



# **Composición y estabilidad diferencial de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbiotes en respuesta a temperatura elevada**

**T E S I S**

que para obtener el grado académico de

**Maestra en Ciencias**

(Biología Marina)

presenta

**Erika Marlene Díaz Almeyda**

Directora de Tesis: Dra. Patricia Elena Thomé Ortiz

Comité tutorial: Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces

Dr. Roberto Iglesias Prieto

Dra. María de Lourdes Morquecho Escamilla

Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Puerto Morelos, Quintana Roo

Enero 2009



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.

A mi familia, por apoyarme siempre.

A Guillermo Jordán.

A los corales.

## ***Agradecimientos***

A la Dra. Patricia Thomé, por todas sus enseñanzas, su disposición, paciencia y tiempo dedicado en mi formación.

Al Dr. Roberto Iglesias Prieto por compartir su conocimiento, por su apoyo y empuje para dar lo mejor de mi en todo momento.

A la Dra. Lourdes Morquecho Escamilla por el tiempo invertido en la revisión cuidadosa de este manuscrito y todos sus valiosos comentarios.

A la Dra. Elena Álvarez Buylla Rocés por sus importantes comentarios a lo largo de todo el trabajo.

Al Dr. Daniel Piñero

Al Dr. Mohammed El Hafidi por la confianza y el tiempo dedicado en entrenarme en una nueva área.

A la Dra. Alina Szmant por ser parte muy importante de mi formación como bióloga de arrecifes coralinos.

A la Dra. Marina Gavilanes por su disponibilidad para aclarar mis preguntas.

A la Dra. Susana Enriquez por el tiempo dedicado en apoyarme al análisis de datos.

A la Dra. Anastazia Banaszak por su apoyo y valiosos comentarios.

A la técnico Claudia Morera, por su ayuda en el laboratorio apoyándome a hacer todo lo

Al M. en C. Guillermo Jordán por su motivación, apoyo, desveladas y discusiones.

A todos en el laboratorio el Dr. Marco Villanueva, Dra. Flor Colombo, Dra. Nadine Schubert y los estudiantes Xavier Pech, Victor Urrutia, Luisito mi hijo y Raúl por compañerismo.

A todo el personal administrativo, vigilantes y biblioteca de la Unidad Académica Puerto Morelos.

A todos en el posgrado de Ciencias del Mar y Limología, al Dr. Merino, la Dra. Villaclara, Diana, Gaby, Lupita y Chantal por su apoyo.

# Índice

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>3</b>
<b>Lista de Tablas .....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>11</b>
<b>Hipótesis .....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>17</b>
General .....	17
Particulares .....	17
<b>Metodología .....</b>	<b>18</b>
1. Dinoflagelados recién aislados de corales.....	20
2. Determinación de la identidad genética de los dinoflagelados simbioses de <i>M. faveolata</i> y <i>M. aurentenra</i> .....	21
3. Cultivos de dinoflagelados simbioses empleadas .....	21
4. Cosecha cuántica máxima de separación de cargas ( $F_v/F_m$ ) a alta temperatura. ....	22
5. Determinación de la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.....	23
6. Determinación de la composición de ácidos grasos en membranas celulares....	24
7. Fracción enriquecida de membranas fotosintéticas .....	25
8. Extracción e identificación de ácidos grasos totales .....	25
<b>Resultados .....</b>	<b>27</b>
1. Determinación de la temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbioses de corales y su relación con la sensibilidad térmica del aparato fotosintético. ....	27
2. Exploración de los componentes genéticos y ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.....	30
3. Composición de ácidos grasos de células completas y de membranas fotosintéticas de dinoflagelados simbioses cultivados en condiciones diferenciales temperatura.....	34
<b>Discusión.....</b>	<b>50</b>

1. Temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbiotes de corales y su relación con la sensibilidad térmica del aparato fotosintético. ...	50
2. Componentes genéticos y ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética. ....	52
3. Caracterización de ácidos grasos de células completas y de membranas fotosintéticas de dinoflagelados simbiotes.....	54
4. Efecto de la temperatura de crecimiento en la composición de ácidos grasos....	58
<b>Conclusiones.....</b>	<b>66</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>68</b>
Protocolo de extracción de ácidos grasos.....	68
Tabla 1. Porcentaje de ácidos grasos identificados de las células completas crecidas a diferentes cultivadas a 24°C y 31°C.....	69
Tabla 2. Porcentaje de ácidos grasos identificados de la fracción enriquecida de cloroplastos obtenida de cultivos crecidos a 24°C y 31°C.....	70
<b>Literatura citada.....</b>	<b>71</b>

## ***Lista de Figuras***

Fig. 1. Resumen de la metodología empleada para determinar temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbiotes de corales y su sensibilidad térmica diferencial.

Fig. 2. Resumen de la metodología empleada para determinar la composición de ácidos grasos totales.

Fig. 3. Mediciones de  $F_o$  y  $F_v/F_m$  en cultivos de *Symbiodinium sp.* (filotipo A1).

Fig. 4. Curva de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados recién aislados de corales arrecifales.

Fig. 5. Sensibilidad térmica del aparato fotosintético de dinoflagelados recién aislados incubados a temperatura alta.

Fig. 6. Curva de fusión de la membrana fotosintética para dinoflagelados en cultivo.

Fig. 7. Sensibilidad térmica del aparato fotosintético de dinoflagelados en cultivo incubados a temperatura alta.

Fig. 8. Curva de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbiotes crecidos a 24°C y a 31°C.

Fig. 9. Abundancia relativa de ácidos grasos totales extraídos de células completas de *Symbiodinium sp.* (A1) crecida a 24°C.

Fig. 10. Abundancia relativa (%) de ácidos grasos totales extraídos de células completas de *Symbiodinium sp.* (C1) crecida a 24°C.

Fig. 11. Índice de desaturación relativo para la  $\Delta 6$  desaturasa, en *Symbiodinium sp.* (C1) (n=3) y *Symbiodinium sp.* (A1) (n=3) cultivados a 24°C.

Fig. 12. Abundancia relativa (%) de ácidos grasos totales extraídos de una fracción enriquecida en cloroplastos de *Symbiodinium sp.* (A1) crecida a 24°C.

Fig. 13. Abundancia relativa de ácidos grasos totales de una fracción enriquecida en cloroplastos de *Symbiodinium sp.* (C1) crecida a 24°C.

Fig. 14. Índice relativo de actividad para la elongasa que alarga ácidos grasos C16 a C18 en fracción enriquecida de cloroplastos, para *Symbiodinium sp.* (C1) (n=3) y *Symbiodinium sp.* (A1) crecidas a 24°C.

Fig. 15. Abundancia relativa de los ácidos grasos en fracción enriquecida de cloroplastos, para *Symbiodinium sp.* (C1) y *Symbiodinium sp.* (A1).

Fig. 16. Abundancia relativa de algunos ácidos grasos en *Symbiodinium sp.* (A1) significativamente diferentes entre célula completa y fracción enriquecida de cloroplastos.

Fig. 17. Abundancia relativa de ácidos grasos extraídos de células completas de *Symbiodinium sp.* (A1) (n=3) que fueron significativamente diferentes entre aquellas crecidas a 24°C y las crecidas a 31°C.

Fig. 18. Abundancia relativa de ácidos grasos extraídos de una la fracción enriquecida de cloroplastos de *Symbiodinium sp.* (A1) que fueron significativamente diferentes entre aquellas crecidas a 24°C y las crecidas a 31°C.

Fig. 19. Índices relativos de desaturación para las desaturasas  $\Delta 15$  y  $\Delta 6$ , que fueron significativamente diferentes para las células completas de *Symbiodinium sp.* (A1) (n=3) crecida a 24°C y a 31°C. Las barras denotan la desviación estándar.

Fig. 20. Actividad relativa de elongasa en células completas de *Symbiodinium sp.* (A1).

Fig. 21. Abundancia relativa de los ácidos grasos en célula completa de *Symbiodinium sp.* (A1) agrupados por longitud.

Fig. 22. Actividad relativa de elongasa en fracción enriquecida de membranas de cloroplasto de *Symbiodinium sp.* (A1).

Fig. 23. Abundancia relativa de los ácidos grasos en fracción enriquecida de membranas de cloroplasto de *Symbiodinium sp.* (A1) crecida a 24°C y 31°C.

Fig. 24. Índice relativo de alargamiento en células completas de *Symbiodinium sp.* (C1) crecida a 24°C y 31°C.

Fig. 25. Abundancia relativa de los ácidos grasos en célula completa de *Symbiodinium sp.* (C1) agrupados por longitud.

Fig. 26. Abundancia relativa (%) de isómeros cis y trans en ácidos grasos C18:1 en *Symbiodinium sp.* (A1).



Fig. 27. Abundancia relativa (%) de isómeros cis y trans en ácidos grasos C18:1 en *Symbiodinium sp.* (C1).

### ***Lista de Tablas***

Tabla 1. Colonias de coral utilizadas para determinar la fluidez de la membrana fotosintética y la cosecha cuántica máxima de separación de cargas a alta temperatura ( $F_v/F_m$  a 35°C).

Tabla 2. Cultivos utilizados en este estudio.

Tabla 3. Índices de actividad de desaturasas y elongasas inferidas a partir de las concentraciones de sus sustratos y productos.

Tabla 4. Agrupaciones de ácidos grasos de acuerdo a su grado de saturación y longitud.

## **Resumen**

Díaz-Almeyda E.M. 2009. **Composición y estabilidad diferencial de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbiotes en respuesta a temperatura elevada.** Tesis de Maestría (Ciencias del Mar y Limnología). Unidad Académica Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

El blanqueamiento de corales simbiotes ha sido relacionado con incrementos menores de dos grados centígrados sobre la temperatura promedio de verano de la superficie del mar. Este proceso inicia con un desacoplamiento de la fotosíntesis de los dinoflagelados simbiotes con la consiguiente muerte o expulsión del simbiote. No todas las especies de coral y no todos los individuos de una misma especie son igualmente sensibles a la temperatura; esta sensibilidad al estrés térmico podría estar determinada por la composición lipídica de la membrana del tilacoide que a su vez determina su fluidez. En este trabajo se determinó la temperatura de fusión de la membrana fotosintética de cinco cultivos de diferentes filotipos de dinoflagelados simbiotes, encontrando diferencias de 4.5°C entre la más sensible y la más resistente a la alta temperatura sugiriendo un fuerte componente genético. Estos resultados se relacionaron con la sensibilidad térmica del aparato fotosintético en los dinoflagelados simbiotes y con la temperatura óptima de crecimiento. Para explorar la respuesta aclimatoria a la temperatura, dos de los simbiotes más sensibles a la alta temperatura fueron crecidos a 31°C. Los resultados indican cambios en la temperatura de fusión de la membrana sugiriendo aclimatación limitada a la alta temperatura.

Adicionalmente se analizó la composición de ácidos grasos de las membranas celulares y fotosintéticas encontrando diferencias significativas entre filotipos sin que esta diferencia se reflejará en la fluidez de la membrana. La aclimatación de la membrana fotosintética a la alta temperatura parece involucrar diferentes estrategias (saturación, alargamiento e isomerización de los

ácidos grasos) dependiendo de la especie y son más complejas que lo descrito con anterioridad.

En dinoflagelados recién aislados de corales, encontramos que la membrana fotosintética de *Madracis auretenra* (baja tasa de blanqueamiento) fue más resistente a la temperatura que los aislados de *Montastrea faveolata* (alta tasa de blanqueamiento), sugiriendo que la estabilidad de la membrana fotosintética es un componente importante relacionado con la susceptibilidad del coral al blanqueamiento.

## ***Introducción***

Los arrecifes de coral se desarrollan en su mayoría en aguas calientes, claras y someras de los océanos tropicales, formando estructuras geológicas de carbonato de calcio de gran escala, ofreciendo alimento y refugio a peces e invertebrados principalmente, lo que lo convierte en uno de los ecosistemas más diversos y productivos de la Tierra (Bellwood 1994). En ellos existe una alta biodiversidad a nivel de especies, phyla y reinos (Birkeland 1997). A nivel global se estima que más de 400 millones de habitantes dependen de los bienes y servicios que proporcionan los arrecifes de coral (Hoegh-Guldberg et al. 2007). Se ha calculado que más de un millón de personas dependen directamente de la integridad y salud del Sistema Arrecifal Mesoamericano (Gorrez y MacPherson 2006) ya que de éstos se extraen materiales para construcción, son un recurso pesquero y turístico importante, protegen a la costa de la erosión provocada por desastres naturales (huracanes) y tienen un potencial importante como fuente de medicamentos (Hoegh-Guldberg 1999).

En los arrecifes de coral predominan las asociaciones simbióticas entre invertebrados (cnidarios) y dinoflagelados (*Symbiodinium*). Estos dinoflagelados habitan dentro de un organelo de origen animal llamado simbiosoma ubicado mayoritariamente en las células del endodermo de su hospedero (Trench 1987). Esta asociación ha garantizado el éxito de los corales escleractíneos constructores de arrecife en los últimos 200 millones de años al incrementar su tasa de calcificación. La presencia del dinoflagelado simbiote implica ventajas nutricionales para el coral ya que lo provee de azúcares, aminoácidos, carbohidratos y péptidos pequeños, mientras que el dinoflagelado obtiene amonio y fosfato que son productos de desecho del metabolismo del coral (Muscatine 1990, Trench 1987). Los dinoflagelados también aprovechan la alta eficiencia que posee el coral para coleccionar la luz (Enríquez et al. 2005).

En los corales encontramos albergadas comunidades de varias especies de *Symbiodinium* (Rowan et al. 1998, LaJeunesse 2002), esta composición depende de las condiciones ambientales (principalmente luz), permitiéndole

lidar con la heterogeneidad ambiental. Esto sugiere que la variabilidad espacial y temporal favorece la coexistencia de diversos simbiontes dentro de un mismo hospedero. Esta simbiosis es generalmente estable dependiendo de las condiciones ambientales, pero se ha observado que pequeños cambios ambientales pueden romper este equilibrio.

Los arrecifes de coral, a pesar de su importancia biológica y económica, actualmente se encuentran amenazados por factores locales como el desarrollo costero no planificado que causa aumento de nutrientes, sedimentos y pérdida de hábitats conectados como el manglar, y sobreexplotación de los recursos pesqueros. Adicionalmente encontramos los factores antropogénicos globales como el calentamiento global, la acidificación de los océanos y el aumento en intensidad (y posiblemente en frecuencia) de huracanes (Hoegh-Guldberg et al. 2007).

Observaciones de los últimos años han cuestionado la capacidad de los corales de aclimatarse y/o adaptarse al cambio climático global. Se ha observado que algunas especies de corales pueden asociarse con nuevas cepas de dinoflagelados simbiontes (Lewis y Coffroth 2004) resistentes al estrés térmico, pero es posible que estos genotipos provean de menos recursos a su hospedero al invertir energía en tolerar el estrés (Little et al. 2004, Sotka y Thacker 2005). Se ha reportado que la capacidad de aclimatación de los corales (capacidad fenotípica que comprende procesos que ocurren en horas o días) ha sido excedida en los últimos años y que los tiempos en los que ocurre la adaptación (capacidad genética que comprende procesos que ocurren en décadas o siglos) son más lentos respecto al tiempo con el que está ocurriendo el cambio climático, debido a que los corales y sus dinoflagelados simbiontes se encuentran en los límites genéticos de su aclimatación (Huges et al. 2003, Leggat et al. 2007a).

Es por ello que en este trabajo se buscó conocer el papel de la membrana fotosintética en la aclimatación a alta temperatura, explorando si la composición y estabilidad de la membrana fotosintética es un mecanismo que relacionado con la sensibilidad diferencial a la temperatura de dinoflagelados simbiontes y el

consecuente blanqueamiento diferencial del holosimbionte. Comprender el mecanismo de blanqueamiento permitirá predecir como los cambios en la temperatura del agua impactarán la supervivencia de los corales.

## **Antecedentes**

En los arrecifes de coral predominan las asociaciones simbióticas entre invertebrados (cnidarios) y dinoflagelados (*Symbiodinium*). La ruptura de esta simbiosis se describe como blanqueamiento y es la pérdida de coloración del hospedero por una disminución en la densidad de células de dinoflagelados simbiotes o de los pigmentos fotosintéticos en el tejido de coral (Hoegh-Guldberg 1989). El blanqueamiento es una respuesta típica al estrés ambiental (cambios en temperatura, luz, salinidad, nutrientes) y en últimos tiempos, se ha observado con mayor frecuencia a escalas masivas o geográficas, y se ha relacionádo con el incremento de 0.5°C a 1.5°C en la temperatura promedio de la superficie del mar durante varias semanas (Glynn 1993, Hoegh-Guldberg et al. 2007 y literatura citada en estos). Además del aumento en la temperatura, se se ha observado que es importante el tiempo al que el organismo estuvo expuesto a este estrés (Fitt et al. 2001), es decir, existe una correlación entre estas variables (Berkelmans y van Oppen, 2006). Ambos factores determinan si el organismo tiene capacidad de recuperarse o si el evento es letal (Iglesias-Prieto et al. 1992, Fitt et al. 2001). Exposiciones de 4°C a 5°C mayores a la temperatura promedio en verano durante 1 a 2 días, producen blanqueamiento extremo, seguido por altas tasas de mortalidad; mientras que un aumento de 2°C a 3°C durante el mismo período de tiempo, resulta en un blanqueamiento gradual menos extenso y una mortalidad menor al 10% (en Jokiel y Coles 1990).

Aunque en corales simbióticos aún existe controversia sobre sí la temperatura elevada daña primero a los tejidos animales o a las células de los dinoflagelados, la evidencia experimental demuestra que el incremento de la temepartura daña el aparato fotosintético de los dinoflagelados simbiotes (Iglesias-Prieto et al. 1992, Warner et al. 1999, Douglas 2003, Smith et al. 2005 entre otros). Iglesias- Prieto y colaboradores (1992) encontraron que en *Symbiodinium microadriaticum* la fotosíntesis se desacopla a temperaturas mayores de 30°C y se detiene completamente entre 34-36°C, observándose en

algunos casos la expulsión de células endodérmicas del hospedero conteniendo dinoflagelados simbiotes (Gates et al. 1992).

Durante un episodio de blanqueamiento de corales se puede observar que no todas las especies de coral son igualmente afectadas por el incremento de temperatura (Ulstrup et al. 2006, Penin et al. 2007), e incluso dentro de una misma especie, no todas las colonias se blanquean. Esto se ha relacionado en parte a la diferente sensibilidad térmica que tiene las diferentes especies de dinoflagelados simbiotes de corales escleractíneos (Iglesias-Prieto et al., 1992; Warner et al. 1999, Ayala, 2000, Tchernov 2004); se ha sugerido que esta sensibilidad diferencial esta relacionada con la fluidez de su membrana fotosintética (Iglesias-Prieto et al., 1992, Tchernov et al. 2004). El efecto de la temperatura sobre el aparato fotosintético ha sido estudiado por diversos autores, utilizando la fluorescencia de la clorofila *a* para conocer la estructura y función del aparato fotosintético (Govindje, 1995). Los trabajos que han utilizado esta técnica, incubando corales o dinoflagelados simbiotes a altas temperaturas, han descrito la degradación de proteínas, daño o recuperación incompleta de la proteína D1, síntesis de proteínas de estrés térmico, estrés oxidativo e inhibición de síntesis de las proteínas de la antena (Iglesias-Prieto et al. 1992, Iglesias-Prieto y Trench 1997, Warner et al. 1999, Jones et al. 1998, Takahashi et al. 2008). Esta misma técnica ha sido utilizada para determinar diferencias en la fluidez de la membrana fotosintética en cianobacterias (Chaloub et al. 2003, Aminaka et al. 2006).

La fluidez de la membrana fotosintética es de especial interés ya que determina el correcto funcionamiento de la movilidad de los acarreadores de electrones en el aparato fotosintético; esta fluidez varía de acuerdo a la temperatura (Harwood 1998). Además de la temperatura del agua que rodea al coral, la temperatura microambiental también puede ser un factor importante determinante de la fluidez de la membrana fotosintética. El flujo de agua (que permite la disipación del calor en la superficie de los corales), la pigmentación de la colonia (que puede modificar la absorción del coral) y la irradiancia fotosintéticamente activa, son parámetros que pueden determinar la temperatura



microambiental (Fabricius 2006). Por otro lado, Warner et al. (1999) demostraron que la tasa de recuperación de la proteína D1 del fotosistema II es dependiente de la temperatura y de la identidad del simbionte, hipotetizando que el estrés térmico al perturbar la estabilidad de las membranas del tilacoide podría interferir con una recuperación apropiada de D1.

Un factor que se ha estudiado como determinante de la fluidez de la membrana es su composición de ácidos grasos. Las membranas biológicas están organizadas por ensamblajes de lípidos (formados por ácidos grasos) y proteínas con pequeñas cantidades de carbohidratos. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con radicales de hidrocarburos de cadena larga. En general se ha descrito que la fluidez lipídica incrementa con el grado de insaturación de sus ácidos grasos (Voet y Voet 1999).

Se han realizado pocos trabajos describiendo la composición de ácidos grasos de dinoflagelados simbiotes. El primero de ellos, realizado por Bishop et al. (1976) describe la ultraestructura y composición de lípidos del dinoflagelado simbionte de la almeja gigante *Tridacna maxima*, encontrando que los ácidos grasos más abundantes son el ácido palmítico (C16:0), el ácido linolénico (C18:3) y el ácido octadecatetraenoico (C18:4). Posteriormente Bishop y Kendrick (1980) encuentran que los dinoflagelados simbiotes de diferentes hospederos tienen una composición de lípidos diferente. Para ese entonces, se consideraba a todos los dinoflagelados simbiotes como una sola especie descrita como *Symbiodinium microadriaticum*, por lo que los autores concluyen que estas diferencias pueden deberse a que los hospederos afectan el metabolismo de ácidos grasos del dinoflagelado, o que esta especie incluye a diversas cepas. Adicionalmente, Zhukova y Titlyanov (2003) encuentran una composición diferente de ácidos grasos de dinoflagelados simbiotes que son diferentes tipos morfofisiológicos, recién aislados de diferentes corales, proponiendo que la composición de ácidos grasos y lípidos podrían emplearse como marcadores especie-específicos. Actualmente sabemos que la diversidad morfológica y genética de los dinoflagelados simbiotes es equivalente a la descrita para dinoflagelados de vida libre de distinto orden (LaJeunesse 2001)

por lo que podemos saber que los dinoflagelados en estos estudios tenían una alta diversidad genética. Respecto a los factores ambientales, se ha observado que la composición de ácidos grasos varía respecto a luz de crecimiento, aumentando los porcentajes de ácidos grasos poli-insaturados 18:4(n-3), 20:5(n-3) y 18:5(n-3) a baja luz de crecimiento (Zukova y Titlyanov, 2006).

Tchernov et al. (2004) reportan un menor cociente C18:1/C18:4 en clones sensibles a la temperatura, comparado con clones tolerantes cuyo cociente C18:1/C18:4 es mayor. Estos mismos autores también demostraron que la proporción de ácidos grasos desaturados y/o saturados extraídos de lípidos totales está relacionado con la sensibilidad térmica de las especies de dinoflagelados simbiotes y sugieren que alguna desaturasa (enzima que adiciona dobles enlaces a los lípidos de las membranas interiores) podría estar relacionada con esta sensibilidad y que la susceptibilidad diferencial a la temperatura se debe a cambios en la vía fotosintética asociadas no con las desaturasas sino con elementos que regulan la cantidad relativa de ácidos grasos desaturados en pozas específicas.

Los dinoflagelados proveen de ácidos grasos poliinsaturados a los corales (Papina et al. 2003) y son esenciales como reserva alimenticia cuando se blanquea (Yamashiro et al. 2005). Se ha observado que durante un incremento de temperatura y luz (y no de estos factores por separado) se presenta en el coral *Montipora digitata* una disminución importante de ácidos grasos poli-insaturados (Papina et al. 2007), mas no en el dinoflagelado simbiote, lo que puede sugerir que: a) el coral es más susceptible que el simbiote a los cambios ambientales; b) el hospedero regula estos cambios para el simbiote, o c) hay un cambio en la cepa de los dinoflagelados simbiotes.

La fluidez de la membrana fotosintética también puede verse afectada por la proporción entre ácidos grasos y proteína que puede cambiar con la intensidad de luz a la que un organismo es expuesto. Por ejemplo, un organismo adaptado a crecer a alta intensidad de luz tiene menos centros de reacción para hacer fotosíntesis, y éstos se encuentran asociados a proteínas, por lo tanto

tendrá menos proteína en la membrana fotosintética comparado con un organismo adaptado a crecer a baja luz (Iglesias-Prieto y Trench, 1997).

En plantas se ha estudiado a mayor detalle esta tendencia a ajustar la composición de ácidos grasos en sus membranas, de tal modo que su fluidez permanezca relativamente constante de acuerdo a su temperatura de crecimiento (Somerville y Browse, 1996). Los mecanismos descritos para que este ajuste ocurra varían enormemente, e involucran cambios en la composición de ácidos grasos, su longitud y su grado de saturación (Harwood 1998). En plantas se ha observado en general que a alta temperatura de crecimiento hay un menor grado de saturación de los ácidos grasos (Somerville y Browse 1996). Estas observaciones también se han confirmado para la cianobacteria *Spirulina platensis* (Deshnium et al. 2000) y para la planta *Arabidopsis thaliana* (Falcone et al. 2004).

El grado de saturación de los ácidos grasos puede regularse por la expresión de genes de desaturasas (Gibson et al. 1994) que son enzimas que adicionan dobles enlaces en partes específicas de la cadena del ácido graso. Se ha encontrado para la cianobacteria *Synechocystis sp.* las desaturasas  $\Delta 6$ ,  $\Delta 12$  y  $\omega 3$  se expresan cuando hay una disminución de la temperatura (Los y Murata, 1998). Sin embargo para otras especies como *Spirulina platensis* (Deshnium et al. 2000) solo la desaturasa  $\Delta 12$  se expresa al disminuir la temperatura. En este mismo trabajo se observó que no hubo diferencias en la expresión de desaturasas a alta temperatura, indicando que quizá esa temperatura no significó un estrés para esta especie o que estas desaturasas están involucradas solo con los cambios de fluidez de membrana a baja temperatura. Como antecedente, encontramos que en *Arabidopsis thaliana* las desaturasas están codificadas por varios genes que se expresan en diferentes membranas de manera específica. El gen *FAD8*, que codifica para la desaturasa  $\omega 3$  asociada a la membrana del cloroplasto, es el único que presenta sensibilidad a la temperatura (Gibson et al. 1994). En *A. thaliana* se ha encontrado que *FAD8* incrementa la actividad de la desaturasa  $\omega 3$  en plantas que fueron expuestas a temperaturas bajas de crecimiento (Gibson et al. 1994), ésta es una respuesta

donde mediante la desaturación de los ácidos grasos la planta compensa la pérdida de fluidez por la menor temperatura. En plantas de tabaco a las que se insertó el gen *FAD7*, que es un gen localizado en el cloroplasto y codifica para la  $\omega$ 3 desaturasa, pero no es dependiente de la temperatura, Murakami et al. (2000) encontraron que la ausencia de ácidos grasos tirenóicos permite una mejor aclimatación de la planta a alta temperatura de crecimiento. Adicionalmente, otros trabajos *A. thaliana* han mostrado la importancia de la desaturación para la recuperación del fotosistema II (Vijayan y Browse, 2002) y se ha observado una mayor tasa de crecimiento a temperatura elevada en mutantes que tienen ácidos grasos saturados (Falcone et al. 2004).

Para inferir la actividad de desaturasas podemos utilizar los índices de saturación calculandos a partir de los cambios con respecto de un ácido graso a otro. Somerville y Browse (1996) reportan que el precursor del ácido graso C16:1 es el C16:0 y el precursor del ácido graso C18:1 es el C18:0. Para ambos casos es necesaria la actividad de la desaturasa 9, que se ha reportado puede estar codificada por los genes *FAD5*, *FAB2* y *FAD4* en *A. thaliana*. Para el caso del ácido graso C18:3 (n-6) su precursor es el C18:2, y la desaturación se debe a la desaturasa 6 codificada en *A. thaliana* por los genes *FAD3*, *FAD7* y *FAD8*. La activación de la expresión de estos genes puede verse modificada con cambios de temperatura (Murakami et al. 2000) como de luz (Collados et al. 2006).

## ***Hipótesis***

En dinoflagelados simbiotes, la sensibilidad diferencial a la temperatura está relacionada con la fluidez de la membrana fotosintética, que depende de la composición de ácidos grasos determinada por la actividad de desaturasas.

## ***Objetivos***

### **General**

Evaluar el papel de la fluidez de la membrana fotosintética en dinoflagelados simbiotes, como un factor involucrado en el blanqueamiento de coral.

### **Particulares**

1. Determinar la temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbiotes de corales y su relación con una sensibilidad térmica diferencial del aparato fotosintético.
2. Explorar los componentes genéticos y ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.
3. Determinar si la temperatura de fusión de la membrana fotosintética depende de la composición de ácidos grasos de membranas fotosintéticas de dinoflagelados simbiotes.

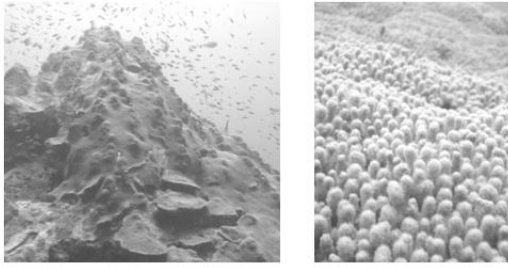
## **Metodología**

Para determinar la temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbioses de corales y su relación con una sensibilidad térmica diferencial del aparato fotosintético se trabajó con colonias de los corales *Madracis aurentenra* (con menor prevalencia de blanqueamiento) y de *Montastrea faveolata* (con mayor prevalencia de blanqueamiento) extrayendo los dinoflagelados simbioses. Se midió la cosecha cuántica máxima de separación de cargas del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en alta temperatura (35°C) para inferir la sensibilidad térmica del aparato fotosintético. Se determinó la identidad genética de los dinoflagelados simbioses.

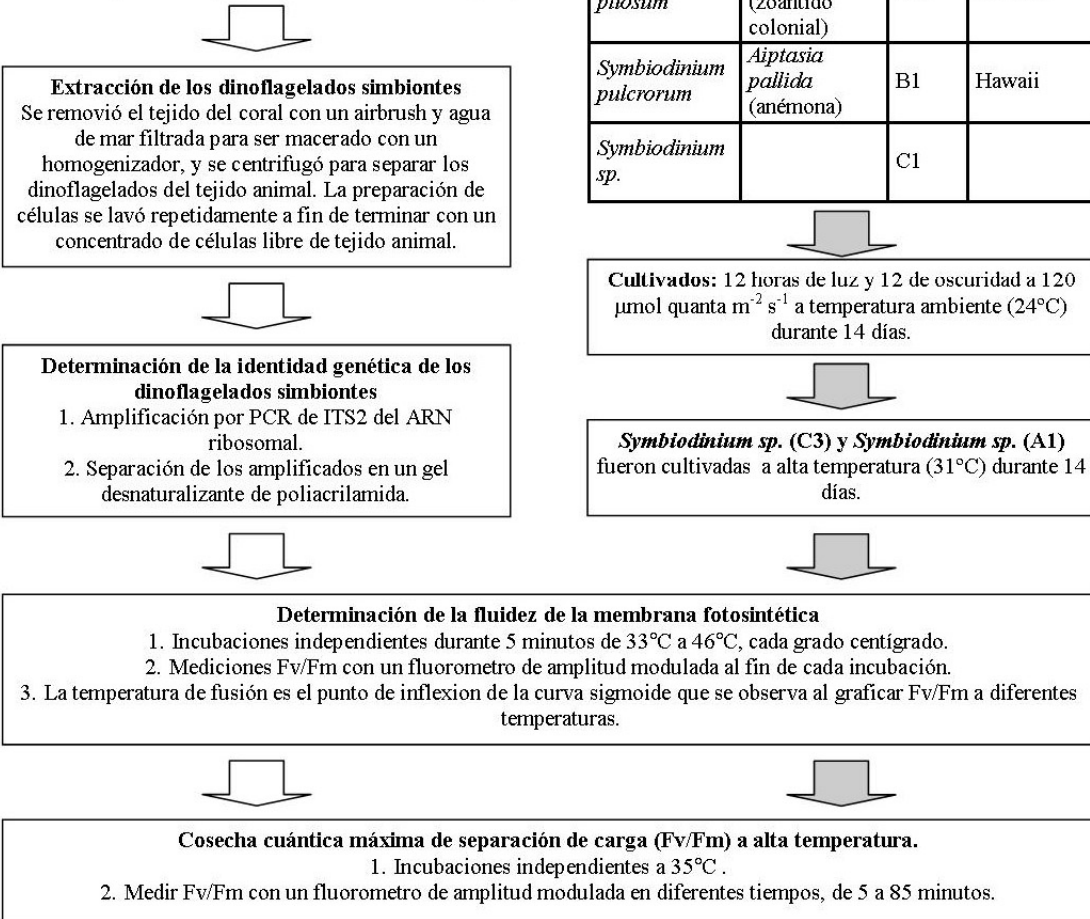
Para explorar los componentes genéticos que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética, se trabajó con cultivos de dinoflagelados simbioses que fueron aislados a partir de pocas células por lo que se podrían considerar cultivos unialgales. Se determinó la temperatura de fusión de la membrana fotosintética, de algunas de ellas se midió la cosecha cuántica máxima de separación de cargas del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en altas temperaturas (35°C) para inferir la sensibilidad térmica del aparato fotosintético. Para explorar los componentes ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética, se trabajo con los dos filotipos más sensibles a la temperatura, *Symbiodinium sp.* (A1) y *Symbiodinium sp.* (C1), crecidos a temperatura ambiente (24°C) y a temperatura alta (31°C) midiendo la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.

El siguiente esquema resume la metodología empleada para resolver estas preguntas (Fig. 1).

## Dinoflagelados recién aislados de coral



*Montastrea faveolata* (n=9) *Madracis aurentenra* (n=8)



## Cepas de dinoflagelados simbios en cultivo

Especie	Hospedero	Clado	Origen Geográfico
<i>Symbiodinium kawagutii</i>	<i>Montipora verrucosa</i> (coral escleractíneo)	F	Hawaii
<i>Symbiodinium sp.</i> (clona 53)	<i>Cassiopeia frondosa</i> (medusa)	A1	Jamaica
<i>Symbiodinium pilosum</i>	<i>Zoanthus sociatus</i> (zoántido colonial)	A2	Jamaica
<i>Symbiodinium pulchrum</i>	<i>Aiptasia pallida</i> (anémona)	B1	Hawaii
<i>Symbiodinium sp.</i>		C1	

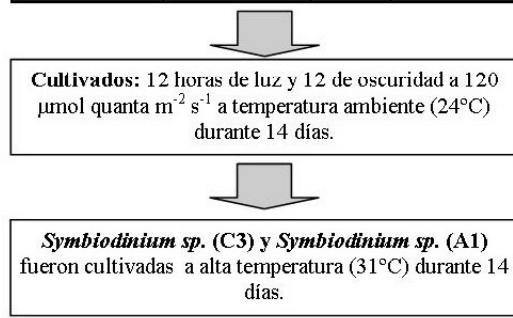


Fig. 1. Resumen de la metodología empleada para determinar la temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbios de corales y su relación con la sensibilidad térmica diferencial del aparato fotosintético y explorar los componentes genéticos y ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.

## 1. Dinoflagelados recién aislados de corales

Para aislar dinoflagelados de corales escleractíneos, se colectaron muestras con cincel y martillo de aproximadamente 2 a 4 cm<sup>2</sup> en el arrecife cercano al Acuario Marino en Curaçao (Antillas Holandesas), se mantuvieron (máximo 3 horas) en un sistema de acuarios hasta su procesamiento. Se removió el tejido del coral con un cepillo de aire y agua de mar filtrada para ser macerado con un homogenizador (IKA-Werk TP18/10 Ultra-Turrax), y se centrifugó para separar los dinoflagelados del tejido animal. La preparación de células se lavó repetidamente con agua de mar filtrada terminando con un concentrado de células libre de tejido animal que inmediatamente se ocupó en las mediciones. Para los ensayos de cosecha cuántica máxima de separación de cargas ( $F_v/F_m$ ) a 35°C se utilizó una colonia de *Madracis aurentenra* (n=2) y dos colonias de *Montastrea faveolata* (n=6). Para medir la temperatura de fusión de la membrana fotosintética se utilizaron cuatro colonias de *Madracis aurentenra* (n=8) y cuatro colonias de *Montastrea faveolata* (n=9) (Tabla 1).

Tabla 1. Colonias de coral utilizadas para determinar la fluidez de la membrana fotosintética y la cosecha cuántica máxima de separación de cargas a alta temperatura ( $F_v/F_m$  a 35°C) (n= número de corridas a partir de cada colonia indicada con letra).

Especie de Coral – Colonia	Profundidad (m)	Ensayo	n
<i>Madracis aurentenra</i> - A	11	$F_v/F_m$ a 35°C	2
		Temp. fusión membrana	4
<i>Madracis aurentenra</i> - B	15.5	Temp. fusión membrana	1
<i>Madracis aurentenra</i> - C	5.5		1
<i>Madracis aurentenra</i> - D	11		1
<i>Madracis aurentenra</i> - E	15.5		1
<i>Montastrea faveolata</i> – A	11		$F_v/F_m$ a 35°C
<i>Montastrea faveolata</i> – B	15.5	Temp. fusión membrana	4
		$F_v/F_m$ a 35°C	4
<i>Montastrea faveolata</i> – C	15.5	Temp. fusión membrana	2
		Temp. fusión membrana	2
<i>Montastrea faveolata</i> – D	6	Temp. fusión membrana	1



## **2. Determinación de la identidad genética de los dinoflagelados simbiotes de *M. faveolata* y *M. auretenra***

El ADN total fue extraído utilizando el protocolo de Gallagher (1980). El análisis de ADN ribosomal fue realizado por Dustin Kemp (University of Georgia) con un protocolo ya publicado con anterioridad (Kemp et al. 2006): la región de ITS2 del ADN ribosomal fue amplificada por PCR con los cebadores “ITSintfor2” (5'-GAA TTGCAGAACTCCGTG-3') que se alinea con una región del gen 5.8S ribosomal conservada en dinoflagelados y “ITS2CLAMP” (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCGGGATCCATA TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3'), un cebador universal modificado con una “pinza” de 39 pares de bases de GC (se observa en itálicas) (LaJeunesse y Trench, 2000). Se utilizó un protocolo de amplificación “touchdown” con una temperatura de alineación 10°C bajo la temperatura final de alineación que es 52°C incrementándose la temperatura 0.5°C cada 20 ciclos. Una vez que la temperatura de alineación alcanzó los 52°C, las muestras amplificadas se cargaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida (gradiente de 45-80% de urea-formamida, 100% con 7M de urea y 40% de formamida deionizada) y se separaron por electroforesis durante 9.5 horas a 150 volts a temperatura constante de 60 °C. Las muestras se corrieron con estándares publicados anteriormente (LaJeunesse, 2002), el gel fue teñido con Sybr Green (Molecular Probes) como lo indica el fabricante y finalmente se fotografió.

## **3. Cultivos de dinoflagelados simbiotes empleadas**

Se trabajó con dinoflagelados simbiotes en cultivo, provenientes de la colección del Dr. Robert K. Trench (UCSB), que fueron extraídos de diversos hospederos pertenecientes al phylum Cnidaria (Tabla 2). Todos los cultivos fueron crecidos en un medio definido conocido como ASP-8A (Blank, 1987) en un cuarto con condiciones controladas de luz y temperatura: 12 horas de luz y 12 de oscuridad a  $120 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a temperatura ambiente (24 °C).

Para los experimentos de temperatura elevada y composición de ácidos grasos se trabajo con los cultivos *Symbiodinium* sp. (filotipo A1) y *Symbiodinium*

*sp.* (filotipo C1), caracterizadas como las más sensibles a la temperatura comparadas con los otros cultivos estudiados. Esta última fue donada por el Dr. William Fitt de la Universidad de Georgia. Los cultivos fueron crecidos por triplicado durante 14 días, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad (medido con un sensor  $4\pi$ ) en medio ASP-8A (Blank, 1987) a 24°C. El cultivo se inició a 28°C, incrementando la temperatura 1°C por día hasta llegar a 31°C.

Tabla 2. Cultivos utilizados en este estudio (n= número de ensayos realizados).

Cultivo	Hospedero	Filotipo	Origen Geográfico	n (Temperatura de fusión de la membrana fotosintética)	n (Fv/Fm a 35°C)
<i>Symbiodinium kawagutii</i>	<i>Montipora verrucosa</i> (coral escleractíneo)	F	Hawaii	3	3
<i>Symbiodinium sp. (clona 53)</i>	<i>Cassiopeia frondosa</i> (medusa)	A1	Jamaica	4	-
<i>Symbiodinium pilosum</i>	<i>Zoanthus sociatus</i> (zoántido colonial)	A2	Jamaica	3	3
<i>Symbiodinium pulcrorum</i>	<i>Aiptasia pallida</i> (anémona)	B1	Hawaii	3	-
<i>Symbiodinium sp.</i>	<i>Acropora sp.</i>	C1	Okinawa	3	-

#### 4. Cosecha cuántica máxima de separación de cargas (*Fv/Fm*) a alta temperatura.

Por otro lado, se hicieron mediciones de *Fv/Fm* a temperatura elevada (35°C) en incubaciones prolongadas (85 minutos) como un estimador de la sensibilidad térmica del aparato fotosintético de los dinoflagelados simbioses. De una solución de  $1 \times 10^6$  cels/ml en agua de mar o en medio de cultivo según el caso, se tomaron cuatro alícuotas de 500  $\mu$ l por ensayo para medir *Fv/Fm* con un fluorómetro de amplitud modulada (diving PAM). Tres de las alícuotas se

incubaron a 35°C y una se mantuvo a temperatura ambiente (24°C), midiendo este parámetro a los 5, 10, 25, 35, 55 y 85 minutos, desechando la muestra al final de cada incubación. Se calculó  $Fv/Fm$  relativo a cada alícuota que se mantuvo a temperatura ambiente, y se realizó un ajuste a una curva exponencial con el programa Peakfit, de la forma  $f(x) = a \cdot e^{-x/b}$  donde  $a$  es la amplitud y  $b$  es la tasa de cambio,.

## **5. Determinación de la temperatura de fusión de la membrana fotosintética**

Se probaron varias técnicas con el fin de separar el efecto fisiológico de la temperatura del efecto de la medición misma en la estimación adecuada de la temperatura de fusión de la membrana. En este caso, las temperaturas utilizadas para este propósito son experimentales, buscando sólo la respuesta a la fluidez de la membrana fotosintética y no a otros procesos que tienen tiempos de ocurrencia mas largos.

La metodología descrita a continuación nos permitió medir adecuadamente la temperatura de fusión de la membrana fotosintética. Es importante recalcar que la independencia de las muestras durante las mediciones resultó ser un factor crítico. De una solución de  $1 \times 10^6$  cels/ml (disueltas en agua de mar en el caso de los dinoflagelados recién aislados y en medio de cultivo en el caso de los dinoflagelados en cultivo) se tomaron tres alícuotas de 100  $\mu$ l por tratamiento para ser incubadas durante 5 minutos en un termociclador Applied Biosystems a distintas temperaturas (33°C a 46°C cada grado centígrado) y una alícuota a temperatura ambiente (25°C). Al término de cada incubación se midió la fluorescencia de la clorofila  $a$  con un fluorómetro de amplitud modulada (diving PAM) desechando posteriormente la muestra. Se calculó  $Fv/Fm$  relativo al valor obtenido a temperatura ambiente, y se realizó un ajuste empleando el programa Peakfit, a una curva sigmoide,  $f(x) = a(1 - (1 / (1 + e^{-((x-b)/c)})))$  donde  $a$  es la amplitud,  $b$  el centroide y  $c$  el ancho. El centroide de esta curva sigmoide representa la temperatura a la que se funde la membrana

fotosintética (referido en este trabajo como temperatura de fusión de la membrana fotosintética).

## 6. Determinación de la composición de ácidos grasos en membranas celulares.

Para determinar si la temperatura de fusión de la membrana fotosintética depende de la composición de ácidos grasos, se obtuvo la composición de ácidos grasos de dinoflagelados simbiotes de los dos filotipos cuya temperatura de fusión de membrana fotosintética fue menor, *Symbiodinium sp.* (A1) y *Symbiodinium sp.* (C1). Los dinoflagelados se cultivaron a temperatura ambiente (24°C) y a alta temperatura (31°C), analizando de ambos tratamientos la composición de las células completas y de una fracción enriquecida de membranas fotosintéticas. El esquema a continuación resume esta metodología (Fig. 2).

### Cepas de dinoflagelados simbiotes en cultivo

Especie	Hospedero	Clado	Origen Geográfico
<i>Symbiodinium sp.</i> (clona 53)	<i>Cassiopeia frondosa</i> (medusa)	A1	Jamaica
<i>Symbiodinium sp.</i>		C3	

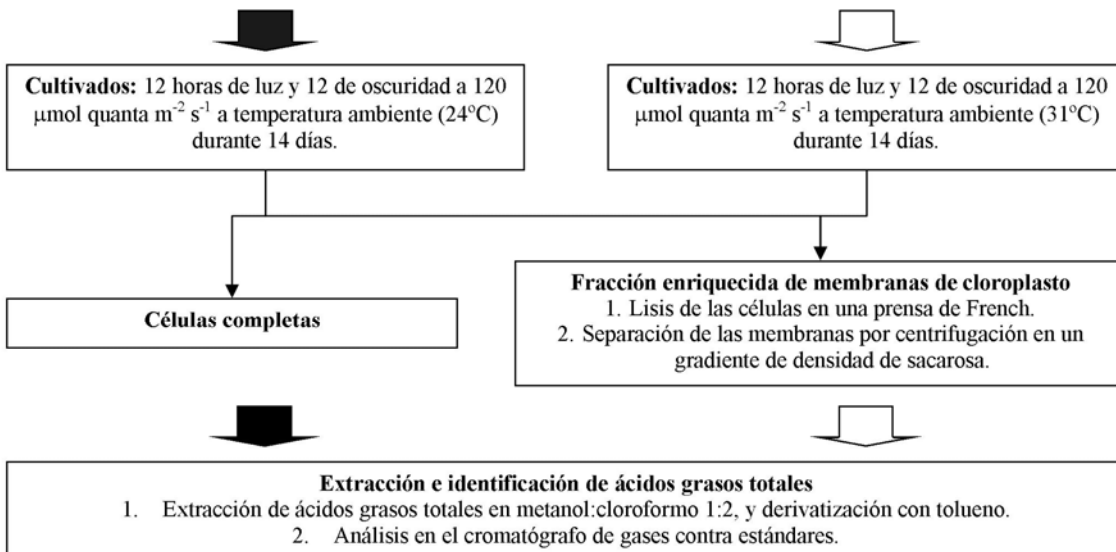


Fig. 2. Resumen de la metodología empleada para determinar la composición de ácidos grasos totales de células completas y de una fracción enriquecida de membranas de cloroplasto.

## 7. Fracción enriquecida de membranas fotosintéticas

Los cultivos fueron colectados por centrifugación. El método de extracción de las membranas de cloroplasto fue modificado a partir de Iglesias et al. (1993). La pastilla celular fue resuspendida en buffer TB (100mM Tris-borato pH 8.0, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM Na<sub>2</sub> EDTA, 1mM de fenilmetilsulfonil fluoruro) y las células fueron lisadas al ser pasadas dos veces por una prensa de French (7X10<sup>6</sup>Pa). El lisado fue centrifugado a 36,000 rpm durante 1 hora. La pastilla fue resuspendida en buffer TB purificándola en un gradiente de densidad de sacarosa (5, 10, 15 y 20%), se centrifugó durante 3 horas a 36,000 rpm a 4°C. La pastilla fue resuspendida en TB y almacenada a -70°C hasta su análisis.

## 8. Extracción e identificación de ácidos grasos totales

Se analizaron los ácidos grasos totales de células completas y de una fracción enriquecida de membranas fotosintéticas. Estos fueron extraídos en una mezcla de metanol:cloroformo 1:2, y derivatizándose posteriormente con tolueno (Ver Anexo para protocolo detallado). Se resuspendieron en hexano para ser analizados en el cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 (Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología) utilizándose las mezclas de estándares FAME MIX GLC-10 (Supelco) y FAME MIX GLC-50 (Supelco). Adicionalmente por separado se analizaron los estándares  $\alpha$ -ácido linoléico (C18:3  $\omega$ 6),  $\gamma$ -ácido linoléico (C18:3  $\omega$ 3), ácido vaccenico (C18:3 n-9 trans), ácido eledico (C18:3 n-7 cis), ácido linoledico (C18:3 n-9 cis) y ácido esteridonico (C18:4 n-3) para la identificación precisa de los ácidos grasos. De los ácidos grasos identificados, se determinó que correspondía al 100% de los ácidos grasos, calculandose así el porcentaje correspondiente los cada uno de los ácidos grasos. Posteriormente, los datos fueron transformados por arcoseno para cumplir los requisitos de la prueba (Zar 1999), y se comprobó la homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Levene. Se realizó una ANOVA de una vía para cada ácido graso bajo los distintos tratamientos (*Symbiodinium sp.* C1 célula completa @24°C, *Symbiodinium sp.* C1 célula completa @31°C, *Symbiodinium sp.* C1 cloroplasto @24°C, *Symbiodinium sp.*

C1 cloroplasto @31°C, *Symbiodinium sp.* A1 célula completa @24°C, *Symbiodinium sp.* A 1 célula completa @31°C, *Symbiodinium sp.* A 1 cloroplasto @24°C, *Symbiodinium sp.* A 1 cloroplasto @31°C). Cuando la ANOVA mostró diferencias significativas, se uso la prueba post-hoc de Fisher para identificar los tratamientos que mostraron diferencias (Stat Soft, Inc. 2003). Al realizar comparaciones con otros trabajos ya publicados, los datos fueron calculados usados dandoles el mismo tratamiento aqui explicado.

A partir de las concentraciones de algunos ácidos grasos, la actividad de diversas enzimas fue inferida con los siguientes índices (Tabla 3). Adicionalmente se hicieron agrupaciones para encontrar patrones en la composición de ácidos grasos (Tabla 4).

Tabla 3. Índices de actividad de desaturasas y elongasas inferidas a partir de las concentraciones de sus sustratos y productos.

<b>Índice</b>	<b>Fórmula</b>
$\Delta 9$ -desaturasa (C16)	$(C16:1(n-9) / (C16:0 + C16:1(n-9))) \times 100$
$\Delta 9$ -desaturasa (C18)	$(C18:1(n-9c) / (C18:0 + C18:1(n-9c))) \times 100$
$\Delta 15$ -desaturasa (C18)	$C18:3(n-9) / (C18:2(n-9) + C18:3(n-9)) \times 100$
$\Delta 6$ -desaturasa (C18)	$C18:4 / (C18:3(n-9) + C18:4) \times 100$
$\Delta 4/\Delta 5$ desaturasa (C22)	$C22:6(n-3) / (C22:5(n-3) + C22:6(n-3)) \times 100$
elongasa C16:0 y C18:0 → C16:1 y C18:1	$(C16:1(n-9) + C18:1(n-9c)) / (C16:0 + C16:1(n-9) + C18:0 + C18:1(n-9c)) \times 100$

Tabla 4. Agrupaciones de ácidos grasos de acuerdo a su grado de saturación y longitud.

<b>Grupo</b>	<b>Fórmula</b>
Ácidos grasos saturados	$C16:0 + C18:0$
Ácidos grasos monosaturados	$C18:1 (n-9t) + C18:1 (n-9c) + C18:1 (n-7c) + C20:1$
Ácidos grasos poli-insaturados	$C18:2 (n-9) + C18:3 (n-9) + C18:4 + C22:5 (n-3) + C22:6 (n-3)$
$\Sigma C16$	$C16:0 + C16:1(n-9)$
$\Sigma C18$	$C18:0 + C18:1 (n-9t) + C18:1 (n-9c) + C18:1 (n-7c) + C18:2(n-9) + C18:3(n-9) + C18:4$
$\Sigma C22$	$C22:5(n-3) + C22:6(n-3)$

## ***Resultados***

### **1. Determinación de la temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbiotes de corales y su relación con la sensibilidad térmica del aparato fotosintético.**

Midiendo la  $F_v/F_m$  en incubaciones cortas (5 minutos) a altas temperaturas, se infirió el cambio de estado físico o temperatura de fusión de la membrana fotosintética. El cambio de estado físico es un proceso cooperativo por lo que a una temperatura determinada (en el caso de la figura 3, a 37°C), se observa un incremento repentino de  $F_o$  (fluorescencia basal que es una medida de la eficiencia con la que la antena transfiere los excitones con el centro de reacción) debido al desacoplamiento del fotosistema II donde los centros de reacción ya no están disponibles para capturar excitones infiriéndose que ocurre una desconexión entre las antenas y el fotosistema II disminuyendo la eficiencia de separación de carga. Al dar un pulso de luz saturante, se obtiene  $F_m$ , valor donde la fluorescencia es máxima. Con este valor se calcula  $F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$ . Este aumento de  $F_o$  se refleja en la caída de  $F_v/F_m$  (Fig. 3).

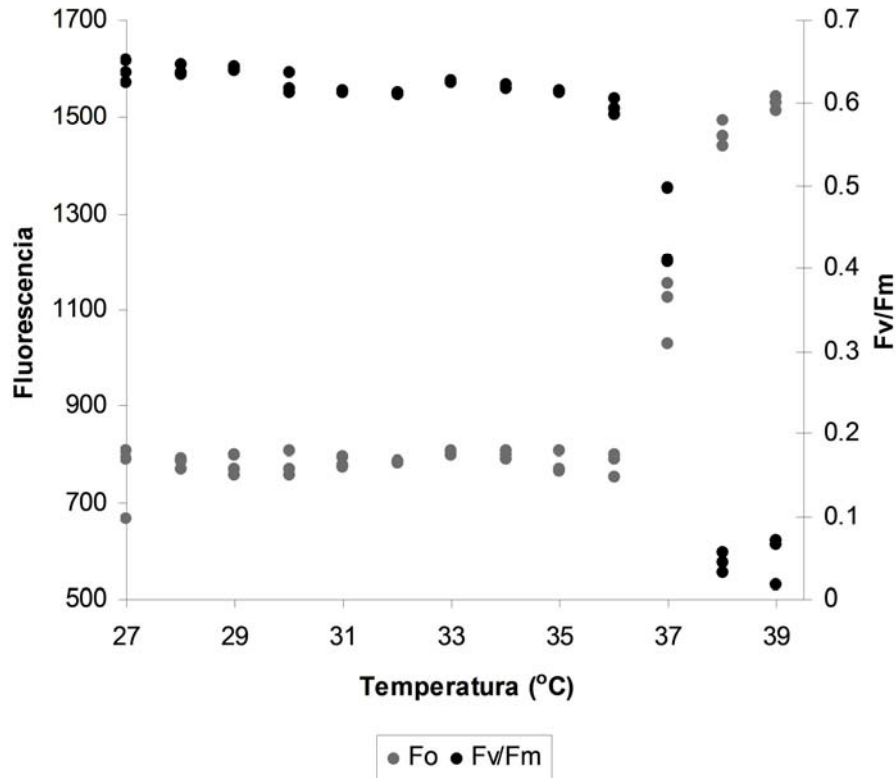


Fig. 3. Mediciones de  $F_o$  y  $F_v/F_m$  en cultivos de *Symbiodinium sp.* (filotipo A1) en muestras por triplicado e independientes, después de 5 minutos de incubación a la temperatura señalada en el eje x.

La temperatura de fusión de las membranas fotosintéticas medida experimentalmente en dinoflagelados simbioses recién aislados de los corales *Madracis aurentenra* y de *Montastrea faveolata* fue significativamente diferente (Fig. 4) teniendo *Montastrea faveolata* una menor temperatura de fusión ( $38.8^{\circ}\text{C}$ ) que *Madracis aurentenra* ( $42.4^{\circ}\text{C}$ ).

Por otro lado, al medir  $F_v/F_m$  a  $35^{\circ}\text{C}$  como un estimador de la sensibilidad térmica del aparato fotosintético de los dinoflagelados simbioses, se observó una caída de este parámetro en el tiempo, siendo el doble de pronunciada para *Montastrea faveolata* en comparación con *Madracis aurentenra* (ver Fig. 5). Si a partir de la ecuación que describe esta gráfica calculamos el tiempo en que  $F_v/F_m$  llegaría a un valor del 50%, a *Montastrea faveolata* le tomaría 151.9 minutos mientras que *Madracis aurentenra* alcanzaría ese valor en 356.6 minutos.



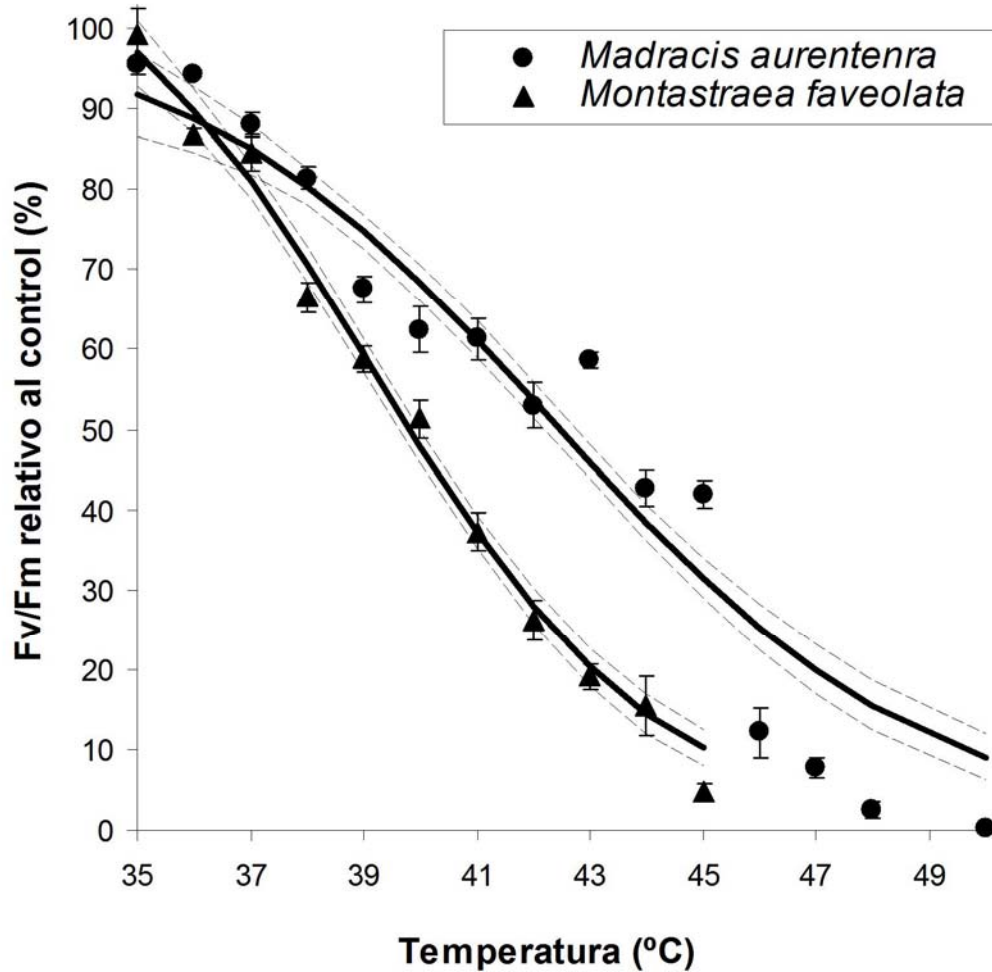


Fig. 4. Curva de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados recién aislados de corales arrecifales. El indicador  $F_v/F_m$  se calculó relativo a muestras ( $1 \times 10^6$  cel/ml) a  $24^\circ\text{C}$ , en incubaciones cortas (5 min) e independientes para cada temperatura de incubación. Los símbolos denotan el promedio y las barras la desviación estándar, de simbiontes extraídos de *Madracis aurentenra* ( $n=8$ ) y *Montastrea faveolata* ( $n=9$ ). Cada ensayo se hizo por triplicado.

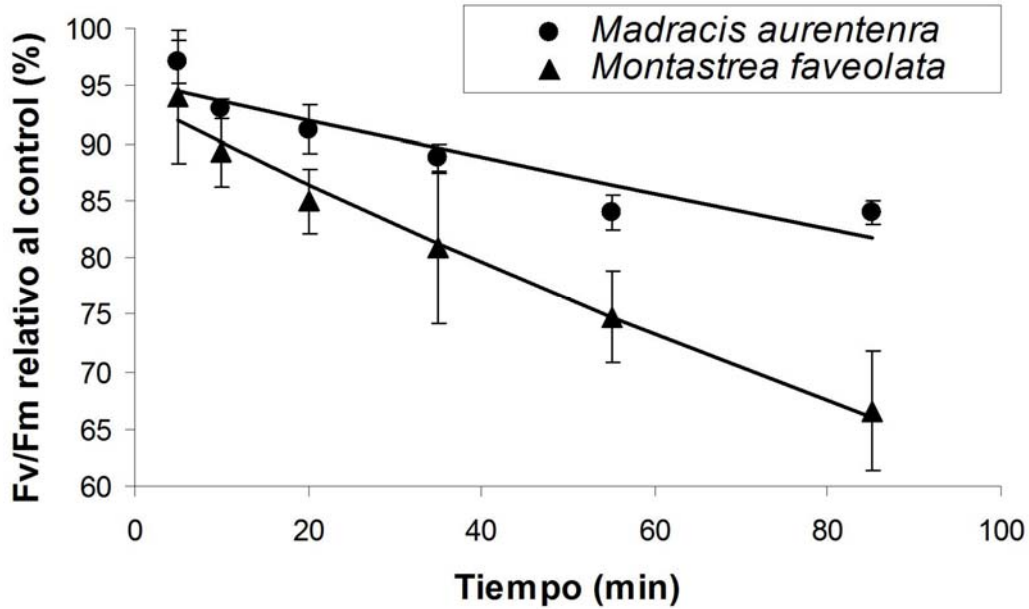


Fig. 5. Sensibilidad térmica del aparato fotosintético en dinoflagelados incubados a temperatura alta.  $F_v/F_m$  relativo a un control a temperatura ambiente ( $24^{\circ}\text{C}$ ), en muestras incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  de mediciones independientes a los 5, 10, 20, 35, 55 y 85 minutos para dinoflagelados recién aislados de *Madracis aurentenra* ( $n=2$ ) y *Montastrea faveolata* ( $n=6$ ) repitiendo cada ensayo por triplicado.

## 2. Exploración de los componentes genéticos y ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.

Con el fin de evaluar y distinguir el posible efecto de los componentes genéticos y ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética se hicieron dos tipos de ensayos. Por un lado, se emplearon dinoflagelados simbiotes en cultivo, a fin de eliminar posibles mezclas de genotipos en dinoflagelados recién aislados, crecidos en iguales condiciones de temperatura y luz determinando así posibles diferencias genéticas. Por otro lado, se utilizaron los dos filotipos que mostraron la menor temperatura de fusión de la membrana fotosintética en el ensayo anterior, creciéndolas en condiciones diferenciales de temperatura ( $24^{\circ}\text{C}$  y  $31^{\circ}\text{C}$ ) para

evaluar el efecto de la alta temperatura de crecimiento en la estabilidad de la membrana fotosintética.

Para evaluar las diferencias genotípicas de la temperatura de fusión de las membranas fotosintéticas, ésta se midió experimentalmente en cinco cultivos monoclonales de dinoflagelados simbiotes cultivados en iguales condiciones de luz y temperatura, empleando como indicador  $F_v/F_m$  en incubaciones cortas. Los resultados muestran que existen diferencias significativas en la temperatura de fusión de la membrana fotosintética entre los diversos tipos de dinoflagelados estudiados (Fig. 6). Estas diferencias abarcan un rango de sensibilidad de 4.7°C entre filotipos; el cultivo con la menor temperatura de fusión de la membrana fotosintética fue *Symbiodinium sp.* (A1) (36.4° C), y con la mayor temperatura de fusión de la membrana fotosintética fue *Symbiodinium kawagutii* (F) (41.1°C).

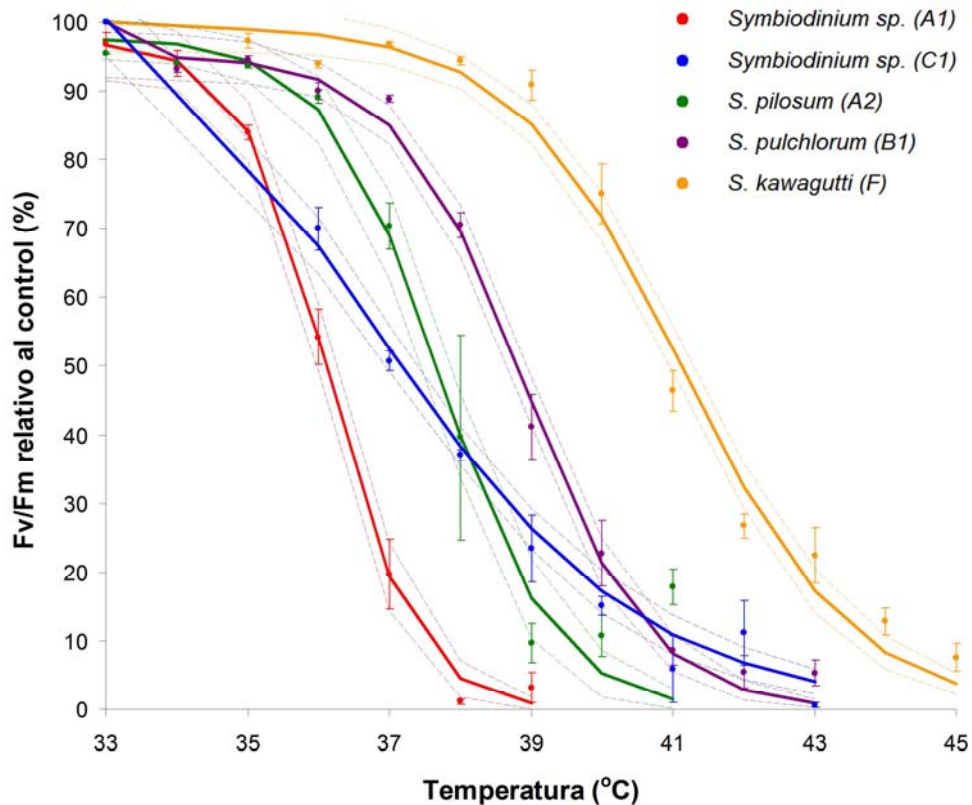


Fig. 6. Curva de fusión de la membrana fotosintética para dinoflagelados en cultivo. Los puntos denotan el promedio y las barras denotan la desviación estándar. *Symbiodinium kawagutii* (F) n=3, *Symbiodinium sp.* (A1) n=4, *Symbiodinium pilosum* (A2) n=3, *Symbiodinium pulchrorum* (B1) n=3, *Symbiodinium sp.* (C1) n=3.

Se tomaron dos cultivos, una con alta temperatura de fusión, *S. kawagutti*, y *S. pilosum*, con intermedia temperatura de fusión (3.5°C de diferencia en la temperatura de fusión), midiendo  $F_v/F_m$  durante el tiempo a alta temperatura (35°C) como indicador de su sensibilidad térmica del aparato fotosintético. Se observó una caída diferencial de este parámetro (Fig. 7) siendo mayor para *S. pilosum* en comparación con *S. kawagutti*. Si a partir de la ecuación que describe esta gráfica calculamos el tiempo en que  $F_v/F_m$  llegaría a un valor del 50%, a *S. pilosum* le tomaría 127.7 minutos mientras que *S. kawagutti* alcanzaría ese valor en 288.5 minutos. Los resultados permiten concluir hasta este punto, que la sensibilidad térmica del aparato fotosintético y la temperatura de fusión de las membranas fotosintéticas en dinoflagelados simbiotes parecen tener un fuerte componente genético.

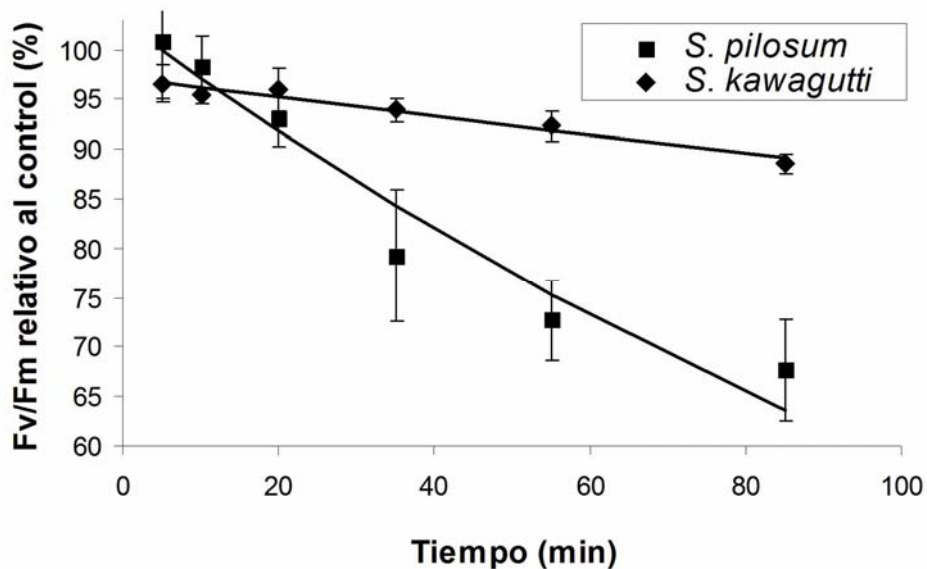


Fig. 7. Sensibilidad térmica del aparato fotosintético de la membrana fotosintética en función del tiempo de exposición.  $F_v/F_m$  relativo a un control a temperatura ambiente (24°C), en muestras incubadas a 35°C. Se realizaron mediciones independientes a los 5, 10, 20, 35, 55 y 85 minutos para dinoflagelados en cultivo. Los puntos denotan el promedio y las barras denotan la desviación estándar. *Symbiodinium kawagutti* (F) n=3, *Symbiodinium pilosum* (A2) n=3.

Para evaluar el efecto de la temperatura de crecimiento en la temperatura de fusión de la membrana fotosintética, se utilizó *Symbiodinium sp.* (A1) (temperatura de fusión de la membrana= 36.4°C) y *Symbiodinium sp.* (C1) (temperatura de fusión de la membrana= 36.6°C) midiendo la temperatura de fusión de membrana fotosintética crecidos a temperatura ambiente y a 31°C. Se observó un incremento significativo en la temperatura de fusión de la membrana fotosintética en los cultivos crecidos a alta temperatura. Es importante destacar que este incremento fue mayor para *Symbiodinium sp.* (A1) que aumentó su temperatura de fusión en 4.5°C, y menor en *Symbiodinium sp.* (C1) que aumentó en 3°C (Fig. 8). Si bien estos resultados indican un efecto de aclimatación dependiente de la temperatura de crecimiento, más bien refuerzan al componente genético como principal responsable de la sensibilidad térmica diferencial que presentan los dinoflagelados simbiotes.

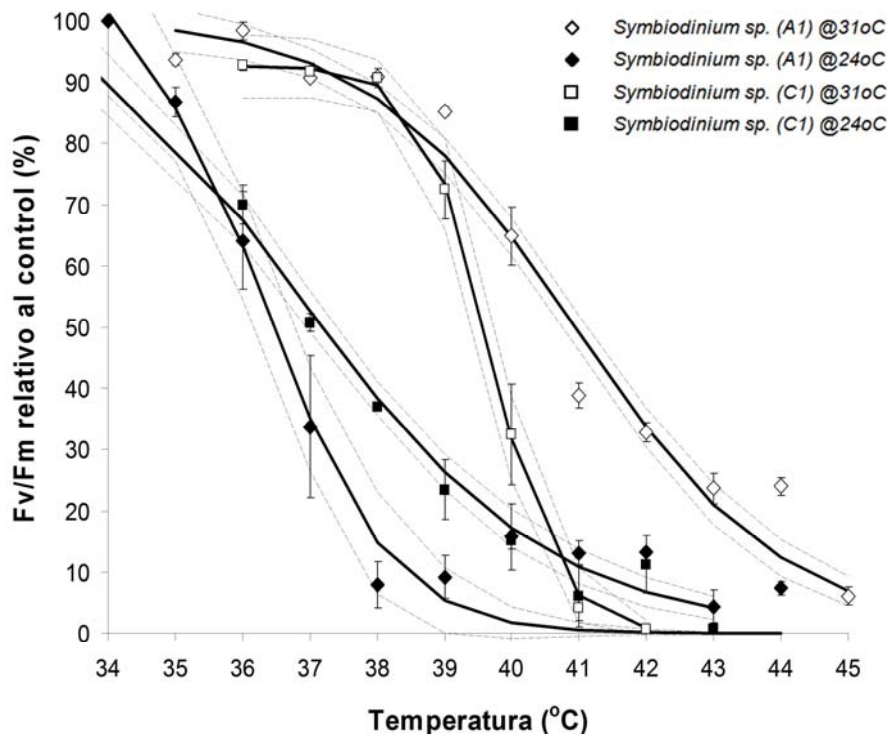


Fig. 8. Curva de fusión de la membrana fotosintética de *Symbiodinium sp.* C1 (cuadrados) y *Symbiodinium sp.* A1 (rombos), crecidos a 24°C (relleno) y a 31°C (vacío). Los puntos denotan el promedio y las barras denotan la desviación estándar.

### **3. Composición de ácidos grasos de células completas y de membranas fotosintéticas de dinoflagelados simbiotes cultivados en condiciones diferenciales temperatura**

#### **3.1 Composición de ácidos grasos totales de células completas**

Los ácidos grasos en membranas celulares más abundantes para ambos filotipos fueron C16:0 (30 a 34%), C18:0 (20 a 21%) y C18:1(n-9c) (15%) encontrando una diferencia entre filotipos solamente en cuanto a los ácidos grasos poli-insaturados, siendo el más abundante C18:4 en *Symbiodinium sp.* (A1) (11%) (Fig. 9) y C18:3 en *Symbiodinium sp.* (C1) (5%) (Fig. 10). Para ambos filotipos la abundancia relativa de C22:6 fue muy similar a la de los C18 poli-insaturados, es decir a C18:4 en *Symbiodinium sp.* (A1) y a C18:3 en *Symbiodinium sp.* (C1). Dentro de los ácidos grasos monosaturados de 18 carbonos, la clase C18:1 (n-9c) fue el más abundante en ambos dinoflagelados. Se encontraron diferencias significativas entre filotipos en la abundancia relativa de la célula completa de los siguientes ácidos grasos C18:1(n-7c) ( $p=0.02$ ), C18:3(n-9) ( $p=.007$ ), C18:4 ( $p=0.03$ ).

Dado que estas diferencias incluyen ácidos grasos poli-insaturados, se calcularon índices de desaturación que sugieren actividad de desaturasas, encontrando que el correspondiente a la  $\Delta 6$ -desaturasa (que desatura ácidos grasos trioicos como C18:3 a C18:4) tiene una actividad significativamente diferente entre ambos filotipos (Fig. 11). Esta actividad fue mayor en *Symbiodinium sp.* (A1) lo cual es reflejo de las abundancias relativas de los ácidos grasos C18:3(n-9) y C18:4 ya que este filotipo tiene mayor cantidad de C18:4 comparada con *Symbiodinium sp.* (C1). El hecho de que se infiera una menor actividad de esta desaturasa en *Symbiodinium sp.* (C1) corresponde a una mayor abundancia relativa observada en C18:3 (n-9) para este filotipo.

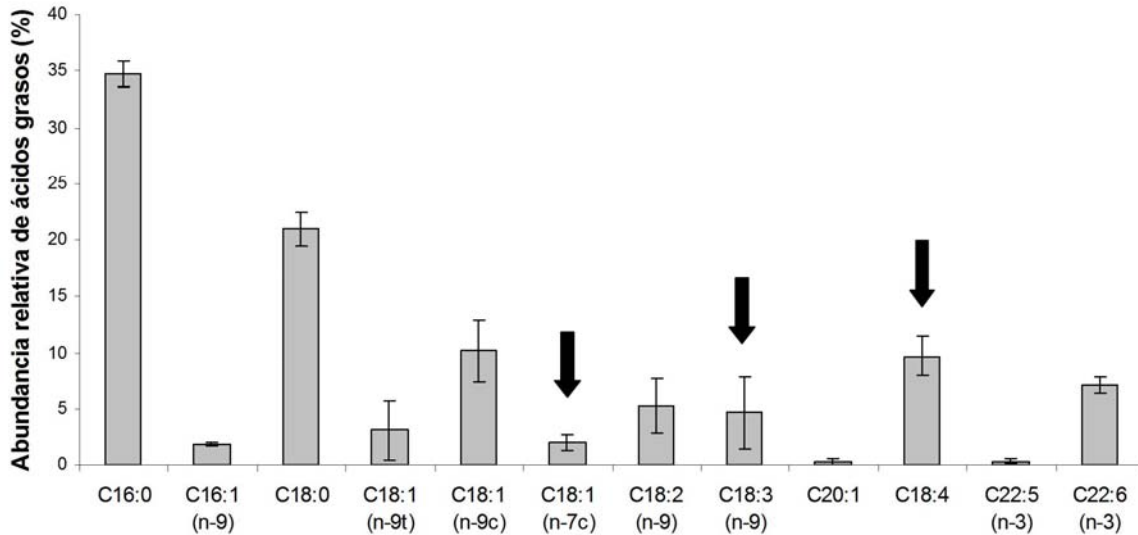


Fig. 9. Abundancia relativa (%) de ácidos grasos totales extraídos de células completas de *Symbiodinium* sp. (A1) crecida a 24°C (n=3). Las flechas indican los ácidos grasos significativamente diferentes al comparar contra *Symbiodinium* sp. (C1).

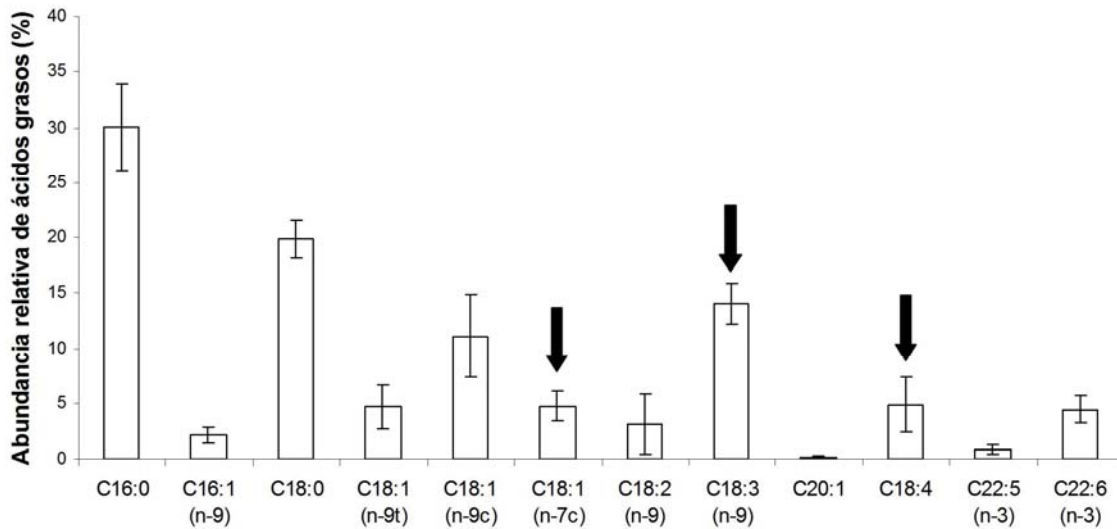


Fig. 10. Abundancia relativa (%) de ácidos grasos totales extraídos de células completas de *Symbiodinium* sp. (C1) crecida a 24°C (n=3). Las flechas indican los ácidos grasos significativamente diferentes al comparar contra *Symbiodinium* sp. (A1).

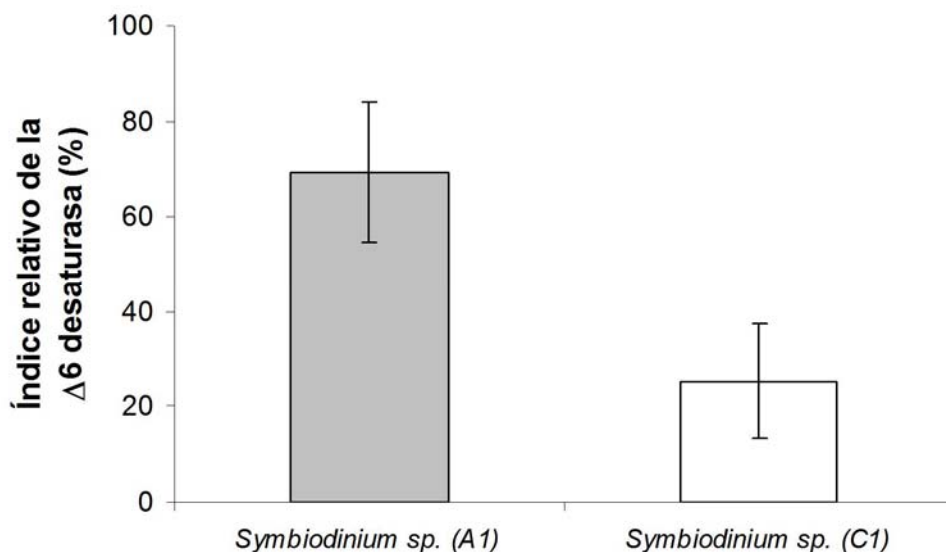


Fig. 11. Índice de desaturación relativo para la  $\Delta 6$  desaturasa, en *Symbiodinium sp. (C1)* (n=3) y *Symbiodinium sp. (A1)* (n=3) cultivados a 24°C. Las barras denotan la desviación estándar.

### 3.2 Composición de ácidos grasos totales de cloroplastos

Para *Symbiodinium sp. (A1)* los ácidos grasos más abundantes en la fracción enriquecida de cloroplastos son C16:0, C18:0, C18:4 y C22:6(n-9) (Fig. 12). Para *Symbiodinium sp. (C1)* los ácidos grasos más abundantes son C16:0, C18:0 y C18:1(n-9c) (Fig. 13).

Los ácidos grasos más abundantes en ambos filotipos, en la fracción enriquecida de cloroplastos son C16:0 y C18:0. Se encontraron diferencias significativas en la abundancia relativa de los ácidos grasos C16:0 (p= 0.004), C18:1(n-9c) (p=0.02), C18:4 (p=0.04), C22:6 (n-3) en la fracción enriquecida de cloroplastos entre los dos filotipos siendo más abundante C16:0 y C18:4 en *Symbiodinium sp. (A1)* que en *Symbiodinium sp. (C1)*, y más abundante C18:1(n-9c) y C22:6 (n-3) en *Symbiodinium sp. (C1)* que en *Symbiodinium sp. (A1)* (Fig. 12 y 13).



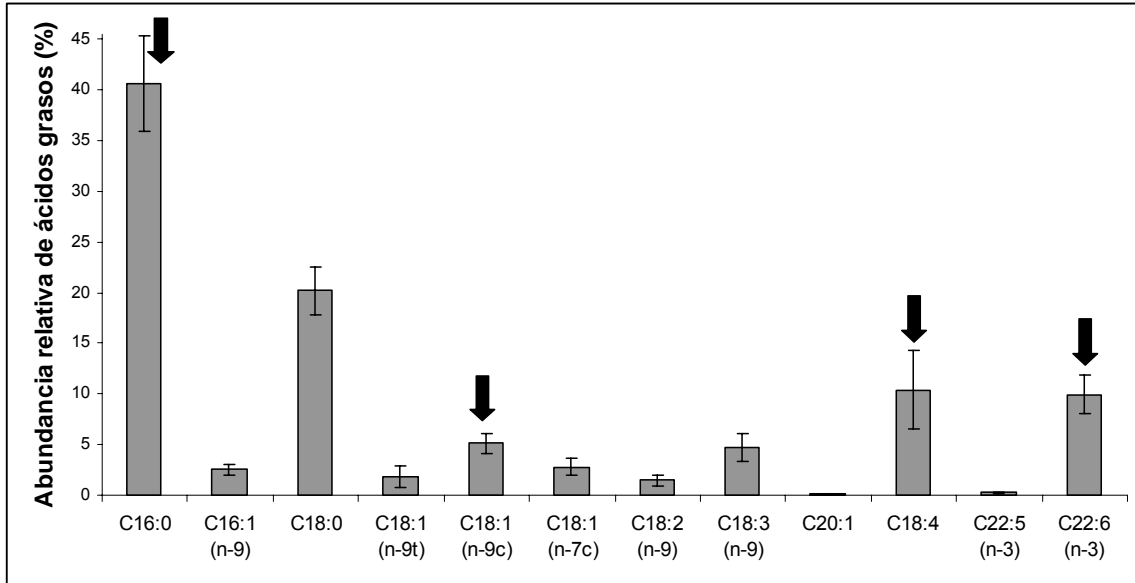


Fig. 12. Abundancia relativa (%) de ácidos grasos totales extraídos de una fracción enriquecida en cloroplastos de *Symbiodinium sp.* (A1) crecida a 24°C (n=3). Las flechas indican los ácidos grasos significativamente diferentes al comparar contra *Symbiodinium sp.* (C1).

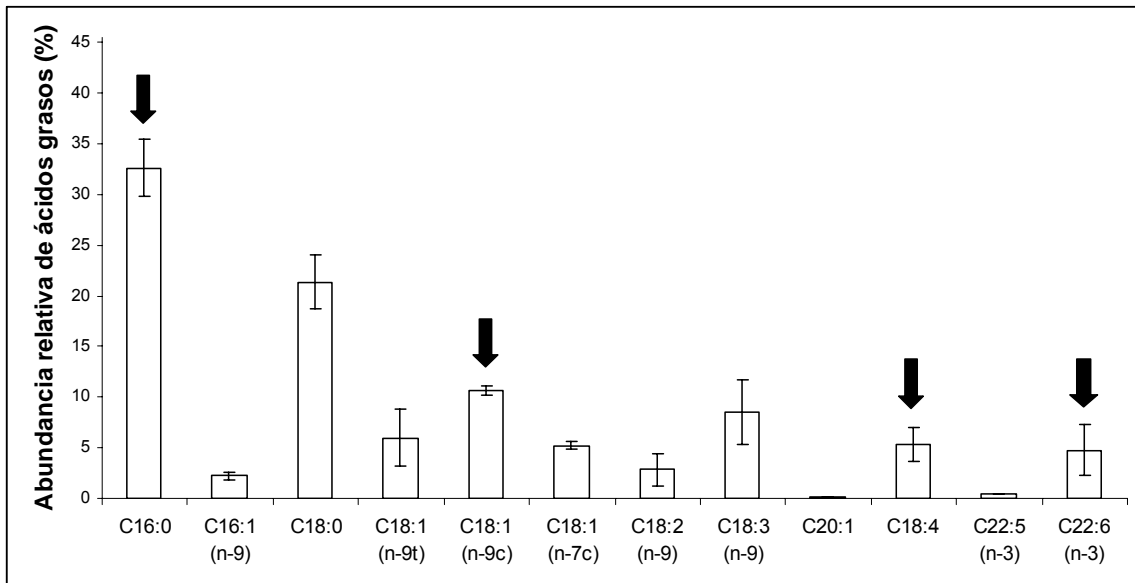


Fig. 13. Abundancia relativa de ácidos grasos totales de una fracción enriquecida en cloroplastos de *Symbiodinium sp.* (C1) crecida a 24°C (n=3). Las flechas indican los ácidos grasos significativamente diferentes al comparar contra *Symbiodinium sp.* (A1).

Al comparar el grado de saturación de los ácidos grasos por filotipo, y calcular los índices que sugieren actividad de desaturasas, no encontramos

diferencias significativas. Sin embargo, al comparar la longitud de los ácidos grasos por filotipo y calcular índices de alargamiento, se observan diferencias significativas en la elongasa, enzima que alarga los ácidos grasos C16:0 y C18:0 a C16:1 y C18:1 respectivamente (Fig. 14). En la Fig. 15 se muestran las abundancias relativas de ácidos grasos agrupados por longitud, en donde se observa que *Symbiodinium sp.*(A1) tuvo mayor abundancia de C16 y C22 y *Symbiodinium sp.*(C1) presentó mayor abundancia de C18. Los resultados calculados para el índice de alargamiento (Fig. 14), concuerdan con las diferencias significativas observadas de los ácidos grasos agrupados por longitud (Fig. 15), donde *Symbiodinium sp.*(C1) presentó una mayor actividad de la elongasa comparado con *Symbiodinium sp.* (A1), lo que es consistente con la mayor abundancia de estos ácidos grasos.

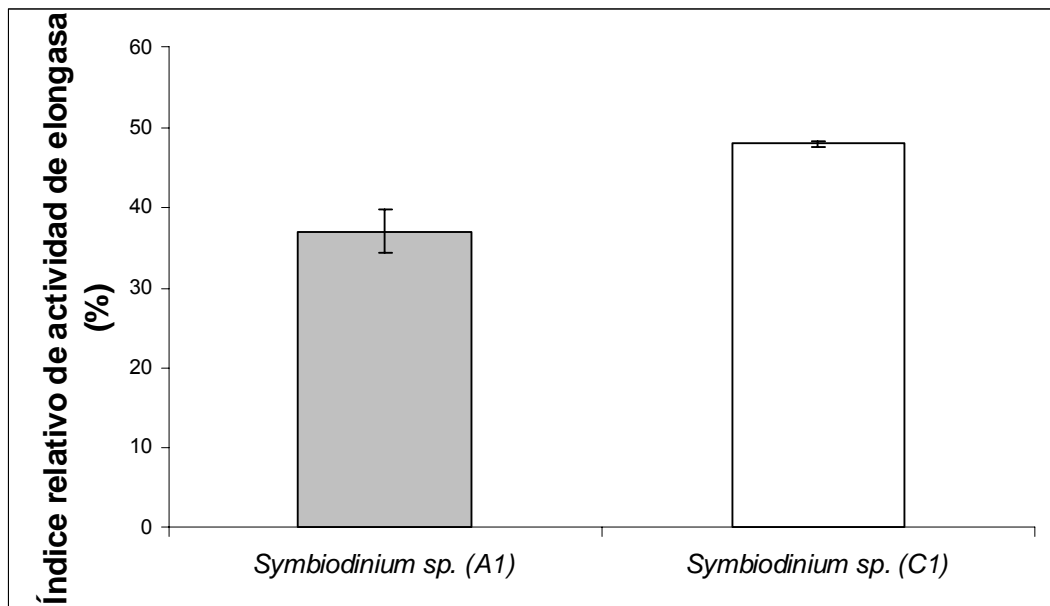


Fig. 14. Índice relativo de actividad para la elongasa que alarga ácidos grasos C16 a C18 en fracción enriquecida de cloroplastos, para *Symbiodinium sp.* (C1) (n=3) y *Symbiodinium sp.* (A1) (n=3) crecidas a 24°C. Las barras denotan la desviación estándar.

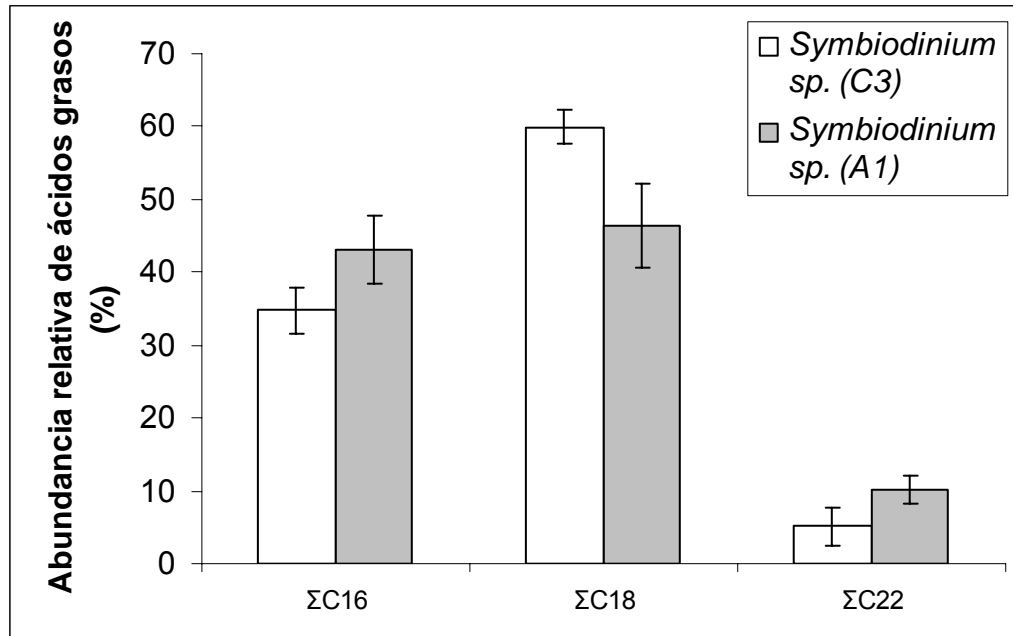


Fig. 15. Abundancia relativa de los ácidos grasos en fracción enriquecida de cloroplastos, agrupados por longitud.  $\Sigma C16 = C16:0 + C16:1$ ;  $\Sigma C18 = C18:0 + C18:1 + C18:2 + C18:3 + C18:4$ ;  $\Sigma C22 = C22:5 + C22:6$ . *Symbiodinium sp. (C1)* (n=3) y *Symbiodinium sp. (A1)* (n=3). Las barras denotan la desviación estándar.

### 3.3 Composición de ácidos grasos totales: diferencias entre célula completa y cloroplasto

Con el fin de aislar el efecto de la composición de ácidos grasos en las membranas del cloroplasto sobre la temperatura de fusión de la membrana fotosintética, del efecto de todas las membranas celulares, se comparó la composición y abundancia relativa de los ácidos grasos en cada instancia. En *Symbiodinium sp. (C1)* no se observaron diferencias significativas entre los ácidos grasos de la célula completa y la fracción enriquecida de cloroplastos.

Para el caso de *Symbiodinium sp. (A1)* se observaron diferencias significativas en el ácido graso C16:0 midiendo una abundancia relativa mayor en la fracción enriquecida de cloroplastos en comparación con la célula completa (Fig. 16). Agrupando los ácidos grasos C18:1 cis (suma de C18:1 (n-7c) y C18:1 (n-9c)) observamos diferencias significativas siendo mayor la abundancia de C18:1 cis en la célula completa comparada con la fracción enriquecida de cloroplastos (Fig. 16).

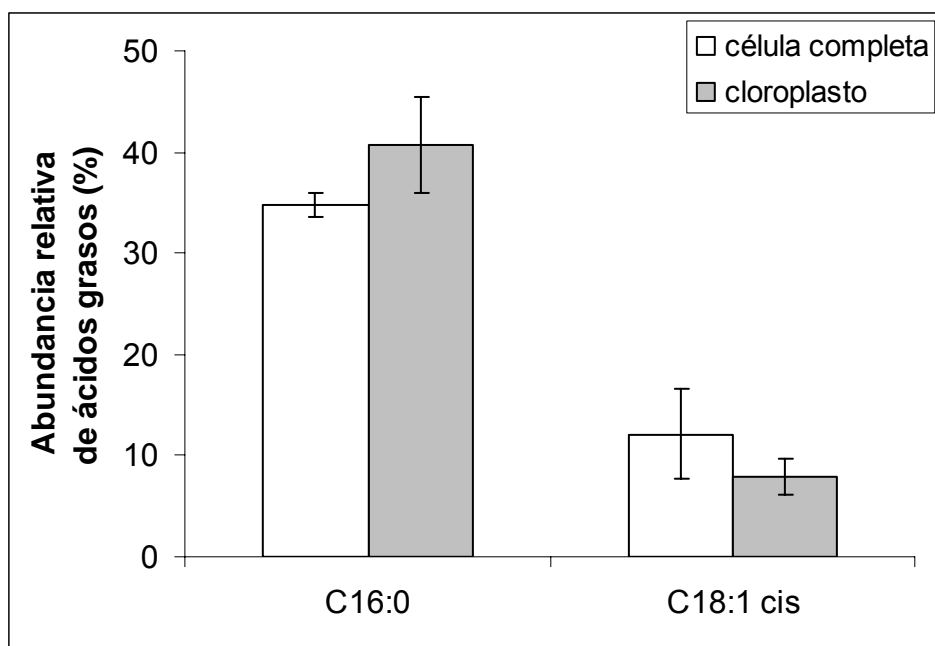


Fig. 16. Abundancia relativa de los ácidos grasos en *Symbiodinium sp.* (A1) (n=3) significativamente diferentes entre célula completa y fracción enriquecida de cloroplastos. C18:1 cis es la suma de C18:1 (n-9c) y C18:1 (n-7c). Las barras denotan la desviación estándar.

### 3.4 Efecto de la temperatura de crecimiento en la composición de ácidos grasos

Para evaluar el efecto de la alta temperatura sobre la composición de ácidos grasos extraídos de membranas celulares y del cloroplasto, se compararon cultivos crecidos a dos temperaturas, 24°C y 31°C.

Se observaron diferencias significativas en ácidos grasos de la célula completa de *Symbiodinium sp.* (A1), aumentando su abundancia significativamente con la temperatura los ácidos grasos C18:1(n-9t) (p=0.02), C18:1(n-7c) (p=0.02) y C18:3 (p=0.001) al crecer a 31°C, y disminuyendo su abundancia significativamente C16:0 (p=0.006), C18:1(n-9c) (p=0.02), C18:4 (p=0.02) y C22:6 (n-3) (p=0.007) (Fig. 17). Los cambios mas pronunciados ocurrieron en los ácidos grasos C18:3, aumentando 17%, C18:1 trans, aumentando 4.5% y C16:0 disminuyendo 7%. Para este mismo filotipo se observaron diferencias significativas en diferentes ácidos grasos de la fracción

enriquecida en membrana de cloroplastos, aumentando su abundancia significativamente con la temperatura los ácidos grasos C18:1(n-9t) ( $p=0.04$ ) y C18:1(n-9c) ( $p=0.04$ ) al crecer a 31°C, y disminuyendo su abundancia significativamente C16:0 ( $p=0.04$ ), C18:1(n-7c) ( $p=0.04$ ) y C22:6 (n-3) ( $p=0.007$ ), (Fig. 18). En este caso los cambios fueron menos drásticos, siendo la disminución de 22:6 y 16:0 de 7%, y el aumento del 6% de C18:1(n-9c) los mas sobresalientes.

Para el caso de *Symbiodinium sp.* (C1), no se observaron diferencias significativas entre los ácidos grasos de la célula completa ni en la fracción enriquecida de cloroplastos con respecto a la temperatura de crecimiento.

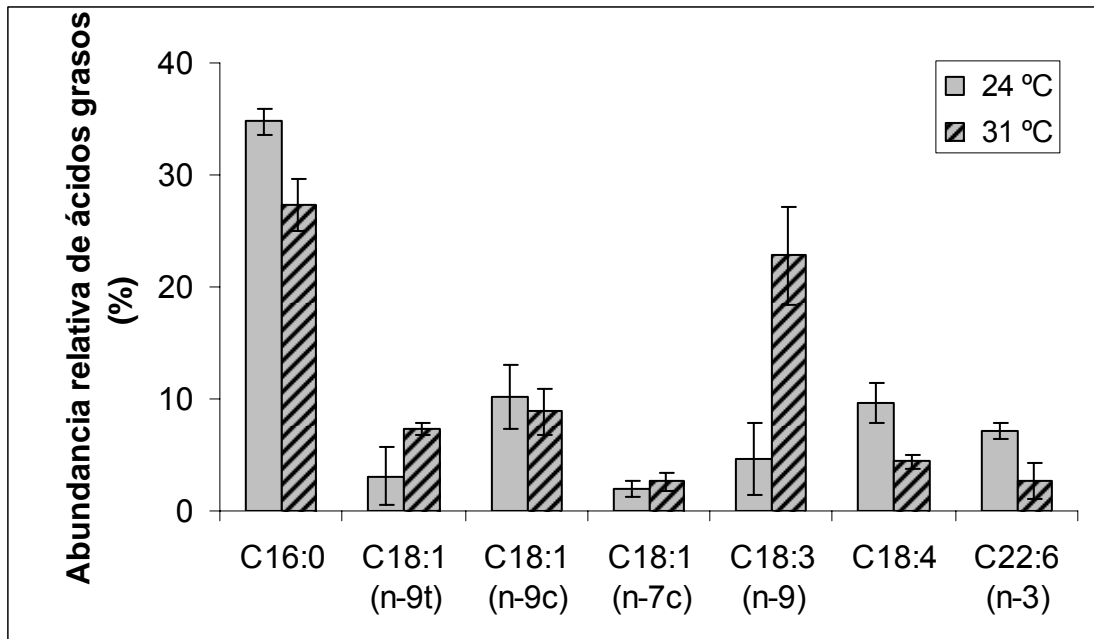


Fig. 17. Abundancia relativa de ácidos grasos extraídos de células completas de *Symbiodinium sp.* (A1) ( $n=3$ ) que fueron significativamente diferentes entre aquellas crecidas a 24°C y las crecidas a 31°C. Las barras denotan la desviación estándar.

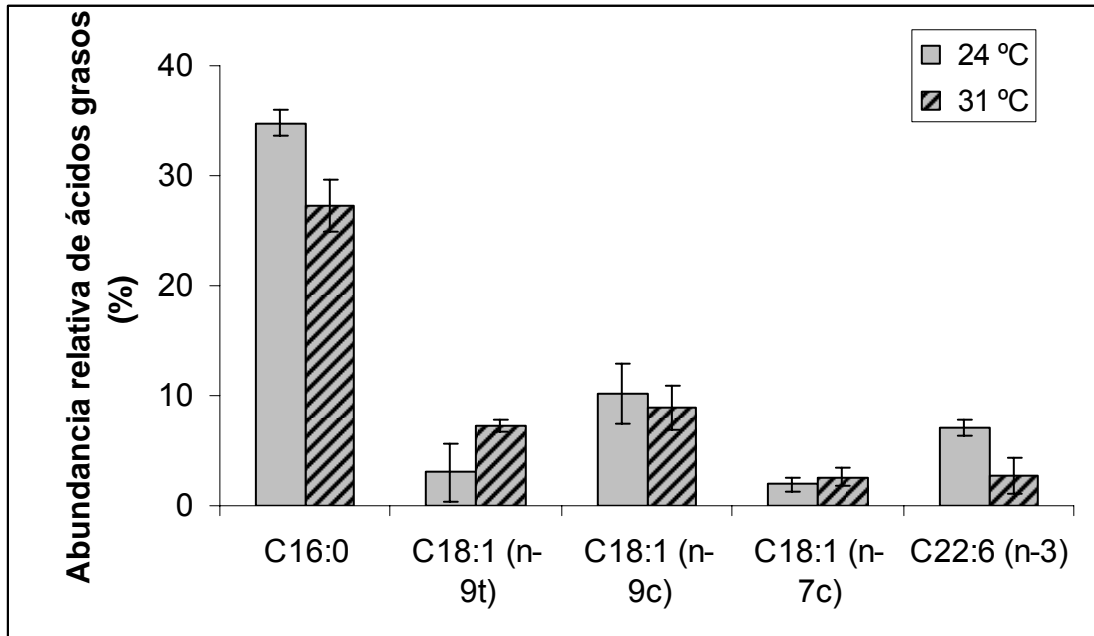


Fig. 18. Abundancia relativa de ácidos grasos extraídos de una la fracción enriquecida de cloroplastos de *Symbiodinium sp.* (A1) (n=3) que fueron significativamente diferentes entre aquellas crecidas a 24°C y las crecidas a 31°C. Las barras denotan la desviación estándar.

### Índices de saturación

De acuerdo a la hipótesis planteada, y a fin de evaluar el papel del grado de saturación de los ácidos grasos en la susceptibilidad de las membranas celulares a la temperatura, se estimaron índices de desaturación para los ácidos grasos extraídos de membranas celulares y del cloroplasto, comparando entre cultivos crecidos a dos temperaturas, 24°C y 31°C.

Para *Symbiodinium sp.* (A1) se observaron diferencias significativas para célula completa en el índice de desaturación para la desaturasa  $\Delta 15$ , que desatura C18:2 a C18:3 ( $p=0.02$ ) aumentando su actividad al crecer a 31°C y para la  $\Delta 6$  desaturasa que desatura C18:3(n-3) a C18:4(n-3) ( $p=0.001$ ) que disminuyó su actividad al crecer a 31°C (Fig. 19). Sin embargo, para este especie no se observaron diferencias significativas en los índices de desaturación de ácidos grasos en la fracción enriquecida de cloroplastos. Para el caso de *Symbiodinium sp.* (C1) no se observaron diferencias significativas en los

índices que infieren actividad de desaturasas, tanto en la célula completa como en la fracción enriquecida de membranas de cloroplasto.

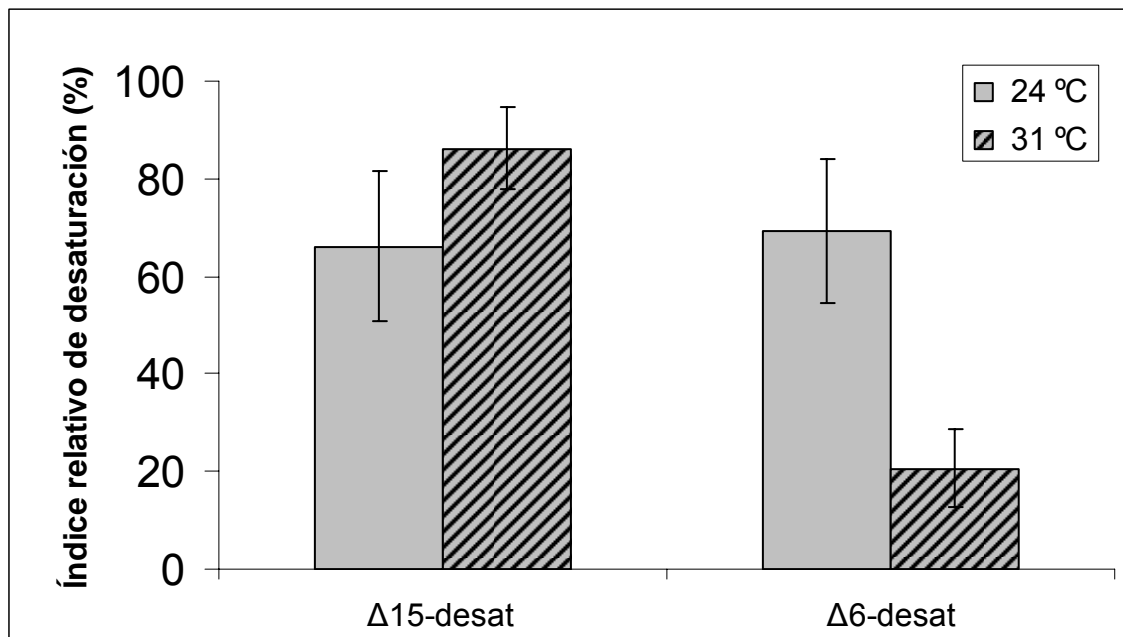


Fig. 19. Índices relativos de desaturación para las desaturasas  $\Delta 15$  y  $\Delta 6$ , que fueron significativamente diferentes para las células completas de *Symbiodinium* sp. (A1) (n=3) crecida a 24°C y a 31°C. Las barras denotan la desviación estándar.

### **Longitud de los ácidos grasos**

Dado que el índice de desaturación no resultó un indicador apropiado de la susceptibilidad de las membranas del cloroplasto a la temperatura, se hizo un análisis de la abundancia relativa de diferentes clases de ácidos grasos. Para calcular y comparar índices de alargamiento de ácidos grasos, éstos se agruparon por longitud para cada clase (C16, C18, C22), y se compararon entre cultivos crecidos a diferente temperatura, para cada tipo de membrana.

Para el caso de *Symbiodinium* sp. (A1) en células completas se observaron diferencias significativas en el índice relativo de alargamiento, aumentando al crecer a 31°C (Fig. 20). Esto se relaciona con las diferencias significativas observadas en las longitudes de los ácidos grasos, donde observamos un aumento de los ácidos grasos C18 y disminución de C16 y C22, al crecer a 31°C (Fig. 21). Esta relación se mantiene cuando analizamos la

fracción enriquecida en membranas de cloroplasto, donde el índice de alargamiento y la longitud de los ácidos grasos cambiaron significativamente entre las células crecidas a 24°C y las crecidas a 31°C (Fig. 22 y Fig. 23).

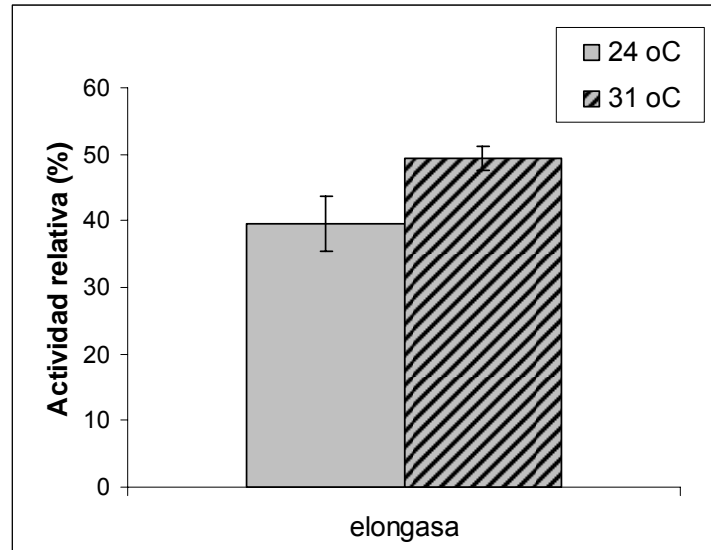


Fig. 20. Actividad relativa de elongasa en células completas de *Symbiodinium* sp. (A1) (n=3), calculada  $100 \times ((C18:0 + C18:1) / (C16:0 + C16:1 + C18:0 + C18:1(n-9c)))$ . Las barras denotan la desviación estándar.

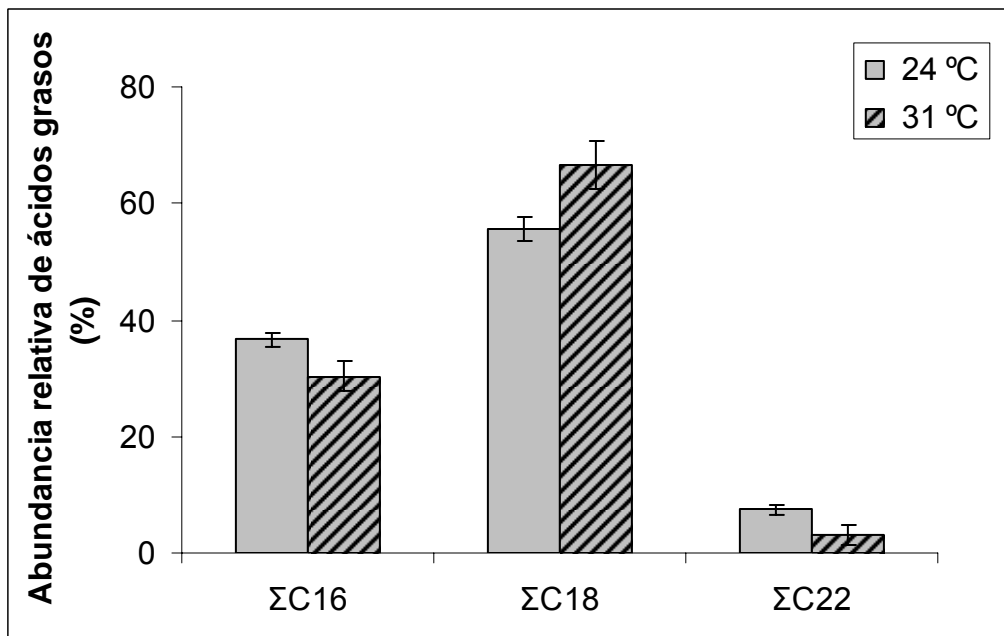


Fig. 21. Abundancia relativa de los ácidos grasos en célula completa de *Symbiodinium* sp. (A1) (n=3), agrupados por longitud.  $\Sigma C16 = C16:0 + C16:1$ ;  $\Sigma C18 = C18:0 + C18:1 + C18:2 + C18:3 + C18:4$ ;  $\Sigma C22 = C22:5 + C22:6$ . Las barras denotan la desviación estándar.



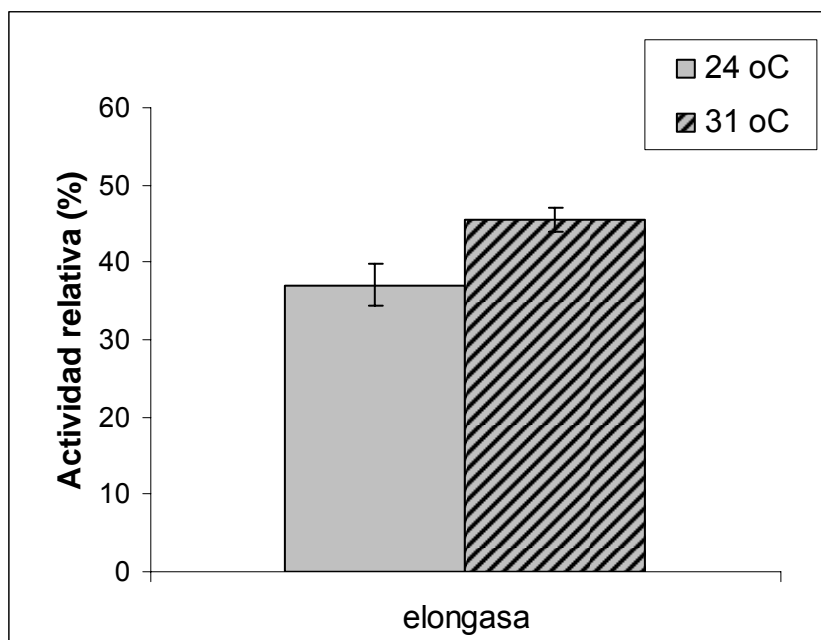


Fig. 22. Actividad relativa de elongasa en fracción enriquecida de membranas de cloroplasto de *Symbiodinium* sp. (A1) (n=3), calculada  $100 \times ((C18:0 + C18:1) / (C16:0 + C16:1 + C18:0 + C18:1))$ . Las barras denotan la desviación estándar.

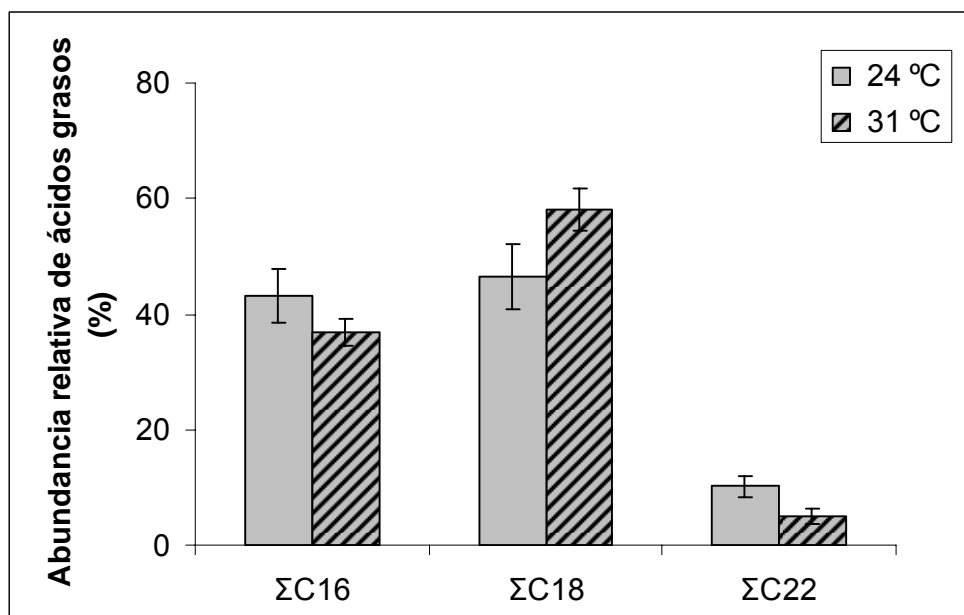


Fig. 23. Abundancia relativa de los ácidos grasos en fracción enriquecida de membranas de cloroplasto de *Symbiodinium* sp. (A1) crecida a 24°C y 31°C (n=3), agrupados por longitud.  $\Sigma C16 = C16:0 + C16:1$ ;  $\Sigma C18 = C18:0 + C18:1 + C18:2 + C18:3 + C18:4$ ;  $\Sigma C22 = C22:5 + C22:6$ . Las barras denotan la desviación estándar.

Para el caso de *Symbiodinium sp.* (C1) se observaron diferencias significativas en el índice de alargamiento que sugiere actividad de elongasas en la célula completa, disminuyendo cuando los cultivos crecieron a 31°C (Fig. 24), es decir, se observó un efecto contrario al que mostró *Symbiodinium sp.* (A1). Esto se relaciona con las diferencias significativas observadas en las longitudes de los ácidos grasos, donde ocurrió una disminución de los ácidos grasos C18 y aumento de C16 y C22, al crecer a 31°C (Fig. 25). Nuevamente en contraste con los resultados obtenidos para *Symbiodinium sp.* (A1), estos cambios no se observaron al analizar la fracción enriquecida en membranas de cloroplastos, ya que no presentaron variaciones significativas en la longitud de los ácidos grasos con el cambio en temperatura de crecimiento.

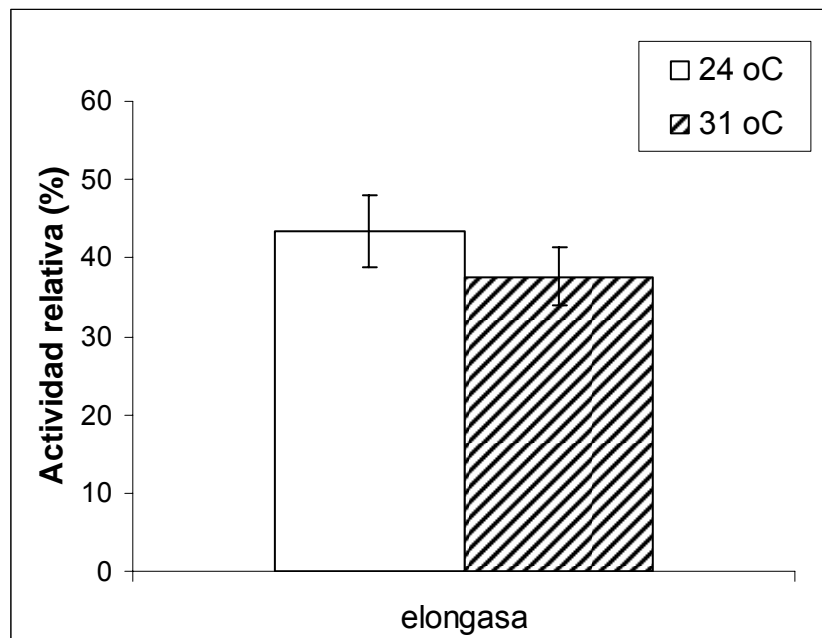


Fig. 24. Índice relativo de alargamiento en células completas de *Symbiodinium sp.* (C1) crecida a 24°C y 31°C (n=3), calculada como  $100 (\Sigma C18 / \Sigma C16 + \Sigma C18)$ . Las barras denotan la desviación estándar.

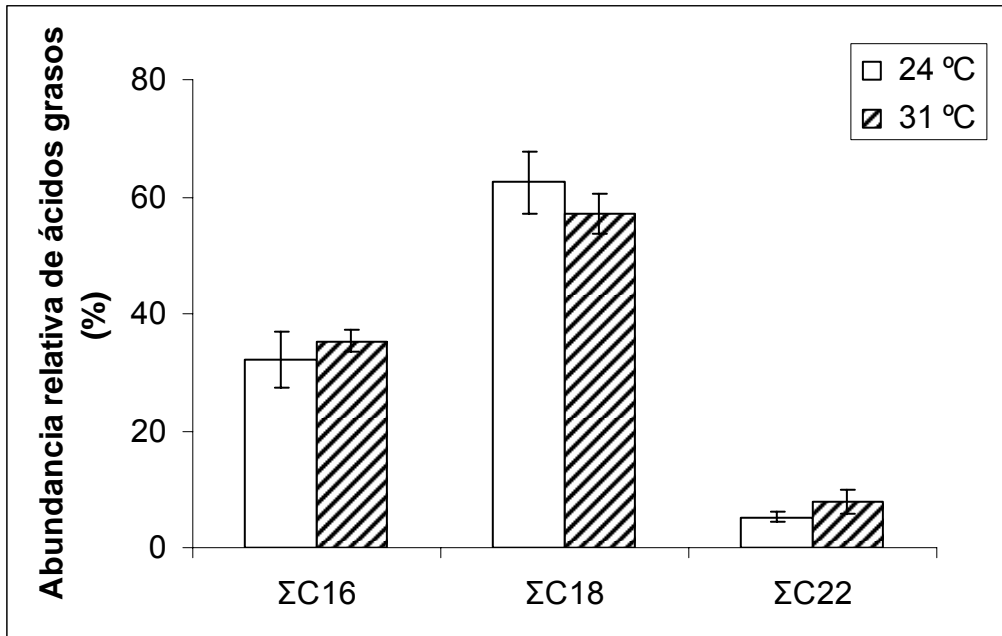


Fig. 25. Abundancia relativa de los ácidos grasos en célula completa de *Symbiodinium sp.* (C1) (n=3), agrupados por longitud.  $\Sigma C16 = C16:0 + C16:1$ ;  $\Sigma C18 = C18:0 + C18:1 + C18:2 + C18:3 + C18:4$ ;  $\Sigma C22 = C22:5 + C22:6$ . Las barras denotan la desviación estándar.

### Isomerización

Considerando que se detectaron isómeros trans en los ácidos grasos C18 extraídos, y que éstos modifican la fluidez de las membranas biológicas, se analizó su contribución relativa con respecto a la temperatura de crecimiento. Encontramos diferencias en la proporción de C18:1 cis y trans para ambas especies. Para *Symbiodinium sp.* (A1) encontramos que al crecer a 31°C disminuyen los ácidos grasos cis C18:1(n-7c) y C18:1(n-9c), y aumenta la forma trans de C18:1(n-9t) en células completas y en la fracción enriquecida de membranas de cloroplasto (Fig. 26). Para *Symbiodinium sp.* (C1) encontramos lo opuesto, que al crecer a 31°C se aumentan los ácidos grasos cis C18:1(n-7c) y C18:1(n-9c), disminuyendo la forma trans de C18:1(n-9t) en células completas y en la fracción enriquecida de membranas de cloroplasto (Fig. 27).

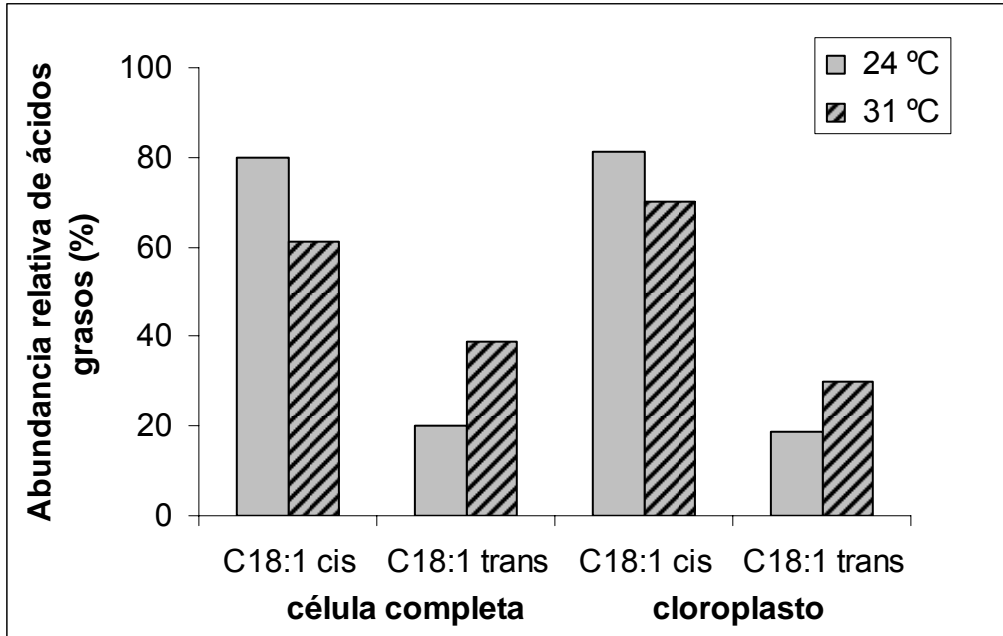


Fig. 26. Abundancia relativa (%) de isómeros cis y trans en ácidos grasos C18:1 donde el 100% es igual a la suma total de isómeros C18:1 en *Symbiodinium sp.* (A1) crecida a dos temperaturas (n=3).

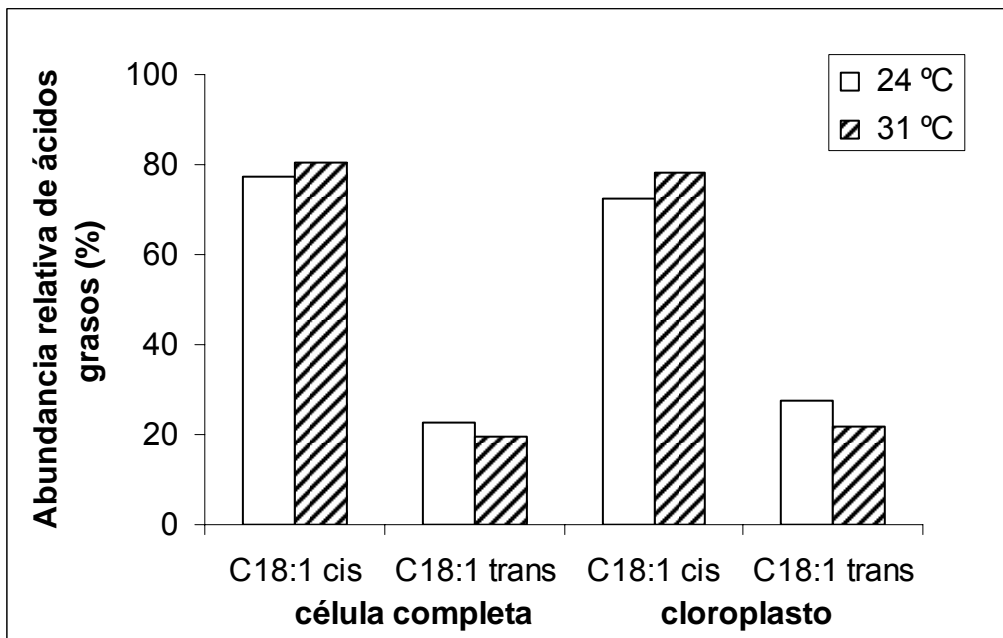


Fig. 27. Abundancia relativa (%) de isómeros cis y trans en ácidos grasos C18:1 donde el 100% es igual a la suma total de isómeros C18:1 en *Symbiodinium sp.* (C1) crecida a dos temperaturas (n=3). Las barras denotan la desviación estándar.

Resumiendo para el análisis de las diferentes clases de ácidos grasos en fracciones enriquecidas con membranas del cloroplasto, se detectaron diferencias significativas entre cultivos mantenidos a dos temperaturas, en longitud de lípidos (alargamiento) y en abundancia de isómeros trans C18:1. Cuando se compararon las membranas celulares sin fraccionar, los resultados indicaron un mayor número de diferencias que incluyeron saturación, alargamiento e isomerización de ácidos grasos. Solo las diferencias de isomerización se observaron tanto en células completas como en cloroplastos y el efecto fue contrario para cada filotipo.

## ***Discusión***

### **1. Temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dinoflagelados simbioses de corales y su relación con la sensibilidad térmica del aparato fotosintético.**

La estabilidad de la membrana fotosintética es importante ya que de ésta depende el adecuado funcionamiento de las proteínas que se encuentran embebidas en ella. Iglesias-Prieto et al. 1992 y Tchernov et al. 2004 han propuesto que la sensibilidad térmica de los dinoflagelados simbioses está relacionada con la fluidez de la membrana fotosintética. En este trabajo cabe destacar la relevancia de la innovación en la metodología para medir la fluidez de la membrana fotosintética que permitió aislar el efecto fisiológico y medir el cambio de estado físico de la membrana fotosintética. En diversos trabajos se ha utilizado la cinética de la fluorescencia de la clorofila *a* sin tomar en cuenta el efecto en la muestra de la medición misma (relacionado con la exposición de la luz saturante). En este caso, se decidió trabajar con muestras independientes en cada medición evitando así acumular el efecto de la propia medición sobre lo que realmente estábamos evaluando. Referente a estos experimentos, encontramos que los simbioses de *M. faveolata* mostraron una temperatura de fusión menor (38.8°C) que la observada en los simbioses de *M. auretenra* (42.4°C), esta relación es consistente con la disminución diferencial de *Fv/Fm* a 35°C en el tiempo.

Esto también se relaciona con la mayor prevalencia de blanqueamiento que se ha observado en estas especies de coral. Por ejemplo, en Cayo Carrie Bow en Belice en 1995 (CARICOMP 1997) *M. faveolata* se blanqueó al 71% y *M. auretenra* (reportada como *M. mirabilis*, ver Locke et al. 2007) se blanqueó al 7% y en Tobago en el mismo año, donde *M. faveolata* tuvo una prevalencia de blanqueamiento del 100% y *M. mirabilis* del 13% (Buccoo Reef Trust).

Los factores que pueden afectar la temperatura de fusión de la membrana fotosintética tanto genéticos (la variación genética de las poblaciones de

dinoflagelado simbiote que puedan estar ocupando una misma colonia de coral) como ambientales (luz, temperatura de crecimiento, coloración de la colonia) son varios. La identidad genética de los dinoflagelados simbiotes que se determinó para estos corales concuerda con lo observado por diferentes autores como Diekmann y colaboradores (2003) quienes determinaron que *M. mirabilis* (ahora *M. auretenra*, Locke et al. 2007) se asocia específicamente con *Symbiodinium* sp. clado B13. Lo mismo podemos observar para *Montastrea faveolata* clado C7 (LaJeunesse 2002). Es importante considerar que la metodología que comúnmente se emplea para determinar el filotipo de dinoflagelados simbiotes detecta simbiotes dominantes y se ha observado la presencia de filotipos crípticos en las poblaciones de dinoflagelados simbiotes. Es decir, que dentro de un coral podemos detectar dinoflagelados con alta variación genética (Stat et al. 2006). Este hecho dificulta el poder distinguir factores genéticos de factores ambientales cuando se trabaja con dinoflagelados recién aislados de un coral, de tal modo que la no variación en secuencias de ITS podría ocultar una posible variación genética de las especies contenidas dentro del coral (LaJeunesse 2002).

Adicionalmente, la coloración de la colonia puede estar relacionada con la susceptibilidad a la temperatura elevada. Dove (2004) demostró que los pigmentos del coral son fotoprotectores a temperaturas normales o menores a  $<32^{\circ}\text{C}$ , pero este autor observó que la pérdida de simbiotes y la reducción de  $F_v/F_m$  al ser expuestos a temperatura elevada fue más severa en los morfotipos azulados muy pigmentados que en aquellos morfotipos menos pigmentados de *Acropora aspera*, resultando en la eventual muerte de esas colonias. Estas observaciones pueden estar relacionadas con las publicadas por Fabricius (2006) que encontró que colonias oscuras a alta irradianza y menor flujo de agua eran  $1.5^{\circ}\text{C}$  más calientes que la temperatura del agua del ambiente. Por lo tanto la coloración de la colonia puede estar modificando la temperatura microambiental de tal modo que el dinoflagelado simbiote se aclimata a esa condición, involucrando un gasto energético diferencial.

## **2. Componentes genéticos y ambientales que determinan la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.**

Como observamos con los dinoflagelados recién aislados de coral, podemos detectar diferencias en la temperatura de fusión de la membrana fotosintética y relacionarlo con la susceptibilidad térmica, sin embargo no es posible de este modo definir los factores genéticos o ambientales que determinan la fluidez de la membrana. Es por ello que para separar los componentes genéticos de los ambientales se hicieron dos tipos de ensayos con cultivos de un mismo filotipo; en el primero, los cultivos permanecieron en iguales condiciones de temperatura y luz para observar la variación en la fluidez de la membrana debido a diferencias genéticas. En el segundo, se utilizaron los dos filotipos que presentaron una menor temperatura de fusión de la membrana fotosintética *Symbiodinium sp.* (A1) y *Symbiodinium sp.* (C1), creciéndolas a dos temperaturas para evaluar el efecto de la alta temperatura de crecimiento (31 °C) en la fluidez de la membrana fotosintética.

Los resultados mostraron diferencias significativas en la temperatura de fusión de la membrana fotosintética entre los diversos tipos de dinoflagelados estudiados (Fig. 3). Estas diferencias abarcan un rango de sensibilidad de alrededor de 4.5° C entre filotipos; y dado que todas se crecieron bajo las mismas condiciones de luz y temperatura, podemos decir que estas diferencias son genéticas. Estas diferencias se relacionan con la caída de  $F_v/F_m$  en el tiempo a alta temperatura (35 °C). En los extremos se determinó para *S. pilosum* y *S. kawagutii* una temperatura de fusión fue de 37.7° C y 41.1° C, resultados consistentes con las observaciones realizadas por Iglesias-Prieto (sin publicar) de la temperatura óptima de crecimiento para estos filotipos siendo de 26°C y 28°C respectivamente. Por lo tanto es muy probable que la sensibilidad térmica de la membrana fotosintética sea un factor que determina el rango óptimo de temperatura en la que un organismo puede vivir. Considerando que la mayoría de los corales viven cerca de su límite superior de temperatura cuando nos referimos a aquellas temperaturas que se alcanzan en verano, es de esperar que pequeños incrementos en la temperatura media del verano pudieran afectar



fuertemente las poblaciones de las algas simbiotes, y por tanto a los organismos hospederos. Dado que la sensibilidad térmica de las algas simbiotes varía dependiendo de la especie, la observación de blanqueamiento diferencial podría explicarse al menos en parte por estas diferencias, como se había propuesto con anterioridad (Iglesias-Prieto y Trench 1997), en particular considerando los resultados obtenidos que indican que la temperatura de fusión de membranas fotosintéticas varía hasta en 4.5°C.

Podemos observar que la respuesta de clonas genéticamente distintas que son sensibles a la temperatura son similares en cuanto a ajustarse a la temperatura a la que están creciendo. Estas observaciones concuerdan con lo que se ha reportado por varios autores donde observaron que la respuesta al estrés por alta temperatura es tan variable entre especies de diferentes clados como dentro del mismo clado. Por ejemplo, Tchernov et al. 2004 observaron que la sensibilidad térmica no está relacionada filogenéticamente, hipotetizando que algunos clados fueron perdiendo esta capacidad de aclimatarse independientemente, o que esta capacidad se seleccionó múltiples veces en linajes independientes. Robinson y Warner (2006) observaron también una sensibilidad diferencial a la temperatura, encontrando que los dinoflagelados simbiotes clado B1 y A1.1 son sensibles a la alta temperatura, mientras que A1 y F2 son tolerantes con diferentes estrategias. Por lo tanto, es posible que las rutas metabólicas que utilizan los dinoflagelados para aclimatarse a la alta temperatura sean diferentes involucrando así un gasto energético diferencial.

## **2.2 Componentes ambientales de la temperatura de fusión de la membrana fotosintética**

En los cultivos crecidos a temperatura ambiente observamos que la temperatura de fusión es menor que en los cultivos que crecieron a 31° C. Por lo tanto, podemos concluir que la temperatura de crecimiento es un factor ambiental que puede modificar la temperatura de fusión de la membrana fotosintética.

En un trabajo realizado por Aminaka y colaboradores (2006) en la cianobacteria *Synechocystis sp.* al comparar la temperatura de fusión de membrana (después de incubaciones de 5 minutos), en cultivos crecidos a 25°C y 35°C no observaron un aclimatación de la membrana fotosintética a la alta temperatura de crecimiento. Esto puede explicarse si consideramos que *Synechocystis sp.* habita en un amplio rango de temperatura que varía diurna y estacionalmente a diferencia de un organismo arrecifal. En un arrecife coralino como el de Puerto Morelos, Quintana Roo, la temperatura varía anualmente relativo al promedio alrededor de 5°C, (a 10 m de profundidad, Ruíz R. sin publicar) a 6.3°C (temperatura superficial, Merino y Otero, 1983). Adicionalmente se considera que los corales viven cerca de su límite térmico (Hoegh-Guldberg, 1999). Esto puede explicar porque en *Symbiodinium* vemos diferencias en la temperatura de fusión de la membrana fotosintética, que en *Synechocystis sp.* no se observan. Adicionalmente, la modificación de la temperatura de fusión dependiendo de la temperatura de cultivo, es indicativo de un proceso de aclimatación, que de acuerdo a los resultados obtenidos es diferente para cada especie de dinoflagelado simbiote. Las implicaciones de esta habilidad diferencial podrían traducirse en una susceptibilidad térmica de diferentes conjuntos coral-dinoflagelado y contribuir a explicar las diferencias de blanqueamiento de corales que se observan en un arrecife.

### **3. Caracterización de ácidos grasos de células completas y de membranas fotosintéticas de dinoflagelados simbiotes**

#### **3.3 Composición de ácidos grasos totales de células completas**

Comparando con trabajos anteriores realizados con dinoflagelados recién aislados de *Pocillopora damicornis* y *Montastrea curta* y dinoflagelados en cultivo de *Gymnodinium microadriaticum*, *Amphidinium klebsi* y *A. carterae* (Bishop y Kendrick 1980) encontramos que todas las muestras presentaron una abundancia similar en C16:0, que es un ácido graso considerado “de relleno” (“bulk”) (Voet y Voet 1990), que en plantas va de 22.4 a 42.7% de abundancia relativa. Es posible que éste no fuera tan variable dada su función. Para C18:0

observamos que es más del doble de abundante para los cultivos en este estudio (20.1-21.1%) comparado con las de los trabajos mencionados anteriormente (1.7 a 8.7%). El ácido graso C18:1 fue igualmente abundante que lo observado en *Amphidinium klebsii* (15.3 a 20.7%) pero mucho más abundante que lo reportado para los otros dinoflagelados (0.3 a 6.9%). Para C18:2 observamos que en *Symbiodinium sp.* (A1) es más abundante que en *Symbiodinium sp.* (C1) (3.2% contra 5.3%) pero estas diferencias no fueron significativas, y los otros dinoflagelados se encuentran por debajo de estos valores (0.2 a 2.6%) por lo que quizá se encuentra en el rango normal de variación. El caso de C18:3 es interesante, ya que de entrada los filotipos de este estudio fueron significativamente diferentes; *Symbiodinium sp.* (A1) tuvo 4.7% y *Symbiodinium sp.* (C1) tuvo 14.2%, podemos observar que simbiontes de *Pocillopora damicornis*, *Symbiodinium microadriaticum* y *Amphidinium carterae* fueron más similares a *Symbiodinium sp.* (A1) y simbiontes de *Montastrea curta* y *Amphidinium klebsii* fueron más similares a *Symbiodinium sp.* (C1). Para el caso de C18:4 igualmente observamos diferencias significativas entre *Symbiodinium sp.* (A1) (9.7%) y *Symbiodinium sp.* (C1) (4.9%) podemos observar que fueron diferentes también entre las especies del trabajo citado siendo mayor su abundancia principalmente en *Amphidinium carterae* (34%), *Amphidinium klebsii* (26.4%) y en simbiontes de *Pocillopora damicornis* (41.9%). Y finalmente comparando C22:6, encontramos que en todos los casos la abundancia fue menor en nuestras observaciones (*Symbiodinium sp.* (A1) (7.1%) y *Symbiodinium sp.* (C1) (4.5%)) comparando contra la variación que se reporta está entre 10.1% y 20.9%.

Los ácidos grasos poli-insaturados C18:4, C18:5, C22:5 y C22:6 se consideran comunes en dinoflagelados y se han sugerido que pueden emplearse como marcadores del grupo (Bishop y Kenrick 1980, Zhukova y Titlyanov 2003, Papina et al. 2003, Mooney et al. 2007). Estudios que consideran la composición de ácidos grasos de diversos órdenes de dinoflagelados de vida libre, sugirieron que el ácido graso C18:5 podría tener algún valor taxonómico ya que es uno de los más abundantes en glicolípidos

asociados al cloroplasto (11.9 a 48.6%, Leblond y Chapman 1999). Dado que este ácido graso se localiza exclusivamente en el cloroplasto, su abundancia relativa podría haberse enmascarado en nuestras muestras ya que estas extracciones se hicieron de células completas. En extracciones de fosfolípidos que se considera provienen en su mayoría de membranas no cloroplásticas, la abundancia de C18:5 es significativamente menor (2 a 11%) que en los glicerolípidos (Leblond y Chapman 1999). Otra posibilidad es que en dinoflagelados simbiotes su abundancia sea reducida, ya que por ejemplo Papina et al (2003) quienes examinaron la composición de ácidos grasos del dinoflagelado simbiote del coral *Pocillopora damicornis*, tampoco detectaron C18:5.

Todas estas diferencias en abundancia relativa de ácidos grasos son probablemente un reflejo tanto de las condiciones de cultivo que se emplearon, como de la metodología de extracción. Para este estudio sabemos que la metodología de extracción fue suficientemente confiable, ya que se emplearon 3 métodos diferentes obteniendo los mismos resultados en todos los casos, eligiendo el que resultaba en un mayor rendimiento. En el caso de este trabajo no se utilizó un marcador C18:5 por lo que no podemos excluir que este ácido graso este presente o ausente.

En lo referente a ácidos grasos insaturados, los resultados obtenidos nos permitieron inferir que la  $\Delta 6$ -desaturasa (que desatura ácidos grasos trioicos como C18:3 a C18:4) tiene una actividad significativamente diferente entre ambos filotipos (Fig. 10) siendo mayor en *Symbiodinium sp.* (A1) (69.2) comparada con *Symbiodinium sp.* (C1) (25.2). Calculando estos valores con las especies del trabajo de Bishop y Kendrick (1980) encontramos que los valores van de 52.8 a 93.1 por lo que podemos inferir que la actividad de esta enzima es variable. Para las cepas utilizadas en Tchernov et al. (2004) la actividad inferida de esta desaturasa es poco variable entre cepas tolerantes y sensibles a la temperatura, teniendo un valor de 70.6 a 99.6.

### **3.4 Composición de ácidos grasos totales de cloroplastos**

Cabe destacar que este es el primer trabajo donde se hace un esfuerzo por describir la composición de ácidos grasos de las membranas fotosintéticas en dinoflagelados.

En plantas se ha observado que las membranas del cloroplasto tienen una composición de ácidos grasos inusual, una de ellas es la alta saturación de los ácidos grasos (80% de ellos saturados) (Harwood 1998) conteniendo altos niveles de C16:3 y C18:3. Pero en plantas no se observan los ácidos grasos típicos de dinoflagelados como C18:4 y C18:5 ni de cadena larga, lo que puede explicar las diferencias en abundancia observadas entre plantas y dinoflagelados simbiotes.

Buscando diferencias entre los dos filotipos con temperatura de fusión de la membrana fotosintética más bajas, encontramos que la saturación no parece ser un factor que muestre diferencias sin embargo la elongación sí parece importante. Sin embargo estas diferencias no se reflejan en una fluidez diferencial de la membrana fotosintética ya que aparentemente estas diferencias en la composición resultan en una fluidez similar de la membrana fotosintética.

### **3.3 Composición de ácidos grasos totales: diferencias entre célula completa y cloroplasto**

Con el fin de aislar el efecto de la temperatura sobre las membranas del cloroplasto del efecto sobre las membranas celulares, se comparó la composición de los ácidos grasos en cada instancia. No se observaron diferencias significativas entre los ácidos grasos de la célula completa y la fracción enriquecida de cloroplastos para *Symbiodinium sp.* (C1).

Para el caso de *Symbiodinium sp.* (A1) se observaron diferencias significativas en el ácido graso C16:0. Estas diferencias pueden deberse a que el ácido graso C16:0 se produce en el cloroplasto, y que este filotipo en particular esté reteniéndolo en mayor cantidad en el cloroplasto. Es este mismo filotipo, se detectó abundancia significativamente mayor de C18:1 cis en la célula completa comparada con la fracción enriquecida de cloroplastos. Por lo tanto,

podemos observar que hay diferencias en la isomerización de este ácido graso, factor que se ha observado cambia la configuración de la membrana.

Finalmente cabe destacar que si observamos solo los análisis para *Symbiodinium sp.* (C1) podríamos concluir que un análisis de la célula completa puede ser suficiente para aproximarlos a la composición de la membrana del cloroplasto. Sin embargo, esto no es verdad para *Symbiodinium sp.* (A1), por lo que los análisis de células completa resultaron no ser una buena aproximación de la composición de ácidos grasos de la membrana fotosintética en todos los filotipos para poder relacionarlo con la fluidez de la membrana fotosintética. Esto resulta de suma importancia cuando la herramienta para determinar un desacoplamiento de la fotosíntesis dependiente de la temperatura es la fluorescencia máxima de la cosecha cuántica del fotosistema II, como es el caso de este estudio. Es decir, que solo cambios en la composición de ácidos grasos del cloroplasto podrían estar relacionados con una sensibilidad térmica del aparato fotosintético.

#### **4. Efecto de la temperatura de crecimiento en la composición de ácidos grasos**

Para *Symbiodinium sp.* (A1) es interesante que solamente se detectaron diferencias significativas dependientes de la temperatura en la abundancia relativa de los ácidos grasos poli-insaturados C18:3 y C18:4 cuando se consideraron las membranas celulares sin fraccionar pero estas diferencias no se mantienen para la composición de la fracción enriquecida de cloroplastos. La desaturación entonces podría ser una estrategia que emplean las células para mantener la fluidez de sus membranas, pero no en membranas del cloroplasto, siendo igualmente factible que estos ácidos grasos no contribuyan a los cambios observados en la fluidez de la membrana del cloroplasto. Para las células completas se observaron diferencias significativas en el índice relativo de alargamiento, aumentando al crecer a 31°C aumentándose los ácidos grasos C18 y disminuyéndose C16 y C22, al crecer a 31°C. Esta relación se mantiene cuando analizamos la fracción enriquecida en membranas de cloroplasto, donde

el índice de alargamiento y la longitud de los ácidos grasos cambiaron significativamente entre las células crecidas a 24°C y las crecidas a 31°C por lo que es posible que el alargamiento de los ácidos grasos si esté contribuyendo a modificar de la fluidez de la membrana. En particular se observó una acumulación de ácidos grasos de cadena C18 llegando a constituir cerca del 60%, lo que podría deberse a una mayor actividad de alargamiento a partir de ácidos grasos C16, y/o a una disminución en el alargamiento de cadenas C18 hasta C22. De cualquier modo, la acumulación de C18 en las membranas fotosintéticas es lo que podría haber contribuido a modificar la fluidez de la membrana cuando la temperatura de crecimiento fue de 31°C, al aumentar la temperatura de fusión en comparación con la que tendría una membrana en la que los ácidos grasos C16 son mas abundantes.

Para el caso de *Symbiodinium sp.* (C1), no se observaron diferencias significativas entre los ácidos grasos de la célula completa ni en la fracción enriquecida de cloroplastos con respecto a la temperatura de crecimiento. No se observaron diferencias significativas en los índices que infieren actividad de desaturasas, ni en la célula completa ni en la fracción enriquecida de membranas de cloroplasto. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el índice de alargamiento que sugiere actividad de elongasas en la célula completa, disminuyendo cuando los cultivos crecieron a 31°C encontrándose una disminución de los ácidos grasos C18 y aumento de C16 y C22, al crecer a 31°C.

Se observó en membranas de células completas una disminución de los ácidos grasos C18 y aumento de C16 y C22, al crecer a 31°C. Estos resultados indican un efecto contrario al observado en *Symbiodinium sp.* (A1). El hecho de que las membranas de la fracción enriquecida en cloroplastos en *Symbiodinium sp.* (C3) no hayan mostrado cambios significativos en la longitud de ácidos grasos, podría ser indicativo de una inhabilidad de responder a la mayor temperatura de crecimiento, y por tanto explicar al menos en parte la mayor susceptibilidad a la temperatura que se observó en las curvas de fusión de la membrana fotosintética para este dinoflagelado.

En otros estudios, analizando el efecto de la temperatura sobre la composición de ácidos grasos tanto en dinoflagelados simbioses como en el coral, Papina et al. (2007) concluyeron que los efectos de la temperatura elevada fueron mucho mayores en el coral. En dinoflagelados simbioses solo observaron diferencias en los ácidos grasos C18:2 y C22:5, disminuyendo y aumentando en el tiempo, respectivamente. Sin embargo, esto resulta sorprendente ya que indican un aumento en la síntesis de grasos poli-insaturados a mayor temperatura de crecimiento. Adicionalmente, Tchernov y colaboradores (2004) emplearon el cociente C18:1/C18:4 como indicador de la susceptibilidad térmica de las membranas, observando que para cepas y dinoflagelados recién aislados que son sensibles a la temperatura, el valor es menor a 0.5 (0.24 a 0.46), mientras que las tolerantes a la temperatura tuvieron un valor mayor a 0.5 (de 0.87 a 3.42). Si calculamos este cociente en células completas, para *Symbiodinium sp.* (A1) se tiene un valor de 1.05 y *Symbiodinium sp.* (C1) de 2.07 lo cual no concuerda con los valores propuestos para cepas termo-sensibles. Esto puede indicarnos que los procesos que determinan la sensibilidad térmica del aparato fotosintético de las especies son complejos y que en todo caso sería necesario considerar un mayor número de especies para encontrar generalizaciones así como tomar en cuenta diferentes estrategias que pueden afectar la estabilidad de la membrana fotosintética.

En cuanto a la composición de isómeros de C18 encontramos diferencias en la proporción de C18:1 cis y trans para ambos filotipos. Para *Symbiodinium sp.* (A1) encontramos que al crecer a 31°C disminuyen los ácidos grasos cis C18:1(n-7c) y C18:1(n-9c), y aumenta la forma trans de C18:1(n-9t) en células completas y en la fracción enriquecida de membranas de cloroplasto mientras que para *Symbiodinium sp.* (C1) encontramos lo opuesto, que al crecer a 31°C se aumentan los ácidos grasos cis C18:1(n-7c) y C18:1(n-9c), disminuyendo la forma trans de C18:1(n-9t) en células completas.

Por lo tanto, solo las diferencias de alargamiento e isomerización se observaron tanto en células completas como en cloroplastos y el efecto fue contrario para cada filotipo. En el caso del alargamiento de los ácidos grasos,



una cadena más larga disminuye la fluidez de la membrana. Para la isomerización, el ácido graso C18:1 trans adquiere una configuración similar a C18:0, por lo que el efecto sobre la fluidez de la membrana sería análogo al de la saturación, es decir, disminuye la fluidez de la membrana. En cuanto a la saturación es posible que no se observen diferencias ya que la saturación se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y que estos ácidos grasos se mantengan fuera del cloroplasto.

El hecho de que efecto de la temperatura tuviera estrategias opuestas para estos dos filotipos puede indicar que:

1. En el caso de estos dos filotipos, el alargamiento de los ácidos grasos tiene un efecto contrario, de tal modo que el aumento en C18 y disminución de C16 y C22 tienen un efecto equivalente a la disminución de C18 y aumento de C16 y C22. Por lo tanto el efecto de la isomerización podría ser lo que define las diferencias en el aumento de la temperatura de fusión de la membrana fotosintética a alta temperatura de crecimiento.
2. El alargamiento y la isomerización tienen efectos contrarios que en estos casos se anulan sin tener un efecto real en la fluidez de la membrana, siendo que las diferencias observadas como efecto de la alta temperatura de crecimiento se deban a otros mecanismos que no son el alargamiento y la isomerización.

Adicionalmente, observamos que el cultivo de *Symbiodinium sp.* (A1) creciendo a alta temperatura (31°C) después de 20 días de exposición, murió a diferencia de *Symbiodinium sp.* (C3) que se mantuvo funcional. Así que en nuestros resultados las diferencias observadas pueden deberse a un efecto de la alta temperatura donde hay una degradación de proteínas o enzimas modificándose así la composición de ácidos grasos, o un efecto de aclimatación a la alta temperatura o una combinación de ambos. La composición de ácidos grasos de las membranas fotosintéticas parece determinar en cierta medida la fluidez y por tanto la temperatura de fusión de las mismas. *Symbiodinium sp.*

(A1) modificó la composición de ácidos grasos de sus membranas, logrando disminuir su fluidez y aumentar su temperatura de fusión, mientras que *Symbiodinium sp.* (C3) parece no haber seguido esta estrategia tal vez porque 31°C no es una temperatura que compromete su sobrevivencia.

Resumiendo, podemos sugerir que otros factores no analizados en este trabajo que pueden estar afectando la fluidez de la membrana podrían incluir la composición de las cabezas de los ácidos grasos y otro tipo de moléculas embebidas en la membrana como esteroides (McKersie y Thompson 1979). Adicionalmente, las membranas biológicas están compuestas de proteínas (oscilando en proporciones 1:1 lípido:proteína, hasta 1:3 lípido:proteína) y carbohidratos (Voet y Voet 1999) por lo que es posible que los ácidos grasos no sean el único factor determinante de la fluidez de la membrana. Leggat et al. (2007b) trabajando con un simbionte clado (C3) de *Acropora aspera*, identificaron diferentes genes expresándose en temperatura elevada, cambios de luz y de CO<sub>2</sub>, encontrando 16 posibles genes expresándose, correspondiente al 2.6% de las secuencias obtenidas, por lo que es posible que haya diversos factores modificando la fluidez de la membrana, adicionales a los estudiados en este trabajo.

Adicionalmente se ha demostrado que la luz es un factor que puede modificar la composición de lípidos de las membranas tanto en plantas como en cianobacterias. En algas unicelulares como *Porphyridium cruentum*, *Chlorella sp.*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Synechocystis sp.*, *Dunaliella salina* y *Chlamydomonas reinhardtii*, se ha observado que en general la luz induce la introducción de dobles enlaces en la posición  $\omega$ 3 como respuesta rápida al presencia de luz (Klyachko-Gurvicha et al. 1999). En el caso de *Synechocystis sp.* se ha observado que la expresión de la  $\Delta$ 6 y  $\Delta$ 12 desaturasas aumenta con la presencia de luz (Kis et al. 1998). Las respuestas observadas por estos autores son similares a las que ocurren cuando hay una disminución en la temperatura de crecimiento (Los y Murata, 1998). En dinoflagelados simbioses existen solo un par de estudios que han detectado diferencias asociadas a las condiciones lumínicas (Zhukova y Titlyanov 2006, Papina et al 2007). Se

requiere estudiar a mayor detalle este factor para separar el componente genético del ambiental, ya que en ambos trabajos no se determinó la identidad genética del dinoflagelado simbiote por lo que queda por explorar si estos cambios se deben a un cambio en las poblaciones de dinoflagelados simbiotes o a cambios en la composición de ácidos grasos solamente. Es importante explorar en un futuro el efecto de la luz en la composición de ácidos grasos ya que en los eventos de blanqueamiento, la luz aumenta debido a la baja en la densidad de células simbiotes (Enríquez et al. 2005) y el efecto del incremento en la luz incidente puede desencadenar respuestas en los ácidos grasos, que de acuerdo a la literatura parecen opuestas al efecto del incremento en temperatura.

Los resultados en su conjunto sugieren que se requiere un análisis más completo que incluya otros componentes de las membranas fotosintéticas y mayor número de especies estudiadas para encontrar una generalización, en caso de que exista. Aunque por lo comparado con otros trabajos parece que la estrategia es compleja y variable de acuerdo a dependiente del filotipo. Algunos autores han propuesto que la tolerancia térmica es específica del clado al que pertenece el dinoflagelado simbiote (Baker et al. 2004, Garren et al. 2006), proponiendo que los simbiotes pertenecientes al clado D son resistentes a altas temperaturas. Se ha observado dos cepas de *Prochlorococcus* cuya identidad de la secuencia ribosomal es de 97% (Rocap et al. 2003), habitan diferentes nichos ecológicos. En cultivos de *Symbiodinium* de un mismo clado, la variación genética de esta región es de 2 a 4% (Sotka y Thacker 2005), por lo que las diferencias genéticas funcionales entre *Symbiodinium* del mismo clado pueden ser similares a aquellas observadas en *Prochlorococcus*. Estas observaciones coinciden con este trabajo donde encontramos diferencias en la temperatura de fusión de la membrana fotosintética de dos cultivos pertenecientes al mismo clado (*Symbiodinium* sp. (A1) y *S. pilosum* (A2)).

En cuanto a las implicaciones de la composición de los ácidos grasos y el blanqueamiento, sabemos que la luz elevada es un factor adicional involucrado, generando especies reactivas de oxígeno (Lesser 1997); se ha descrito que el

estrés lumínico genera daño oxidativo en ácidos grasos polinsaturados de los tilacoides (Niyogi 1999), la observación de que la alta temperatura de crecimiento genera menor cantidad de ácidos grasos poli-insaturados puede ser un factor que este mayormente relacionado a prevenir este daño que a contribuir a incrementar la fluidez de la membrana.

Sin embargo se sabe que los ácidos grasos poli-insaturados son requeridos para el proceso de maduración de la proteína D1 (que es parte del complejo separador de agua) del fotosistema II (Gombos y Murata 1998). Por lo tanto la saturación juega un papel importante en el blanqueamiento del coral ya que el organismo está sujeto a diversos procesos cuyo resultado puede ser opuesto, es decir, en general disminuir la saturación de ácidos grasos al aumento de temperatura, aumentar la saturación al aumentar la luz, y aumentar la saturación para la maduración de la proteína D1.

Cabe destacar que *Symbiodinium sp.* (A1) mostró en general mayores cambios en su composición de ácidos grasos, lo que implica mayores requerimientos energéticos para llevar a cabo esta aclimatación o un mayor daño por la alta temperatura. En el caso de la aclimatación, es posible que estos requerimientos eviten que los dinoflagelados mantengan su aporte energético al hospedero en igual nivel, o que se afecte su adecuación para competir con los otros dinoflagelados presentes en el coral, como se ha podido observar en otras especies (Leroi et al. 1994). En cualquiera de los dos casos, una hipótesis es que el resultado de estos cambios en la composición de ácidos grasos sea la ruptura de esta simbiosis, sin embargo sería importante realizar estos mismos análisis en corales intactos para poder explorar estas opciones.

Es importante resaltar que hace falta un análisis más a fondo, ya que diversos autores (Takahashi et al. 2008, Venn et al. 2008) han considerado, basándose en las observaciones de Tchernov et al. (2004), que la saturación de los ácidos grasos es uno de los factores determinantes para el blanqueamiento del coral. Este trabajo no confirma las observaciones realizadas por estos autores, e indican fuertemente que el grado de saturación de los ácidos grasos

de las membranas celulares podría no ser el mejor indicador ni el único factor involucrado en la sensibilidad térmica del aparato fotosintético.

Finalmente es importante destacar que diversos autores coinciden en que el incremento en los eventos de blanqueamiento sugiere que la tasa de aclimatación no podrá coincidir con la tasa de incremento de la temperatura (Hoegh-Guldberg 1999, Sotka y Thacker 2005 entre otros). Aun cuando en este trabajo se observó una posible aclimatación, parece ser que ésta aclimatación es limitada al estar también acompañada de daño por la alta temperatura, por lo tanto una aclimatación efectiva en el panorama del calentamiento global no parece posible.

## Conclusiones

- Los dinoflagelados simbiosntes presentaron una temperatura de fusión de sus membranas fotosintéticas diferente para cada filotipo.
- La temperatura de fusión de la membrana fotosintética pudo relacionarse con la sensibilidad térmica del aparato fotosintético en los dinoflagelados simbiosntes, observada como la caída de la eficiencia de separación de carga del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ).
- La sensibilidad térmica de la membrana fotosintética parece estar relacionada con la temperatura óptima de crecimiento.
- La temperatura de fusión de la membrana fotosintética en dinoflagelados simbiosntes tiene un fuerte componente genético que la determina, observándose 4.5° C de diferencia entre los filotipos cultivados en iguales condiciones de luz y temperatura.
- Aunque *Symbiodinium sp.* (A1) y *Symbiodinium sp.* (C1) tienen una composición de ácidos grasos diferente, esta diferencia no se refleja como una fluidez diferencial de la membrana fotosintética a 24°C.
- Al deducir y comparar la actividad de enzimas que modifican a los ácidos grasos en membranas celulares entre los filotipos estudiados, solo las diferencias de alargamiento e isomerización se observaron tanto en membranas de células completas como en la fracción enriquecida en membranas del cloroplasto y el efecto fue contrario para cada filotipo.
- La temperatura de crecimiento es un factor ambiental que puede modificar la temperatura de fusión de la membrana fotosintética. La respuesta a este factor mantiene un componente genético.
- Los análisis de la composición de ácidos grasos de células completas no son una buena aproximación cuando se busca medir el efecto de la temperatura empleando como indicador la eficiencia de separación de carga del fotosistema II,  $F_v/F_m$ .
- En *Symbiodinium sp.* (A1) pareciera que la desaturación es importante para regular la fluidez de la membrana a alta temperatura. Sin embargo

estas diferencias no se mantienen en la fracción enriquecida de membranas de cloroplasto en donde el alargamiento de los ácidos grasos parece ser mas importante.

- El grado de saturación de los ácidos grasos de las membranas celulares podría no ser el mejor indicador ni el único factor involucrado en la sensibilidad térmica.
- Las diferencias observadas en la composición de ácidos grasos de membranas de células completas y de cloroplastos, crecidos a una temperatura de 31°C, parecen relacionarse con una fluidez diferencial de la membrana fotosintética, e indican una respuesta diferente para cada simbiote.
- *Symbiodinium sp.* (A1) parece tener un rango de tolerancia a la temperatura mas estrecho que *Symbiodinium sp.* (C1).

## **Anexos**

### **Protocolo de extracción de ácidos grasos**

1. Tomar el volumen de células completas o de fracción que contenga 0.5mg de clorofila *a*.
2. Agregar 25µl de estándar interno (C17:0) diluido a 1mg/ml.
3. Aforar a 500µl con solución salina
4. Agregar 1ml de metanol con BHT (0.002%), vortexear, 2 ml de cloroformo, vortexear y dejar tapado en agitación durante 12 horas.
5. Centrifugar a 3,000 rpm durante 2 minutos
6. Transferir la fase de abajo con una pipeta pasteur a un tubo limpio
7. Reextraer ácidos grasos que resten en la fase de arriba dos veces más.
8. Al extracto agregar 200µl de metanol con BHT (0.002%) y vortexear, debe verse transparente, si no agregar más metanol con BHT (0.002%)
9. Agregar 1/10 de volumen de sulfato de sodio anhidrocrystal ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), vortexear
10. Transferir el extracto por una pipeta con un filtro de algodón a un tubo limpio
11. Evaporar el extracto con nitrógeno gas.
12. Derivatizar agregando 100µl de tolueno, mezclar, 1860ml de metanol, mezclar y 40ml de ácido sulfhídrico, mezclar y tapar.
13. Poner en el horno a 90°C durante 2 horas, revisar continuamente evitando que se evapore.
14. Poner en hielo.
15. Agregar 1ml de NaCl 5% y 2ml de hexano, vortexear durante 30 segundos, dejar reposar 5 minutos
16. Transferir la fase de arriba a un tubo limpio
17. Repetir la extracción a la fase de abajo
18. Transferir la fase de arriba al tubo limpio
19. Evaporar con nitrógeno gas
20. Tapar los tubos herméticamente y guardar a -20°C



**Tabla 1. Porcentaje de ácidos grasos identificados de las células completas crecidas a diferentes cultivadas a 24°C y 31°C.**

(AGS= Ácido Graso Saturado, AGMI= Ácido Graso Monoinsaturado, AGPI= Ácido Graso Poliinsaturado)

Ácido Graso	<i>Symbiodinium sp. (C1)</i>		<i>Symbiodinium sp. (A1)</i>	
	24 °C	31 °C	24 °C	31 °C
C16:0	30.0 ± 3.9	32.8 ± 1.7	34.8 ± 1.2	27.3 ± 2.4
C16:1 (n-9)	2.1 ± 0.7	2.6 ± 0.6	1.8 ± 0.1	3.0 ± 1.2
C18:0	19.9 ± 1.7	17.9 ± 2.4	20.9 ± 1.5	22.2 ± 1.2
C18:1 (n-9t)	4.7 ± 1.9	3.7 ± 2.0	3.1 ± 2.6	7.3 ± 0.6
C18:1 (n-9c)	11.1 ± 3.8	10.8 ± 3.8	10.2 ± 2.8	8.9 ± 2.0
C18:1 (n-7c)	4.7 ± 1.4	4.2 ± 0.9	2.0 ± 0.7	2.6 ± 0.9
C18:2 (n-9)	3.1 ± 2.7	2.5 ± 0.5	5.3 ± 2.4	2.5 ± 1.2
C18:3 (n-9)	14.0 ± 1.8	12.1 ± 4.9	4.6 ± 3.2	22.8 ± 4.4
C20:1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.0
C18:4	4.9 ± 2.5	6.0 ± 1.8	9.7 ± 1.8	4.4 ± 0.6
C22:5 (n-3)	0.8 ± 0.4	0.7 ± 0.3	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.0
C22:6 (n-3)	4.4 ± 1.2	7.0 ± 2.1	7.1 ± 0.7	2.7 ± 1.6
AGS	49.9 ± 5.3	50.7 ± 4.0	55.7 ± 0.5	49.4 ± 3.5
AGMI	22.8 ± 4.9	21.5 ± 5.0	17.3 ± 5.4	21.9 ± 1.8
AGPI	27.3 ± 0.4	28.4 ± 5.7	27.0 ± 5.6	28.6 ± 5.2
Δ9-desaturasa (16)	6.4 ± 1.4	7.3 ± 1.6	5.0 ± 0.2	9.9 ± 3.8
Δ9-desaturasa (18)	35.5 ± 9.2	37.2 ± 9.5	32.5 ± 7.5	28.4 ± 3.8
Δ15-desaturasa	74.8 ± 6.9	73.3 ± 6.7	66.1 ± 15.3	86.3 ± 8.4
Δ6-desaturasa	25.2 ± 11.9	34.2 ± 11.8	69.2 ± 14.8	20.6 ± 7.9
Δ4/Δ5 desaturasa	7.1 ± 3.8	0.8 ± 0.6	9.1 ± 7.1	2.5 ± 1.7
Elongasa	43.4 ± 4.6	37.6 ± 3.7	39.5 ± 4.1	49.4 ± 1.9
ΣC16	32.1 ± 4.7	35.4 ± 1.7	36.6 ± 1.3	30.3 ± 2.5
ΣC18	62.4 ± 5.3	57.2 ± 3.4	55.7 ± 2.1	66.6 ± 4.2
ΣC22	5.3 ± 0.8	7.7 ± 2.0	7.4 ± 0.9	3.1 ± 1.6

**Tabla 2. Porcentaje de ácidos grasos identificados de la fracción enriquecida de cloroplastos obtenida de cultivos crecidos a 24°C y 31°C**

(AGS= Ácido Graso Saturado, AGMI= Ácido Graso Monoinsaturado, AGPI= Ácido Graso Poliinsaturado)

Ácido Graso	<i>Symbiodinium sp. (C1)</i>		<i>Symbiodinium sp. (A1)</i>	
	24 °C	31 °C	24 °C	31 °C
C16:0	32.6 ± 2.8	34.6 ± 2.8	40.7 ± 4.7	35.1 ± 2.4
C16:1 (n-9)	2.2 ± 0.4	2.48 ± 0.5	2.5 ± 0.5	1.8 ± 0.2
C18:0	21.4 ± 2.7	20.6 ± 2.0	20.2 ± 2.3	21.0 ± 1.8
C18:1 (n-9t)	6.0 ± 2.9	3.51 ± 1.6	1.8 ± 1.1	5.3 ± 2.3
C18:1 (n-9c)	10.7 ± 0.5	7.32 ± 1.2	5.1 ± 1.0	9.7 ± 1.1
C18:1 (n-7)	5.2 ± 0.4	5.14 ± 1.0	2.8 ± 0.9	2.6 ± 1.3
C18:2 (n-9)	2.8 ± 1.6	2.39 ± 0.8	1.5 ± 0.5	3.2 ± 1.5
C18:3 (n-9)	8.5 ± 3.2	9.12 ± 3.6	4.8 ± 1.4	8.1 ± 4.5
C20:1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
c18:4	5.4 ± 1.7	7.79 ± 3.5	10.4 ± 3.9	8.3 ± 3.5
c22:5 (n-3)	0.4 ± 0.1	0.43 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.3
c22:6 (n-3)	4.8 ± 2.5	6.43 ± 2.9	9.9 ± 1.9	4.5 ± 1.7
AGS	53.9 ± 5.5	55.2 ± 2.9	60.8 ± 6.3	56.1 ± 3.2
AGMI	24.2 ± 3.3	18.7 ± 2.1	12.3 ± 2.1	19.4 ± 4.0
AGPI	21.9 ± 6.8	26.2 ± 2.7	26.8 ± 4.3	24.5 ± 1.5
Δ9-desaturasa (16)	6.3 ± 0.7	6.77 ± 1.2	5.9 ± 1.3	4.8 ± 0.6
Δ9-desaturasa (18)	33.8 ± 3.6	26.1 ± 1.3	20.3 ± 4.9	31.7 ± 4.5
Δ15-desaturasa	73.6 ± 9.7	77.3 ± 2.6	75.8 ± 11.4	68.7 ± 14.4
Δ6-desaturasa	41.6 ± 17.0	48 ± 20.9	68.1 ± 5.8	51.6 ± 23.4
Δ4/Δ5 desaturasa	90.6 ± 4.4	93.1 ± 1.9	97.2 ± 0.9	89.5 ± 11.1
Elongasa	48.0 ± 0.4	43 ± 4.1	37.0 ± 2.7	45.5 ± 1.5
ΣC16	34.8 ± 3.2	37.1 ± 3.0	43.2 ± 4.7	36.9 ± 2.4
ΣC18	59.9 ± 2.3	55.9 ± 5.3	46.5 ± 5.8	58.1 ± 3.8
ΣC22	5.2 ± 2.6	6.86 ± 2.9	10.2 ± 1.8	4.9 ± 1.4

## Literatura citada

- Aminaka R., Taira Y., Kashino Y., Koike H. y Satoh K. (2006) Acclimation to the growth temperature and thermosensitivity of photosystem II in a mesophilic cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol.* 47(12): 1612–1621
- Ayala N. (2000) Variaciones interespecíficas en la sensibilidad térmica de dinoflagelados simbioses de coral y su papel en el blanqueamiento de coral. *Tesis de Maestría. ICMYL-Posgrado, UNAM, Agosto 2000.*
- Baker AC, Starger CJ, McClanahan TR, Glynn PW (2004) Corals' adaptive response to climate change. *Nature* 403:741.
- Bellwood D.R., Hughes T.P., Folke C., Nystro M. (2004) Confronting the coral reef crisis. *Nature* 429: 827-833.
- Berkelmans R., van Oppen M. (2006) The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a 'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. *Proc. R. Soc. B.* 273: 2305–2312.
- Birkeland C. Life and Death of coral reefs. Chapman & Hall, Londres, 1997.
- Bishop D.G., Bain, J.M., Downton J.S. (1976) Ultrastructure and lipid composition of zooxanthellae from *Tridacna maxima*. *Aust. J. Plant Physiol.* (3): 33-40.
- Bishop D., Kenrick J. (1980) Fatty acid composition of symbiotic Zooxanthellae in relation to their host. *Lipids* (10): 799-804.
- Blank R.J. (1987) Cell architecture of the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. inhabiting the Hawaiian coral *Montipora verrucosa*. *Mar. Biol.* (94): 143-155.
- Bucco Reef Trust y Coral Cay Conservation. Report on the 2005 mas coral bleaching event in Tobago. Part 1. Results from phase 1 survey.
- CARICOMP (J.D. Woodley & 29 others, 1997). Studies on Caribbean coral bleaching, 1995-96. *Proc. 8th Int. Coral Reef Symp.* 1:673-678
- Chaloub R., Silva L.M., Rodrigues M.A., Dos Santos C.P. (2003) Phase transition of thylakoid membranes modulates photoinhibition in the

cyanobacterium *Anabaena siamensis*. *Photosynthesis Research* 78: 143–152.

- Collados R., Andreu V., Picorel R., Alfonso M. (2006) A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of  $\omega$ 3 fatty-acid desaturases (FAD3, FAD7 and FAD8) in soybean photosynthetic cell suspensions. *FEBS Letters* (580): 4934-4940.
- Deshniun P., Paithoonrangsarid K., Suphatrakul A., Meesapyodsuk D., Tanticharoen M., Cheevadhanarak S. (2000) Temperature-independent and -dependent expression of desaturase genes in filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* strain C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438). *FEMS Microbiology Letters* 184: 207-213.
- Diekmann O.E., Olsen J.L., Stam W.T., Bak R.P.M. (2003) Genetic variation within *Symbiodinium* clade B from the coral genus *Madracis* in the Caribbean (Netherlands Antilles). *Coral Reefs* 22: 29–33.
- Douglas, A. E. (2003). Coral bleaching — how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46, 385–392
- Dove S. (2004) Scleractinian corals with photoprotective pigments are hypersensitive to thermal stress. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 272: 99-116.
- Enriquez S., Méndez E.R., Iglesias-Prieto R. (2005) Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol. Oceanogr.* 50(4): 1025-1032.
- Fabricius K. (2006) Effects of irradiance, flow, and colony pigmentation on the temperature microenvironment around corals: Implications for coral bleaching? *Limnol. Oceanogr.* 51(1): 30-37.
- Falcone D. L., Ogas J.P., Somerville C. R. (2004) Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol.* 4 (1): 17.
- Fitt W.K., Brown B.E., Warner M.E., Dunne R.P. (2001) Coral bleaching: interpretation of thermal tolerance limits and thermal threshold in tropical corals. *Coral Reefs* 20: 51-65.

- Gallagher J.C. (1980) Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay. *J. Phycol.* 16: 464-474.
- Garren M, Walsh S.M., Caccone A., Knowlton N. (2006). Patterns of association between *Symbiodinium* and members of the *Montastraea annularis* species complex on spatial scales ranging from within colonies to between geographic regions. *Coral Reefs* 25: 503–512.
- Gates R., Bachdasarian G., Muscatine L. (1992) Temperature Stress Causes Host Cell Detachment in Symbiotic Cnidarians: Implications for Coral Bleaching. *Biol. Bull.* 182: 324-332.
- Gibson S., Arondel V., Iba K., Somerville C. 1994 Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106 (4): 1615-1621.
- Glynn PW (1993) Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs* 12:1-17.
- Gombos Z., Murata N. (1998) Genetic Engineering of the unsaturation of membrane glycerolipid: effect of the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. En *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*. Siegenthaler P. y Murata N. editores. Kluwer Academic Publishers, EUA p. 249-262.
- Gorrez y MacPherson (2006) Calculation number of people directly dependent on marine resources of the MAR, [www.healthyreefs.org](http://www.healthyreefs.org)
- Govindje V. (1995) Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence. *Aust. J. Plant. Physiol.* 22: 131-60.
- Harwood J.L. (1998) Involvement of chloroplast lipids in the reaction of plants submitted to stress. En *Lipids in photosynthesis: structure, function and genetics*. Siegenthaler P. y Murata N. editores. Kluwer Academic Publishers, EUA, 1998 (p. 287-302).
- Hoegh-Guldberg, O., Smith, G.J. (1989) The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylophora pistillata* Esper and *Seriatopora hystrix* Dana. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129, 279–303.

- Hoegh-Guldberg O. (1999) Climate change, coral bleaching and the future of world's coral reefs. *Mar. Freshwater Res.* 50: 839-866.
- Hoegh-Guldberg O., Mumby P.J., Hooten A.J., Steneck R.S., Greenfield P., Gomez E., Harvell C.D., Sale P.F., Edwards A.J., Caldeira K., Knowlton N., Eakin C.M., Iglesias-Prieto R., Muthiga N., Bradbury R.H., Dubi A., Hatzioiols M.E. (2007) Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* 318: 1737-1742.
- Hughes T.E., Baird A.H., Bellwood D.R., Card M., Connolly S.R., Folke C., Grosberg R., Hoegh-Guldberg I.O., Jackson J.R., Kleypas J., Lough J.M., Marshall P., Nystrom M., Palumbi S.R., Pandolfi J. M., Rosen B., Roughgarden J. (2003) Climate change, human impacts and the resilience of coral reefs *Science* Vol. 301, pp. 929 - 933.
- Iglesias-Prieto R., Matta J. L., Robins W. A., Trench R. K. (1992) Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10302-10305.
- Iglesias-Prieto R., Govind N.S., Trench R.K. (1993) Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (340): 381-392.
- Iglesias-Prieto R., Trench R.K. (1997) Temperature-dependent inactivation of photosystem II in symbiotic dinoflagellates. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Coral Reef Symp.* 2: 1313-1318.
- Jokiel P.L., Coles S.L. (1990) Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs* 8:155-162.
- Jones R.J., Hoegh-Guldberg O., Larkum W.D., Schreiber U. (1998) Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO<sub>2</sub> fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell Environ.* 21: 1219-1230.
- Kemp D.W., Cook C.B., LaJeunesse T.C., Brooks W.R. (2006) A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 335: 266–276.

- Kis M., Zsiros O., Farkas T., Wada H., Nagy F., Gombos Z. (1998) Light-induced expression of fatty acid desaturase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4209-4214.
- Klyachko-Gurvicha G.L., Tsoglina L.N., Douchab J., Kopetskiib J., Shebalina I.B. (Ryabykh), Semenenkoa V.E. (1999) Desaturation of fatty acids as an adaptive response to shifts in light intensity. *Physiol. Plant.* 107: 240–249.
- LaJeunesse T.C. (2001) Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of the endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a "species" level marker. *J. Phycol.* 37: 866-880.
- LaJeunesse T.C. (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Mar. Biol.* 141, 387–400.
- LaJeunesse T.C., Trench R.K. (2000) Biogeography of Two Species of *Symbiodinium* (Freudenthal) Inhabiting the Intertidal Sea Anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Biol. Bull.* 199: 126–134.
- Leblond J.D., Chapman P.J. (1999) Lipid class distribution of highly unsaturated long chain fatty acids. *J. Phycol.* 36: 1103–1108.
- Leggat W., Ainsworth T., Bythell J., Dove S., Gates R., Hoegh-Guldberg O., Iglesias-Prieto R., Yellowlees D. (2007a) The hologenome theory disregards the coral holobiont. *Nat. Rev. Microbiol.* DOI:10.1038/nrmicro1635C1.
- Leggat W., Hoegh-Guldberg O., Dove S. (2007b) Analysis of an EST library from the dinoflagellate (*Symbiodinium* sp.) symbiont of reef-building corals. *J. Phycol.* (43): 1010–1021.
- Leroi A.M., Bennett A.F., Lenski R.E. (1994) Temperature acclimation and competitive fitness: an experimental test of the beneficial acclimation assumption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(5): 1917-1921.
- Lesser M.P. (1997) Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs* 16: 187-192.
- Lewis C. Coffroth M.A. (2004) The acquisition of exogenous algal symbionts by an octocoral after bleaching. *Science* 304:1490-1492.
- Little, A.F., van Oppen M.J.H., Willis B.L. (2004) Flexibility in algal endosymbioses shapes growth in reef corals. *Science* 304: 1492-1494.

- Locke J.M., Weil E., Coates K.A. (2007) A newly documented species of *Madracis* (Scleractinia: Pocilloporidae) from the Caribbean. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 120(2):214–226.
- Los D.A., Murata N. (1998) Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim. Biophys. Acta* 1394: 3-15.
- McKersie B.D., Thompson J.E. (1979) Influence of Plant Sterols on the Phase Properties of Phospholipid Bilayers. *Plant Physiol.* 63: 802-805.
- Merino M., Otero L. *Atlas ambiental costero Puerto Morelos – Quitana Roo*. CONACYT-UNAM, Centro de investigaciones de Quintana Roo, Fondo de Publicaciones y Ediciones, México, 1983. p. 39-40.
- Mooney B.D., Nichols P.D., Salas M.E., Hallegraeff G.M. (2007) Lipid, fatty acid and sterol composition of eight species of Kareniaceae (Dinophyta): Chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins. *J. Phycol.* 43: 101-111.
- Murakami Y., Tsuyama M., Kobayashi Y., Kodama H. & Iba K. (2000) Tirenolic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science* 287: 476-479.
- Muscatine L. (1990). The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. En: *Coral Reefs, Ecosystems of the World 25*, (ed Dubinsky Z), p. 75-87. Elsevier, Amsterdam.
- Nigoyi K.K. (1999) Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-59.
- Papina M., Meziane T., van Woesik R. (2003) Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol., B* 135: 533–537.
- Papina M., Meziane T., van Woesik R. (2007) Acclimation effect on fatty acids of the coral *Montipora digitata* and its symbiotic algae. *Comp. Biochem. Physiol., B* 147: 583–589.
- Penin L., Adjeroud M., Schrimm M., Lenihan H.S. (2007) High spatial variability in coral bleaching around Moorea (French Polynesia): patterns across locations and water depths. *C. R. Biologies* 330: 171–181.



- Robinson J.D., Warner M. (2006) Differential impacts of photoacclimation and thermal stress on the photobiology of four different phylotypes of *Symbiodinium* (Pyrrhophyta). *J. Phycol.* 42, 568–579.
- Rocap G., Larimer F.W., Lamerdin J., Malfatti S., Chain P., Ahlgren N.A., Arellano A., Coleman M., Hauser L., Hess W.R., Johnson Z.I., Land M., Lindell D., Post A.F., Regala W., Shah M., Shaw S.L., Steglich C., Sullivan M.B., Ting C.S., Tolonen A., Webb E.A., Zinser E.R., Chisholm S.W. (2003) Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature.* 424(6952):1001-2.
- Rowan R. (1998) Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J. Phycol.* 34, 407–417.
- Smith D.J., Suggett D.J. & Baker N.R. (2005) Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biol.* (11): 1–11.
- Somerville C., Browse J. (1996) Dissecting desaturation: plants prove advantageous. *Trends in Cell Biol.* 6: 148-153.
- Sotka E.E., Thacker R.W. (2005) Do some corals like it hot? *Trends Ecol. Evol.* 20: 59-62.
- Stat M., Carter D., Hoegh-Guldberg O. (2006) The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts — Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 8: 23–43.
- Stat Soft, Inc. 2003 STATISTICA (data analysis software system), version 6. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Takahashi S., Whitney S., Itoh S., Maruyama T., Badger M. (2008) Heat stress causes inhibition of the de novo synthesis of antenna proteins and photobleaching in cultured *Symbiodinium*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105(11): 4203-4208.
- Tchernov D., Gorbunov M. Y., Vargas C., Yadav S.N., Milligan A. J., Häggblom & Falkowski P. G. (2004) Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 13531-13555.

- Trench (1987) Dinoflagellates in non-parasitic symbioses. p. 530–570 En *The Biology of Dinoflagellates*, F. J. R. Taylor, ed. Blackwell, Oxford.
- Ulstrup K.E., Berkelmans R., Ralph P.J., van Oppen M.J.H. (2006) Variation in bleaching sensitivity of two coral species across a latitudinal gradient on the Great Barrier Reef: the role of zooxanthellae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 314: 135-148.
- Venn A.A., Loram J.E., Douglas A.E. (2008) Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* 59(5): 1069-1080.
- Vijayan P., Browse J. (2002) Photoinhibition in mutants of Arabidopsis deficient in thylakoid unsaturation. *Plant Physiol.* 129 (2): 876-885.
- Voet D., Voet J.G. (1990) *Biochemistry*. John Wiley and Sons, Estados Unidos. Pag 271 a 303.
- Warner M.E., Fitt W.K., Shmidt G.W. (2007) Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 8007-8012.
- Yamashiro H., Oku H., Onaga K. (2005) Effect of bleaching on lipid content and composition of Okinawan corals. *Fish. Sci.* 71: 448-453.
- Zar J.H. 1999 *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, N.J. Prentice-Hall.
- Zhukova N.V., Titlyanov E.A. (2003) Fatty acid variations in symbiotic dinoflagellates from Okinawan corals. *Phytochemistry* (62): 191-195.
- Zhukova N., Titlyanov E. (2006) Effect of light intensity on the fatty acid composition of dinoflagellates symbiotic with hermatypic corals. *Botanica Marina* 49(4) 339-346.