue insuficiente para saturar su aparato fotosintético

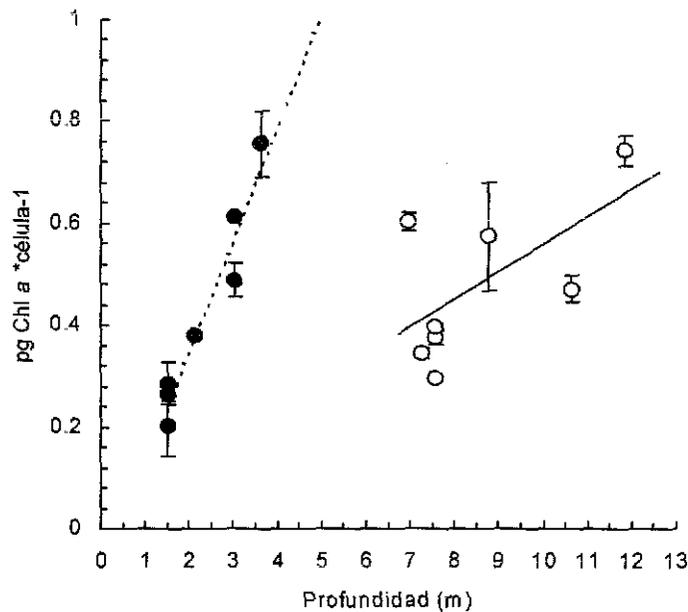
Después de seis meses (marzo de 1999), de las tres colonias de *P. gigantea* sólo se encontró una sobreviviente, sus simbios presentaron una disminución en las lecturas de  $Q_m$  respecto a los desarrollados 24 h después de su reubicación, este comportamiento se atribuyó presumiblemente por aclimatación. Los tres trasplantes de *P. verrucosa* habían muerto. En junio de 1999 los datos de  $Q_m$  del trasplante sobreviviente de *P. gigantea* exhibieron una ligera disminución respecto a los obtenidos cuatro meses antes. Estos datos de  $Q_m$  generados por los trasplantes después de nueve meses, responden claramente según lo predicho por el ajuste de regresión que describe el comportamiento de  $Q_m$  en las algas de los corales sin transplantar, es decir que experimentan presiones 3 veces mayores que sus similares en *P. verrucosa* creciendo naturalmente a esta profundidad, demostrando así que la capacidad fotoaclimatoria a alta luz de estos simbios es muy pobre.



**Figura 9.** Efecto del cambio de cantidad de luz en el desempeño fisiológico de los simbios de los corales transplantados. Los círculos oscuros representan a *P. verrucosa*, y los círculos claros representan a *P. gigantea*. (Iglesias-Prieto *et al.*, 2002).

### III.2.4 Análisis del comportamiento de los pigmentos fotosintéticos intracelulares respecto a la profundidad.

La tendencia de la concentración de clorofila *a* intracelular de las algas fue lineal positiva respecto a la profundidad de ubicación del hospedero (Fig. 10) ( $r^2 = 0.9391$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 7$ , y  $r^2 = 0.4041$ ,  $P = 0.0012$ ,  $n = 8$ , para *P. verrucosa* y *P. gigantea* respectivamente), sin embargo el intercepto en el eje de la variable dependiente no fue significativo para ambos grupos de datos ( $0.0113 \pm 0.128$  y  $-0.0883 \pm 0.0387$  para *P. gigantea* y *P. verrucosa*, respectivamente) Las pendientes de ambos modelos de regresión fueron distintas, lo cual indica que el efecto de la profundidad en la concentración intracelular de pigmentos es mucho más dramático en las algas de *P. verrucosa*, quizá debido a la morfología ramificada del hospedero que provoca un autoensombrecimiento hacia el centro de la colonia. Por el contrario, la pendiente del ajuste de *P. gigantea* es mucho mas suave lo que indica que responde menos drásticamente al cambio de profundidad debido tal vez a que su morfología de tipo masivo en forma de domo no resulta en la formación de un gradiente luminoso intracolonia.



**Figura 10.** Efecto de la profundidad en la concentración de clorofila *a* intracelular de los simbios de dos especies de corales hermatípicos. Los círculos oscuros representan a *P. verrucosa*, y los círculos claros representan a *P. gigantea*.

## IV Discusión

Los corales hermatípicos poseen una simbiosis ecológicamente obligada con dinoflagelados del género *Symbiodinium*. Este hecho los limita a desarrollarse solo en la zona eufótica de los mares tropicales del planeta. En este limitado espacio ocurre un fenómeno ecológico conocido como zonación vertical, el cual se entiende como la dominancia sucesiva de una o un grupo de especies dentro de un rango específico de profundidad. Estos patrones de distribución de las especies han sido explicados con base en la distribución de los recursos, las tasas de crecimiento potencial, patrones de disturbio, competencia, y depredación selectiva (Connell, 1978; Wellington, 1982; Huston, 1985; Jackson, 1991). En el presente estudio se explican los patrones de zonación de dos especies dominantes del Pacífico Oriental Tropical con base en los atributos fotoaclimatorios de sus endosimbioses específicos. Este hallazgo puesto en un contexto global, demuestra que la diversificación del nicho a través del eje de diversificación "luz" podría ser una importante fuerza que promoviera la disminución de los procesos competitivos para otras comunidades coralinas más complejas (e.g. Indopacífico, Caribe) dando por resultado el mantenimiento de la alta diversidad característica de los ecosistemas arrecifales.

Para poder probar que dicho patrón de distribución diferencial es explicado por la presencia de dos taxa simbióticos adaptados a dos ambientes lumínicos, se tuvieron que cumplir tres requisitos. El primero fue demostrar que ambas especies de corales albergan dos entidades simbióticas genéticamente distintas. El segundo fue demostrar que estas entidades genéticamente distintas, poseen adaptaciones particulares que les permiten explotar diferencialmente el campo lumínico al que se encuentran sujetos. Y el tercero fue demostrar que estas asociaciones son específicas. Estos tres requisitos serán discutidos a continuación en el marco de los resultados obtenidos. Por último se abordarán los alcances y repercusiones de los hallazgos de este trabajo en el pensamiento ecológico de los ecosistemas arrecifales.

Para cumplir con el primer objetivo se optó por la utilización de taxonomía molecular. El desarrollo actual de técnicas de identificación utilizando marcadores genéticos para distinguir entre organismos del género *Symbiodinium*, las hace herramientas ideales para estudios ecológicos. Las características morfológicas de la fase cocoide *in hospite* de estos dinoflagelados no permiten su identificación utilizando microscopía de luz. Para la descripción formal es necesario técnicas de cultivo unialgal (esto bajo el supuesto de tener éxito, ya que muchos intentos no los son) seguidas de microscopía electrónica en conjunción con estudios de comportamiento, bioquímicos y cariotípicos (Trench y Blank, 1987; Banaszak *et al.*, 1993), lo cual estaba fuera de los objetivos de este estudio.

Por otro lado el empleo de técnicas de identificación de organismos con base en su genotipo evita el problema de la plasticidad fenotípica la cual puede estar afectada por distintos factores ambientales (Adachi *et al.*, 1996).

En este estudio se comparó el tamaño de tres regiones del genoma de los simbioses SSUrRNA, la región entera del ITS y el ITS2. En el primer caso se obtuvieron productos de PCR de SSUrRNA, (Fig. 2a) cuyos tamaños corresponden a lo reportado para otros dinoflagelados simbióticos ( $\approx 1600$  pb) (Rowan y Powers, 1991a, 1992; McNally *et al.*, 1994). Para la región entera de ITS y el ITS-2 la electroforésis no detecta diferencias de tamaño (Fig. 2b y 2c) entre las algas de ambas especies, sin embargo el análisis de las secuencias muestra que el tamaño es interespecíficamente distinto. Estas variaciones son consistentes con los hallazgos hechos por LaJeunesse (2001) para otros dinoflagelados simbióticos.

Los análisis de RFLP de SSUrRNA demostraron que los simbioses de ambas especies de corales pertenecen a filotipos totalmente distintos. Las algas de *P. verrucosa* están incluidas en el filotipo D recientemente descrito (Fig. 3a, carriles 4, 5) (Baker, 1999; LaJeunesse, 2001), mientras que los simbioses de *P. gigantea*, mostraron un patrón de bandeado característico del filotipo C (Fig. 3a, carril 3). Baker y Rowan (1997) encontraron que todas sus muestras aisladas de los corales hermatípicos del Pacífico Oriental Tropical pertenecían a la clade C lo cual concuerda con lo reportado en este estudio para *P. gigantea*.

El patrón de digestión de uno de los productos de PCR de SSUrRNA clonado en un sistema bacteriano, demuestra que *P. verrucosa* podría ser polimórfica, es decir la presencia de más de un genotipo de alga en un hospedero como lo han reportado para otras especies de corales del Caribe (Rowan y Knowlton, 1995; Rowan *et al.*, 1997) y para *P. meandrina* en el Pacífico (Rowan y Powers, 1991b). En este caso el carácter polimórfico de estos corales podría otorgarle una ventaja adaptativa en ambientes lumínicos cambiantes sobre todo en las partes superficiales, debido a la concentración de la luz por las olas generando "flashes" de hasta  $4000 \mu\text{mol cuanta m}^{-1} \text{s}^{-1}$  (Levins, 1968, Rowan *et al.*, 1997; Rowan, 1998). Otra posibilidad es que los simbioses tengan más de un tipo de copia de esta molécula por célula (Fig. 3b, carril 10) (Rowan y Powers, 1991a). El poder distinguir entre estas dos posibilidades requiere del cultivo de estos organismos a partir de una sola célula para su posterior caracterización genética.

Dado que la SSUrRNA posee una tasa de cambio muy lenta, (Sogin *et al.*, 1986) dos simbioses que posean el mismo RFLP pueden no ser la misma alga (Rowan y Knowlton, 1995). Esta subestimación de la diversidad tiene consecuencias en las interpretaciones ecológicas, ya que cada filotipo puede potencialmente incluir varias especies, cada una de las cuales posee una historia ecológica diferente y atributos fisiológicos propios (Iglesias-Prieto y Trench 1997a).

Recientemente las regiones ITS de los genes ribosomales han demostrado ser buenos marcadores para comparar entre especies de fitoflagelados incluyendo a los simbioses de corales hermatípicos (Coleman *et al.*, 1994, Adachi *et al.*, 1996, Hunter *et al.*, 1997, LaJeunesse y Trench, 2000, LaJeunesse, 2001; Van Oppen *et al.*, 2001; LaJeunesse, 2002), permitiendo comprender mejor las respuestas a los factores ambientales de los organismos a niveles de especie o muy próximo a éste. De esta manera los análisis de los productos de PCR de ITS2 separados por

DGGE demuestran que para este marcador altamente variable (Coleman *et al.*, 1994; Adachi *et al.*, 1996) los simbioses de ambas especies de corales son distintos. Los patrones de bandeo obtenidos de los simbioses de *P. verrucosa* comparadas con las firmas de individuos caracterizados con base en análisis de sus secuencias (Lajeunesse, 2001; 2002) demuestran que sus algas pertenecen a la subclade D1 y las de *P. gigantea* son de una subclade C aún no descrita (Fig. 4a, carriles 1 y 3, respectivamente). En una reconstrucción del gradiente de distribución hecha a partir de las "firmas" de cada tipo de alga (Fig. 4b) se observa que conservan su identidad filética con algunas variaciones (Fig. 4b carriles 3 y 5). En los individuos de *P. verrucosa* estas variaciones podrían ser el resultado de 1) la presencia de más de una población de algas por hospedero, lo cual podría estar justificado en ambientes heterogéneos. Cabe aclarar que este polimorfismo no se relaciona con la profundidad, y que esta variación no es correlativa con la observada en SSUrRNA debido a que ambos marcadores están sujetos a diferentes presiones de selección, 2) artefactos fisicoquímicos como la ocurrencia de más de una conformación secundaria del DNA que altera los patrones de migración de amplicones con idénticas secuencias (LaJeunesse, 2002). 3) la presencia de más de una copia del fragmento o pseudogenes en la serie de repeticiones de los genes ribosomales que pueden estar localizados en diferentes cromosomas, aunado a que por ser sitios no codificantes no son afectados por la selección purificadora (Kimura, 1983; Buckler *et al.*, 1997). 4) Otra posibilidad sería por la contaminación de DNA del hospedero, sin embargo en este caso los productos secuenciados fueron comparados por alineamiento en el GenBank NCBI "BLAST" y la homología con algún coral fue nula.

El alineamiento de las secuencias del gen 5.8S (Fig. 5) revelan consistencia en tamaños entre individuos filogenéticamente relacionados, tal como lo reporta LaJeunesse (2001), además de la alta conservación en secuencia debido al papel de este gen en el ensamblado de proteínas. Respecto a la reconstrucción filogenética hecha a partir de las secuencias del gen 5.8S (Fig. 6) se demuestra que los taxa simbióticos bajo estudio están distantemente relacionados. Por otro lado la topología del árbol respecto a la distribución de los taxa corresponde con otras reconstrucciones hechas a partir de otros marcadores altamente conservados como SSUrRNA y LSUrRNA (Rowan y Powers, 1991b; McNally *et al.*, 1994; Baker y Rowan, 1997).

Las diferencias encontradas por los análisis de RFLP de SSUrRNA, DGGE de ITS-2, y comparación de secuencias del gen 5.8S demuestran que para tres marcadores genéticos con tasas de evolución distintas, estas dos algas son distintas, y lejanamente emparentadas.

El segundo objetivo fue demostrar que poseían adaptaciones particulares para explotar el campo lumínico, ya que podía darse el caso de que por convergencia evolutiva dos taxa tuvieran capacidades fotoadaptativas similares. En este sentido Chang *et al.*, (1983), e Iglesias-Prieto y Trench (1994, 1997a) proponen con base en trabajos realizados *in vitro* sobre las capacidades fotosintéticas de los simbioses, que éstos responden especie-específico a diferentes intensidades luminosas. A partir de estos hallazgos proponen que la estratificación vertical del holosimbionte puede ser resultado de estas capacidades diferenciales para explotar un campo lumínico en

particular. Esta hipótesis no había podido ser probada en las asociaciones intactas hasta la definición de  $Q_m$ , (Iglesias-Prieto *et al.*, 2002) la cual se basa en las capacidades fotosintéticas propias de cada alga medidas *in hospite*.

Los primeros muestreos en septiembre de 1998 (Fig. 7) revelaron que los simbioses de *P. verrucosa*, y *P. gigantea* presentan valores similares de  $Q_m$  a profundidades distintas asociadas a un campo lumínico que se extingue exponencialmente respecto a la profundidad. Los resultados de julio de 2000 (Fig. 8), con un número de muestreos mucho mayor, presentan una tendencia similar que los obtenidos con previa relajación en la obscuridad, es decir una respuesta fisiológica similar a diferentes niveles de iluminación, lo que implica que la luz es explotada de diferente forma por estos taxa simbióticos.

Por otro lado, la disminución de la eficiencia cuántica efectiva ( $\Delta F/F_m$ ) a medio día en el aparato fotosintético de los simbioses (lo que provoca altos valores de  $Q_m$ ) es el producto de mecanismos de fotoprotección que evitan el daño oxidativo (Brown, *et al.*, 1999, Lesser *et al.*, 2000; Jones y Hoegh-Guldberg, 2001; Gorbunov *et al.*, 2001; Lesser y Gorbunov 2001), y de fotodaño en estructuras protéicas en el aparato fotosintético de estos dinoflagelados (Falkowski y Raven, 1997). La eficiencia cuántica recupera niveles máximos al atardecer cuando la mayoría de los centros de reacción están abiertos y las proteínas dañadas fueron sintetizadas *de novo*.

Aunado a las diferencias medidas *in situ*, los análisis del contenido de pigmentos por dinoflagelado simbiote de cada especie de coral demuestra un aumento de la cantidad de pigmentos respecto a un decremento a la cantidad de luz (Fig. 10). Este es un fenómeno descrito para simbioses en cultivo (Iglesias-Prieto y Trench, 1994), y otros productores primarios (Prezelin, 1987; García-Mendoza, 2000) y responde a mecanismos fotoaclimatorios. En los dinoflagelados simbióticos el aumento de pigmentos es producto del efecto combinado de dos procesos. Uno es el aumento de la sección transversal de la unidad fotosintética y el otro es el incremento en el número de estas unidades (Iglesias-Prieto y Trench, 1994). La diferencia en las pendientes de los modelos de regresión lineal que se obtuvieron, podrían explicarse con base en la morfología de las colonias, ya que *P. verrucosa* al ser una forma altamente ramificada a pesar de que se encuentran viviendo cercano a la superficie posee un gradiente interno de auto-ensombrecimiento creado por la propia morfología, lo que provoca que la pendiente del modelo de regresión sea mas pronunciada en comparación con *P. gigantea* que no presenta tal gradiente interno por ser una especie de crecimiento masivo.

Hasta este momento con las evidencias mostradas, las asociaciones simbióticas podrían ser producto de dos posibilidades. La primera es, que en ausencia de especificidad los patrones de distribución de los corales gobernarían dichas asociaciones, ya que las algas infectarían a aquellos hospederos que se encontraran dentro de los requerimientos lumínicos a los que se encontraran adaptadas. La segunda implica que, al existir especificidad en dicha asociación los patrones de distribución de los corales serían consecuencia de las habilidades fotoadaptativas de sus

simbiontes. Para poder distinguir entre estas dos posibilidades se forzó al rompimiento de dicha asociación mediante la realización de trasplantes recíprocos de ambas especies al opuesto de sus rangos de distribución, esperando por un lado que de existir especificidad no hubiera cambio en la población de simbiontes. Por otro lado si las asociaciones carecen de especificidad, los corales experimentarían un recambio su población de microalgas simbióticas como lo propone Buddemeier y Fautin (1993) y Baker (2001) como mecanismo adaptativo para reducir la mortalidad en respuesta a un evento adverso crónico.

Los análisis genéticos de alta resolución (DGGE) demostraron que una colonia de *P. gigantea* que sobrevivió casi dos años fuera de su rango de distribución conservó sus simbiontes (Fig. 4b carril 9). Tres colonias más de esta misma especie, que permanecieron por espacio de un año fuera de su rango de distribución, también demostraron haber conservado su población de simbiontes pertenecientes al filotipo C (Fig. 3b, carriles 3 - 5). Estos hallazgos van en contra de las conclusiones de Baker (2001) (hechas a partir de experimentos de trasplantes recíprocos de 8 especies analizando los patrones de recambio de simbiontes y mortalidad del holosimbionte en respuesta a una situación adversa crónica) de que los corales “se blanquean” para sobrevivir permitiendo el repoblamiento de algas mejor adaptadas. Esto además pasa por alto toda la base de conocimiento sobre la bioquímica y biología celular de la especificidad dando a entender que los corales son sistemas abiertos capaces de asimilar cualquier alga que en un “momento específico” le provea de ventajas selectivas frente a un factor ambiental adverso, o visto de otra manera, que las algas son capaces de infectar a cualquier hospedero que se encuentre dentro de sus límites de tolerancia en pro de maximizar su adecuación.

Personalmente encuentro probable que mediante un evento que provoque el colapso de la simbiosis puede generar en condiciones muy especiales una nueva combinación microalga-invertebrado con atributos ecológicos totalmente novedosos, entendiéndose por esto que eventos de tipo blanqueamiento pueden ser fuente de especiación en un arrecife coralino sin embargo no la consideraría como una fuerza mayor dada la alta especificidad.

Por otro lado, con respecto a los datos de desempeño fisiológico, las microalgas de la colonia de *P. gigantea* que sobrevivió dos años elevaron sus niveles de  $Q_m$  casi 40% después de 24 h (septiembre de 1998). Estos nuevos valores sin embargo, quedaron descritos por las predicciones hechas por el ajuste lineal de  $Q_m$  respecto a la profundidad para los holosimbiontes sin transplantar (Fig. 9). Nueve meses después los niveles seguían siendo bastante altos, demostrando que la capacidad fotoaclimatoria de este tipo de alga es muy bajo, evidencia de una especialización a un ambiente lumínico. Este mismo fenómeno se observó en los cinco trasplantes hechos en julio de 2000 (Fig. 8, rombos) después de 24 h de permanecer fuera de su rango de distribución normal. Algunas colonias de *P. verrucosa* desprendidas naturalmente halladas a 10 m (Fig. 8, cuadros) revelaron diferencias significativas en los valores de  $Q_m$  respecto a los obtenidos para colonias de *P. gigantea* muestreadas a la misma profundidad. De igual forma, los primeros trasplantes de *P. verrucosa* hechos en Septiembre de 1998 (Fig. 7) no sobrevivieron

debido a que la cantidad de luz capturada al medio día no es suficiente para saturar el aparato fotosintético de sus simbioses (Spencer-Davies, 1991)

El conjunto de evidencias mostradas sustentan la noción de que la zonación vertical en una comunidad coralina puede ser explicada por las habilidades diferenciales de sus componentes en la explotación del recurso luz. Los ecosistemas arrecifales compuestos en su mayoría por corales hermatípicos se encuentran limitados principalmente a la zona eufótica en donde la variable luz puede cambiar varios ordenes de magnitud en la profundidad (Falkowski y Raven, 1997). Estos cambios en los niveles de iluminación, aunado a la tridimensionalidad provocada por la disposición de los corales y su forma de crecimiento, han generado adaptaciones que le otorgan ventajas a un organismo que por su característica sésil, la mayor parte de su existencia se ve sujeto a tales presiones de selección. Cuando los niveles de integración tanto metabólica como de reconocimiento entre ambos componentes es alto, la selección natural actuará sobre el holosimbionte y no sobre cada uno de los componentes por separado (Iglesias-Prieto y Trench, 1997a).

Los hallazgos hechos en este trabajo tienen implicaciones importantes en la forma de concebir la distribución espacial y la diversidad de los corales en los ecosistemas arrecifales. Por un lado se comprobó que la distribución vertical de dos especies coralinas dominantes se encuentra en función a la especialización de cada especie (como holosimbionte) en la explotación de un recurso común, en este caso la luz. Ese recurso puede cambiar varios ordenes de magnitud en la vertical de modo que potencialmente muchas especies de simbioses podrían utilizar una zona específica dentro de este amplio espectro de variación, y a partir de esta zona, distribuirse en este gradiente dependiendo de sus capacidades fotoaclimatorias. Si a esto le añadimos que esta simbiosis tiende a ser específica, daría por resultado la disminución de la mayoría de los procesos de exclusión competitiva favoreciendo al mantenimiento de la alta diversidad característica de los arrecifes coralinos.

Históricamente el papel de la diversificación del nicho como proceso importante en el mantenimiento de la diversidad fue considerado poco relevante debido a que las habilidades fotoadaptativas de los simbioses se ignoraban, ya que se les consideraba como una sola especie capaz de establecer simbiosis con un amplio rango de invertebrados incluyendo a los corales hermatípicos (Connell, 1978), de manera que la idea de especificidad en la asociación, y especialización hacia alguna parte del ambiente lumínico, no eran aplicables. En la actualidad se sabe que los dinoflagelados simbioses del género *Symbiodinium* poseen una diversidad comparada a la de sus representantes de vida libre pertenecientes a diferentes órdenes (McNally *et al.*, 1994; Trench, 1997; LaJeunesse, 2002). Aunado a esta alta diversidad taxonómica, experimentos de variación en la cantidad de flujo de fotones hechos *in vitro* sobre algunas especies descritas formalmente, revelaron la existencia de distintas fotoadaptaciones, (Chang *et al.*, 1983; Iglesias-Prieto y Trench, 1994, 1997a) demostrando una respuesta fisiológica especie-específica que podría en principio explicar las distribuciones de algunos corales con base en las capacidades

fotoaclimatorias de sus algas. Además se ha dado el caso, con corales del género *Montastraea*, que por una identificación errónea del hospedero, lo que se suponía era una sola especie con una amplia distribución vertical, resultaron ser por lo menos tres, cada una con una distribución espacial preferente (Weil y Knowlton, 1996). Por otro lado, existe la posibilidad de holosimbiontes polimórficos (Rowan y Knowlton, 1995; Rowan *et al.*, 1997) que son capaces de ajustar sus poblaciones de simbioses en relación a las condiciones de luz existentes, aunque de la totalidad de las especies de corales muestreadas en la actualidad, solo el 23% poseen esta característica (Baker, 1999) de manera que no podemos considerarla como una generalidad.

En las comunidades coralinas del Pacífico Oriental Tropical los patrones de distribución de los corales hermatípicos se habían explicado por las presiones de selección de depredación de peces sobre los corales (Wellington, 1982). Las evidencias aportadas en este trabajo son suficientes para explicar este fenómeno ecológico, y no son excluyentes de la explicación por depredación de Wellington, (1982), ya que se necesitarían experimentos a largo plazo en donde una zona que fuera sitio de reclutamiento por larvas de corales se privara de pomacentridos, y después de varios años de desarrollo coralino ver si dicha zonación se cumple, y si así fuera, no puede dejarse de lado la importancia que tienen las interacciones biológicas como la depredación y competencia, así como los disturbios y procesos físicos como el oleaje y de sedimentación (Connell, 1978; Huston, 1985; Wellington, 1982; Jordán, 1980) en ecosistemas tan complejos como los arrecifes coralinos.

El presente estudio confirma que la medida de  $Q_m$  es un buen descriptor del desempeño fisiológico *in hospite* de los dinoflagelados simbioses, y de esta manera abre un campo hacia nuevas preguntas de relevancia ecológica como su variación geográfica, temporal, o en respuesta a eventos de oscilaciones térmicas, esto aunado a que se sabe que a nivel molecular esta presión de excitación es capaz de regular la transcripción de ciertos genes (Maxwell, 1995).

Por último la zonación vertical de los corales tiene varias implicaciones en un ecosistema dominado por estos organismos. Al conocer que dichos patrones de distribución diferencial son el producto de adaptaciones del organismo a cierta cantidad de luz, es posible hacer predicciones de abundancia y selección de hábitat de ciertas especies de corales conociendo las habilidades fotoadaptativas de sus simbioses específicos, por supuesto esto requiere conocer a fondo la diversidad taxonómica y fotofisiológica de estos dinoflagelados simbioses

## V. Conclusiones

1.- Los simbioses de ambas especies de corales poseen fotofisiologías distintas ya que explotan diferencialmente las variaciones en el campo lumínico a que se encuentran sujetos

2 - Estas asociaciones mutualistas entre estas dos especies de holosimbiontes fueron altamente específicas sin importar las variaciones ambientales, evaluadas en este trabajo por medio de trasplantes recíprocos que provocaron situaciones de estrés crónico y que no indujeron a una nueva simbiosis con una mejor adecuación.

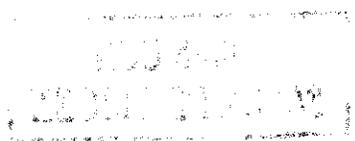
3.- Se destaca la utilidad de las herramientas moleculares (PCR, RFLP, DGGE) como una forma rápida y eficaz para evaluar la diversidad taxonómica de los simbiosiontes sin la necesidad de recurrir al cultivo de estos para su descripción formal.

4.- Las diferencias encontradas por los análisis el RFLP de SSUrRNA, DGGE de ITS-2, y comparación de secuencias del gen 5.8S demuestran que para tres marcadores genéticos con tasas de evolución distintas, estas dos algas son distintas, y lejanamente emparentadas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Bibliografía citada.

- Adachi, M., Y. Sako, y Y. Ishida. 1996. Analysis of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using sequences of 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer regions. *J. Phycol* 32:424-432.
- Baillie, B. K., C. A. Belda-Baillie, y T. Maruyama. 2000. Conspecificity and Indo-Pacific distribution of *Symbiodinium* genotypes (Dinophyceae) from giant clams. *Journal of Phycology* 36:1153-1161.
- Baker, A. C. 2001. Reef coral bleach to survive change. *Nature*. 411:675-766.
- Baker, A. C. 1999 *The Symbiosis Ecology of Reef-Building Corals* Tesis doctoral, Universidad de Miami.
- Baker, A. C., y R. Rowan. 1997. Diversity of symbiotic dinoflagelates (Zooxanthellae) in the scleractinian corals of the Caribbean and the Eastern Pacific. *Proc 8<sup>th</sup> Int. Coral Reef Sym.* 2:1301-1306.
- Banaszak, A. T. Iglesias-Prieto, R. & Trench, R. K. 1993. *Scropsiella velellae* sp nov. (Peridinales) and *Gloeodinium viscum* sp. Nov. (Phytodinales), dinoflagellate symbionts of two hydrozoans (Cnidaria). *J. Phycol.* 29:517-28.
- Banaszak A. T., T. C LaJeunesse, R. K Trench. 2000. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Jour Exp Mar Biol and Ecol* 249:219-233.
- Beltrán Ramírez, V. H 1999. *Estructura de la cominidad de siete zonas coralinas del sur del Golfo de California*. Tesis de licenciatura. Departamento de Biología Marina, Universidad Autónoma de Baja California Sur. 90p.
- Brown, B. E. I., Ambarasi, M. E. Warner, W. K. Fitt, R. P. Dunne, S. W. Gibb y D. G. Cummings 1999, Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs*. 18:99-105.
- Buddemeier, R. W. y D. G. Fautin 1993. Coral bleaching as an adaptive mechanism. A testable hypothesis. *BioScience* 5:320-326.
- Buckler, IV, S. E., A. Ippolito. Y T. P., Holsford 1997. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetics implications. *Genetics* 145:821-832.
- Carriquiry, J. D. y H. Reyes-Bonilla. 1997. Estructura de la comunidad y distribución geográfica de los arrecifes coralinos de Nayarit. Pacífico de México. *Ciencias Marinas*. 23(2) 227-248.
- COADS (1960-1995). Comprehensive Oceanographic and Atmospheric Data set. CD-ROM.
- Coleman, W. A., A. Suárez, y L. J. Goff. 1994. Molecular delineation of species and syngens in volvocean green algae (Chlorophyta). *J. Phycol.* 30 80-90.
- Connell, J. H. 1978. Diversity in tropical rain forest and coral reefs. *Science*. 199 1302-1310
- Cortés, J. y M. Murillo 1985. Comunidades coralinas y arrecifes del Pacífico de Costa Rica. *Rev Biol Trop* 33: 197-202.



- Chang, S. S., B.B. Prezelin y R. K. Trench, 1983. Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* *Mar. Biol.* 76:219-229.
- Don, R. H., P. T. Cox, B. J. Wainwright, K. Baker, y J.S. Mattick. 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19:4008.
- Falkowski, P. G., Z. Dubinsky, L. Muscatine, y J. W. Porter. 1984. Light and bioenergetics of symbiotic coral. *BioSci.* 34:705-709.
- Falkowski, P. G. y J. A. Raven. 1997. *Aquatic photosynthesis*. Blackwell science. USA. 375pp.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 39:783-91.
- García- Mendoza, E. 2000 *Photoadaptation in microalgae: xanthophyll cycle and state transitions strategies* PhD thesis University of Amsterdam. 117p.
- Glynn, P. W. y E. Leyte-Morales. 1997. Coral Reefs of Huatulco, west México: reef development in upwelling Gulf of Tehuantepec *Rev Biol. Trop.*, 1033-1048.
- Gorbunov, M. Y., Z. S. Kolber, M. P. Lesser, y P. G. Falkowski. 2001. Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals. *Limnol. Oceanogr.*, 46(1):75-85.
- Goreau, T. F. 1963. Calcium carbonate deposition by coralline algae and corals in relation to their roles as reef-builders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 109: 127-167.
- Goreau, F. T., N. F. Goreau, y T. J. Goreau. 1979. Corales y arrecifes coralinos. *Scientific American* 37:48-60.
- Hunter, C. L., C. W., Morden, y C. M., Smith,. 1997. The utility of ITS sequences for assessing relationships among zooxanthellae and corals *Proc 8<sup>th</sup> Int Coral Reef Sym.* 2: 1599-1602.
- Huston, M. A. 1985. Patterns of species diversity on coral reefs. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16:149-177.
- Iglesias-Prieto, R., J. L., Matta, W. A., Robins, y R. K., Trench. 1992. Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture- *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10302-10305.
- Iglesias-Prieto, R. y R. K. Trench. 1994. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113:163-175.
- Iglesias-Prieto, R. y R. K. Trench. 1997a. Photoadaptation, photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses. *Proc 8<sup>th</sup> Int. Coral Reef Sym.* 2:1319-1324.
- Iglesias-Prieto, R. y R. K. Trench. 1997b. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II Responses of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities. *Mar Biol.* 130:23-33.
- Iglesias-Prieto, R., V. Beltrán-Ramírez, T. C. LaJeunesse, H. Reyes-Bonilla, y P. E. Thomé. 2002. The presence of specific algal symbionts explains the vertical distribution patterns of hermatypic corals. *Science* (sometido)
- Jackson, J. B. 1991. Adaptation and diversity of reef corals. *BioScience.* 7(41):475-482

- Jeffrey, S. W y G. F. Humphrey. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c<sub>1</sub>, and c<sub>2</sub>, in higher plants, algae and natural phytoplankton *Biochem. Physiol. Pfl.* 167:191-194.
- Jones, R. J y O Hoegh-Guldberg. 2001. Diurnal changes in the photochemical efficiency of the symbiotic dinoflagellates (Dinophyceae) of corals: Photoprotection, photoinactivation and the relationship to coral bleaching. *Plant, Cell and Environment.* 24:88-99.
- Jordán, D. E. 1980. *Arrecifes coralinos del noreste de la península de Yucatan: estructura comunitaria, un estimador del desarrollo arrecifal.* Tesis doctoral. UNAM-ICMYL. 120pp.
- Kimura, M. 1983. *The neutral theory of molecular evolution.* Cambridge University Press, Cambridge, 591pp
- Kumar, S., K. Tamura, I B. Jakobsen, y M. Nei. 2001 MEGA2: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
- Kyle, D., I. Ohad, y C. J. Arntzen. 1984. Membrane protein damage and repair: Selective loss of a quinone-protein function in chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4070-4074.
- Lajeunesse, T. C., y R. K. Trench. 2000. Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone, *Anthopleura elegantissima* (Brant) *Biol. Bull.* 199(2):126-134.
- LaJeunesse, T. C. 2001. Investigating the Biodiversity, Ecology, and Phylogeny of Endosymbiotic Dinoflagellates of the Genus *Symbiodinium* Using the Internal Transcribed Spacer Region In Search of a 'Species' Level Marker. *J. Phycol.* 37:866-880.
- LaJeunesse, T. C. 2002. Community structure and diversity of symbiotic dinoflagellate populations from a caribbean coral reef. *En prensa*
- Lesser, M. P. y M. Gorbunov. 2001. Diurnal and bathymetric changes in chlorophyll fluorescence yields of reef corals measured *in situ* with fast repetition rate fluorometer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 212:69-77
- Lesser, M. P., C. Mazel, D. Phinney, y C. S. Yentsch. 2000. Light absorption and utilization by colonies of the congeneric hermatypic corals *Montastraea faveolata* and *Montastraea cavernosa*. *Limnol. Oceanogr.*, 45(1):76-86
- Levins, R. 1968. *Evolution in changing environments.* Princeton University Press New Jersey 120pp.
- Long, S., S. Humphries, y P. Falkowski. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:633-662
- Maniatis, T., E. F. Fritsch y J. Sambrook. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
- Maxwell, D. P., S. Falk, y N. P. Huner. 1995. Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition 1.- light-harvesting complex II abundance and zeaxanthin content in *Clorella vulgaris*. *Plant Physiol* 107: 687-694

- McNally, K. L., N. S., Govind, P. E., Thomé y R. K., Trench. 1994 Small-subunit ribosomal DNA sequence analyses and reconstruction of inferred phylogeny among symbiotic dinoflagellates (Pyrrophyta) *Jour. Phycol.* 30:316-29.
- Muscatine, L. Y. J. W. Porter. 1977 Reef Corals: Mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments *BioScience.* 27(7):454-460.
- Muscatine, L. 1980. Productivity of zooxanthellae. In: Falkowski, P. G [Ed.] Primary productivity in the sea. Plenum Press, USA. 381-402p.
- Muscatine, L., P. G. Falkowski, Z. Dubinsky, P. A. Cook y L. R. McCloskey. 1989. The effect of external nutrient resources on the population dynamics of zooxanthellae in the reef coral. *Proc R. Soc. Lond B* 236:311-324.
- Myers, R. M., S. G. Ficher, L. S. Lerman, y T. Maniatis. 1985. Nearly all single base substitutios in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res.* 13:3131-3145.
- Prasil, O., N. Adir, y I. Ohad. 1992. Dynamics of photosystem II: Mechanisms of photoinhibition and recovery processes In Barber, J. [Ed] The photosystems: Structure, function and molecular biology. V 11. Elsevier.
- Porter, J. M., L. Muscatine, Z. Dubinsky, y P. G. Falkowski. 1984. Primary production and photoadaptation in lighth and shade-adapted colonies of the symbiotic coral, *Stylophora pistillata*. *Proc R. Soc. Lond. B.* 222:161-180.
- Prezelin, B. B. 1987. Photosintetic physiology of dinoflagellates. In; F. J R. Taylor [ed] The biology of dinoflagellates. Vol 21 Blakwell Scientific Publications, Oxford. 174-223pp.
- Rahart, M., y V. Reich. 1988. The establishment of algal-hydra symbioses- a case of recognition or preadaptation? In Scannerini S., D. C. Smith, P. Bonafonte Fasolo y V. Gianninazzi-Pearson [Eds] Cell to cell signals in plant animal and microbial symbioses., Vol. H 17. Springer-Verlag, Berlin, 297-310pp.
- Reyes- Bonilla H. y A. López-Perez. 1998. Biogeografía de los corales pétreos (Scleractinia) del Pacífico mexicano. *Ciencias Marinas.* 24 211-224
- Roberts, C. M., y N. V. C. Polunin, 1993. Marine reserves: simple solutions to managing complex fisheries?. *Ambio.* 22.363-368.
- Rowan, R., y D. A. Powers 1991a. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science.* 251: 1348-1351.
- Rowan, R., y D. A. Powers 1991b. Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (Zooxanthellae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71:65-73
- Rowan, R. y D. A. Powers 1992. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagelates (zooxanthellae). *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3639-3643.
- Rowan, R. 1998. Diversity and Ecology of Zoxantellae on Coral Reefs. *J. Phycol.* 34:401-417.
- Rowan, R. y N. Knowlton, 1995. Intraespecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(7):2850-2853.

- Rowan, R., N., Knowlton, A. Baker, y J. Jara. 1997. Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature* 388:265-269.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stofefel, S. Schaff, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, y H. A. Herlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saitou, N. y N. Nei. 1987. The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425
- Sanger, F., S. Nicklen, y A. R. Coulson. 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74, 5463-5467
- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman, y M. Myers. 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:232-236.
- Seutin, G., B. N. White, y P. T. Boag. 1991 Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* 69:82-92
- Sogin, M. L., H. J. Elwood, y J. H. Gunderson. 1986. Evolutionary diversity of eukariotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 1383-1387.
- Spencer-Davies, P. 1991. Effect of daylight variations on the energy budgets of shallow-water corals. *Mar. Biol.* 108:137-144
- Stanley, D. D. y P. K. Stewart. 1995. Evolution of coral-zooxanthella symbiosis during the triassic: a geochemical approach. *Paleobiology.* 21:179-99.
- Takabayashi, M., D. A. Carter, W. K. Loh, y O. Hoegh-Guldberg. 1998. A coral-specific primer for PCR amplification of the internal transcribed spacer region in ribosomal DNA. *Mol. Ecol.* 7 (7), 928-930
- Thompson, J. D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.* 22(22):4673-4680
- Trench, R. K. & R. J. Blank. 1987. *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal. *S. goreauii*, sp. nov., and *S. pilosum*, sp. nov.: Gymnodinoid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. *J. Phycol.* 23:469-81.
- Trench, R. K. 1988. Specificity in dinomastigote marine invertebrate symbioses: An evaluation of hypothesis of mechanisms in producing specificity. In: Scannerini S., D. C., Smith, P., Bonafonte-Fasolo, V. Pearson-Gianinazzi [ed] *Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbioses*. NATO ASI Series. Vol. H 17. Springer-Verlag, Berlin. 325-346pp.
- Trench, R. K. 1992. *Microalgal-invertebrate symbioses, current trends*. Encyclopedia of microbiology. Academic Press USA. 3:129-142
- Trench, R. K. 1993. Microalgal-invertebrate symbioses. A review. *Endocytobiosis and Cell Research.* 9:153-175

- Trench, R. K. 1997. Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses. *Proc 8<sup>th</sup> Int Coral Reef Sym.* 2:1275-1286.
- Van Oppen, M. J., P.P. Palstra, A. M. Piquet, y D. J. Miller. 2001. Patterns of coral-dinoflagellate associations in *Acropora*: significance of local availability and physiology of *Symbiodinium* strains and host-symbiont selectivity. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 268:1759-1767.
- Veron, J.E. N. 1995. *Corals in space and time: the biogeography and evolution of the Scleractinia.* Comstock-Cornell. Ithaca. 319p
- Wellington G. M. 1982. Depth zonation of corals in the gulf of Panama: control and facilitation by resident reef fishes. *Ecological Monographs.* 3: 223-241
- Weil, E, y Knowlton, N. 1994. A multi-character analysis of the Caribbean coral *Montastraea annularis* (Ellis and Solander, 1786) and its two sibling species, *M. faveolata* (Ellis and Solander, 1786) and *M. franksi* (Gregory, 1895). *Bull Mar Sci* 55:151-175.
- Yonge, G. M. 1973. The nature of reef building (hermatypic) corals. *Bull. Mar. Sci.* 23:1-15.

