



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Respuesta de fotoaclimatación de dos especies de dinoflagelados
simbiontes *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *Symbiodinium*
kawagutii bajo un evento de estrés térmico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LUIS ALEJANDRO GONZÁLEZ GUERRERO



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. ROBERTO IGLESIAS PRIETO
2011**



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
González
Guerrero
Luis Alejandro
56781384
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
300502606
2. Datos del tutor
Dr.
Roberto
Iglesias
Prieto
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Susana
Enríquez
Domínguez
4. Datos sinodal 2
Dra.
Luisa Isaura
Falcón
Alvarez
5. Datos sinodal 3
Dr.
Eberto
Novelo
Maldonado
6. Datos sinodal 4
Dr.
Arturo Carlos II
Becerra
Bracho
7. Datos del trabajo escrito
Respuesta de fotoaclimatación de dos especies de dinoflagelados simbiotes *Symbiodinium*
sp. filotipo A (53) y *Symbiodinium kawagutii* bajo un evento de estrés térmico
60 p
2011

INDICE

LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	4
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	10
OBJETIVOS	15
HIPÓTESIS	15
METODOLOGIA	16
CRECIMIENTO Y CONDICIONES EXPERIMENTALES	16
ESTIMACIÓN DE LA TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICA	17
CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS (CHL A Y CHL C2).....	19
COEFICIENTE ESPECÍFICO DE ABSORCIÓN (A*)	19
MEDIDAS DE FLUORESCENCIA: MÁXIMA EFICIENCIA FOTOQUÍMICA (Fv/Fm), EFICIENCIA FOTOQUÍMICA EFECTIVA ($\Delta F/Fm'$) Y TASA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES (ETR).....	21
CURVAS FOTOSÍNTESIS- IRRADIANCIA (P-E)	23
EFICIENCIA CUÁNTICA (ϕ_{MAX} , MOLES DE O2 EVOLUCIONADO POR FOTÓN ABSORBIDO) Y REQUERIMIENTO CUÁNTICO MÍNIMO DE LA FOTOSÍNTESIS (1/ ϕ_{MAX} MOLES DE FOTONES REQUERIDOS PARA EVOLUCIONAR UNA MOLÉCULA DE O2)	25
RESULTADOS	26
CURVAS DE CRECIMIENTO Y TASA DE CRECIMIENTO ESPECÍFICA	26
CONCENTRACIÓN DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS (CHL A Y CHL C2).....	28
ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LUZ	29
COEFICIENTE ESPECÍFICO DE ABSORCIÓN DE LA CHL A ($A^*_{CHL A}$).....	29
MÁXIMA EFICIENCIA FOTOQUÍMICA (Fv/Fm).....	32
CURVAS FOTOSÍNTESIS-IRRADIANCIA (P-E)	33
CURVAS ETR.....	38
EFICIENCIA CUÁNTICA (ϕ_{MAX}) Y MÍNIMO REQUERIMIENTO CUÁNTICO DE LA FOTOSÍNTESIS (1/ ϕ_{MAX})	42
DISCUSIÓN	43
CRECIMIENTO	43
ESTRATEGIA DE ACLIMATACIÓN DE <i>SYMBIODINIUM</i> SP. FILOTIPO A (53) Y <i>S. KAWAGUTII</i>	44
EFICIENCIA DE ABSORCIÓN DE LUZ	45
EFICIENCIA FOTOQUÍMICA	46
EFICIENCIA FOTOSINTÉTICA	46
TASA DE RESPIRACIÓN Y TASA FOTOSINTÉTICA MÁXIMA	47
MÍNIMO REQUERIMIENTO CUÁNTICO(1/ ϕ_{MAX}) Y EFICIENCIA CUÁNTICA (ϕ_{MAX}).....	47
LIMITACIONES DE RELETR	48
LIMITACIONES DE LAS CURVAS RÁPIDAS DE LUZ (RLCs)	51
CONCLUSIONES	55
ANEXO	56
REFERENCIAS	56

Lista de figuras

Fig. 1. Esquema simplificado del PSU (Unidad Fotosintética)

Fig. 2. Esquema del diseño experimental.

Fig. 3. Ejemplo de curva de crecimiento sigmoideal

Fig. 4. Diagrama de cámara de Neubauer.

Fig. 5. Arreglo experimental para medidas de fluorescencia.

Fig. 6. Segundo arreglo experimental para curvas ETR.

Fig. 7. Cámara de fase líquida Hansatech para electrodo.

Fig. 8. Arreglo experimental para curvas Fotosíntesis-Irradiancia.

Fig. 9. Curva de crecimiento de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53).

Fig. 10. Curva de crecimiento de *Symbiodinium kawagutii*.

Fig. 11. Espectros de absorptancia de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii*

Fig. 12. Variación del coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* ($a^*_{chl\ a}$) en función de la densidad de pigmentos por área ($mg\ Chl\ a\ m^{-2}$) a dos diferentes escalas (a) escala normal, (b) escala logarítmica entre a 28 °C y 31 °C en *S. kawagutii*.

Fig. 13. Variación del coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* ($a^*_{chl\ a}$) en función de la densidad de pigmentos por área ($mg\ Chl\ a\ m^{-2}$) a dos diferentes escalas (a) escala normal, (b) escala logarítmica entre *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii*.

Fig. 14. Curvas Fotosíntesis-Irradiancia (P-E) de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y de *S. kawagutii* normalizadas por número de células y por chl *a* para el tratamiento control y el tratamiento experimental a 31°C.

Fig. 15. Gráficas de los valores promedio de α , Pmax y E_K (\pm SE) normalizados por células de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) a 24 °C y 31 °C y *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C.

Fig. 16. Gráficas de los valores promedio de α , Pmax y E_K (\pm SE) normalizados por Chl *a* de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) a 24 °C y 31 °C y *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C.

Fig. 17. Curvas de ETR vs. Irradiancia del 4to y el 5to experimento a 24°C y 31°C en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53).

Fig. 18. Curvas de ETR vs. Irradiancia del 2do, 3er y 4to experimento a 28°C y 31°C en *S. kawagutii*.

Fig. 19. Gráficas de los valores de la eficiencia cuántica (ϕ) y del mínimo requerimiento cuántico ($1/\phi$) para *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii*.

Fig. 20. Curvas P-E idealizadas de organismos aclimatados a baja luz y alta luz.

Fig. 21. Comparación de las curvas ETR con la curvas reETR en *S. kawagutii* del 3er y 4to experimento a 28°C.

Fig. 22. Esquema de ISI WEB citation map, de los artículos publicados con la técnica de RLC's.

Fig. 23. Curva de inducción que muestra el decaimiento de la eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F_m'$), conforme aumenta la intensidad de la irradiancia hasta alcanzar el equilibrio dinámico (F).

Fig. 24. Curva de inducción de luz en *Montastrea faveolata* donde graficamos ($\Delta F/F_m'$) contra tiempo (min)

Fig. 25. Gráfico del tiempo de inducción contra Irradiancia en el coral *Monstastrea annularis*.

Fig. 26. Correlación de ETR contra la evolución de O₂ a tres tiempos de inducción de luz actínica (10 seg, 1min y 3min) a 28 °C en *S. kawagutii*.

Lista de tablas

Tabla 1. Concentración de Chl *a* y Chl *c2* el día 14 y 17 de la fase de crecimiento para *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii*.

Tabla 2. Valores de Fv/Fm en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii*.

Tabla 3. Valores promedio de los parámetros de las curvas P-E (P_{MAX}, Respiración, α , E_k y E_c) en *Symbiodinium* sp. filotipo a (53) y *S. kawagutii* normalizados por células.

Tabla 4. Valores promedio de los parámetros de las curvas P-E (P_{MAX}, Respiración, α , E_k y E_c) en *Symbiodinium* sp. filotipo a (53) y *S. kawagutii* normalizados por clorofila a.

Tabla 5. Valores de absorptancia (A) de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) a 24°C y 31°C para el 4to y 5to experimento y dje *S. kawagutii* a 28 °C y 31°C del 2do, 3er y 4to experimento.

Tabla 6. Valores promedio de los parámetros α_{ETR} y ETR_{max} en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) a 24°C y 31°C en el 4to y 5to experimento, y en *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C en el 2do, 3er y 4to experimento

Respuesta de fotoaclimatación de dos especies de dinoflagelados simbiotes *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *Symbiodinium kawagutii* bajo un evento de estrés térmico

Luis A. González Guerrero

RESÚMEN: Análisis de la variación de la Tasa Relativa de Transporte de Electrones (reETR) son ampliamente utilizados para estimar cambios relativos en la actividad fotosintética sin considerar cambios en la sección transversal de absorción de luz. Este parámetro se obtiene de la fluorescencia de la clorofila *a*, asumiendo que la actividad fotosintética está en equilibrio dinámico (steady-state) a una determinada irradiancia. Con el fin de evaluar la capacidad de reETR de describir la actividad fotosintética, se analizó su variación en dos especies del género *Symbiodinium*: *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *Symbiodinium kawagutii* sometidas a diferentes temperaturas (24, 28 y 31°C). Se determinó el contenido celular de pigmentos (Ci), el coeficiente específico de absorción de luz (a^*_{Chla}), las eficiencias fotoquímicas máxima (Fv/Fm) y efectiva (DF/Fm') y la evolución de O₂. Nuestros resultados confirman estudios anteriores que identificaron respuestas específicas de cada especie al incremento de temperatura reflejadas en cambios en la eficiencia para coleccionar luz, eficiencias fotoquímica, fotosintética y cuántica, y la tasa máxima fotosintética. Así mismo mostramos como los parámetros α_{ETR} y ETR_{MAX} derivados de la señal de fluorescencia y obtenidos en curvas rápidas (RLC) de inducción (t = 10s); y/o en respuestas con tiempos de inducción mayores de (t = 1 min y 3 min), y estimados como reETR no son equiparables con los parámetros α y P_{MAX} obtenidos con la técnica de evolución de O₂. De este modo se demuestra que los descriptores derivados de RLC y el uso de reETR no pueden ser utilizados en comparaciones inter o/y intraespecíficas ni permiten reconocer diferencias en las respuestas de aclimatación a un cambio ambiental pues no consideran una respuesta clave que involucra los cambios en la sección efectiva de absorción de luz, ni respetan los tiempos de inducción del equilibrio dinámico de la fotosíntesis.

Palabras clave: *reETR*, *RLC*, *coeficiente específico de absorción*, *fluorescencia*, *Symbiodinium*,

INTRODUCCIÓN

El género de dinoflagelados *Symbiodinium* pertenece al reino Protista, clase Dinophyceae, orden Suessiales, familia Symbiodiniaceae, se caracteriza por ser unicelular fototrófico, de forma cocoide de color café-amarillento. La importancia de este género radica en que forma relaciones mutualistas con una amplia variedad de invertebrados marinos y protistas (Cnidaria, Mollusca, Platelminos Porifera, Foraminíferos) y aunque se le puede encontrar en forma de vida libre en la columna de agua (apobionte), lo más común es encontrarlo en estado simbiótico con su respectivo hospedero (holobionte) (Trench 1987, Stat et al 2006)

Anteriormente por la aparente falta de variación morfológica, se creía que sólo existía una especie representativa en este género: *Symbiodinium microadriaticum* (Freudenthal 1962) Ante esta temprana conclusión, con la utilización conjunta de técnicas de cultivo y estudios bioquímicos, fisiológicos, morfológicos y conductuales, se empezaron a mostrar variaciones en diferentes características: número y tamaño de cromosomas (Blank y Trench 1985a), número tamaño, y arreglo de cloroplastos (Trench y Blank 1987), patrones de motilidad (Fitt et al 1981), diferencias en la antena colectora de luz y en fotobiología adaptativa (Chang et al. 1983; Chang y Trench 1984) y en diferentes perfiles isoenzimáticos (Schoenberg y Trench 1980), todo esto suficiente evidencia para sugerir la existencia de más de una especie dentro del género, y que posteriormente derivó en la caracterización de más especies: *Symbiodinium kawagutii*, *Symbiodinium goreau*, *Symbiodinium pilosum*, *Symbiodinium linucheae* y *Symbiodinium trenchi*. Tiempo después con el desarrollo de técnicas moleculares de rDNA, basándose en la regiones 18S, 28S y ITS, se comprobó la amplia diversidad dentro del gen, *Symbiodinium*, el cual se divide en 8 clados bien diferenciados (A-H), con una amplia diversidad de subclados dentro de cada uno (LaJeunesse, 2001)

La mayoría de los estudios se han enfocado a entender la simbiosis existente entre el género *Symbiodinium* con los corales de la clase Scleractinia, los cuales son capaces de calcificar, formando un esqueleto de aragonita que es el elemento con el cual se forman las grandes estructuras arrecifales en aguas tropicales oligotróficas. Estas estructuras biogénicas forman los ecosistemas marinos más diversos en la Tierra, ya que albergan aproximadamente 25% de las especies marinas. Los servicios ecosistémicos y económicos que brindan representan fuertes ingresos a través del turismo y pesquerías alrededor del mundo. Al mismo tiempo, las estructuras arrecifales funcionan como rompeolas naturales contra tormentas y huracanes, protegiendo la infraestructura costera (Buddemeier R. et al 2004, Moberg F. et al 1999).

El éxito evolutivo de los corales que los ha mantenido por más de 200 millones de años en la Tierra (Veron 1995) se debe a esta relación simbiótica: *Symbiodinium sp.* habita dentro del endodermo del

coral hospedero y trasloca el 95% de sus productos fotosintéticos principalmente glicerol, azúcares, péptidos, y aminoácidos (Muscatine 1990; Trench 1987; 1993). Esta energía mantiene el crecimiento y la calcificación de los corales escleractíneos que son los principales constructores del arrecife (Colombo-Pallota et al 2010). Por su parte, *Symbiodinium* recibe nutrientes inorgánicos (amonio y fosfato) provenientes del metabolismo del hospedero (Muscatine 1990) que a la vez que le provee de un refugio seguro, le modula el campo lumínico en el que vive debido a la dispersión múltiple de la luz provocada por el esqueleto del coral. Gracias a las propiedades ópticas del esqueleto, se aumenta considerablemente la eficiencia de absorción de luz por parte del alga (Enríquez et al. 2005).

Se ha observado que esta asociación mutualista entre el hospedero no se restringe a un sólo clado de *Symbiodinium* sino, según sea el caso, un mismo hospedero puede albergar varios clados de este género (Rowan 1998; Rowan y Knowlton 1995). Esta coexistencia es generalmente estable dependiendo de las condiciones ambientales, pero se ha observado que pequeños cambios ambientales pueden romper este equilibrio en la asociación simbiótica.

Los arrecifes de coral han evolucionado millones de años enfrentando recurrentes disturbios; daño o destrucción, seguido de una recuperación y crecimiento. Estas son características naturales de la historia de un arrecife (Veron 1995, Hughes T. P. et al 1992) sin embargo, recientemente, debido al mal manejo de los recursos naturales, aunado a los cambios en el ambiente, se está sobrepasando la capacidad adaptativa y aclimatativa de los corales, organismos claves en el sistema arrecifal (Hoegh-Guldberg et al. 2007) una reducción en el crecimiento de los corales se va a expresar en un incremento en la degradación del sistema.

Desde mediados de los ochentas se ha registrado un alarmante deterioro en los arrecifes coralinos; ha habido una reducción significativa de la cobertura de coral vivo (27% por ciento en el mundo y 16 % esta en riesgo según la Unión Internacional para la Conservación). Numerosos factores inciden en el problema: a nivel mundial; el fenómeno de El Niño y el calentamiento global; y a nivel local, la sobrepesca, el turismo y las descargas de aguas contaminadas. (Hoegh-Guldberg 1999; Hughes T. P. et al., 2003)

El aumento en la concentración de CO₂ atmosférico presenta dos retos mayores para los sistemas arrecifales: primeramente se incrementa la temperatura de la superficie oceánica lo que causa un aumento en la frecuencia y severidad de eventos de blanqueamiento. El blanqueamiento se define como la pérdida de la asociación simbiótica entre el dinoflagelado simbiote y el hospedero o/y la pérdida en la pigmentación del dinoflagelado, que puede o no estar acompañado con la muerte de éste (Iglesias-Prieto et al 1992; Fitt W. K. et al 2001; Douglas A. E. 2003). Cabe señalar que el blanqueamiento no sucede exclusivamente en los corales de la clase Scleractinia, sino puede ocurrir

en todas las asociaciones que establece el género *Symbiodinium* con otros hospederos. Particularmente en corales, la pérdida del pigmento café exhibe el carbonato de calcio del coral dándole una apariencia blanca.

Conjuntamente, otro fenómeno causado por el incremento en la concentración del CO₂ atmosférico es la acidificación oceánica. La acidificación oceánica es el término que se utiliza para describir el fenómeno de reducción de pH en los océanos como resultado de la disolución de CO₂ antropogénico (Kleypas et al 1999; Hoegh-Guldberg et al. 2007). En el proceso de acidificación se incrementa la concentración total de carbono inorgánico disuelto (DIC por sus siglas en inglés) en la superficie oceánica, aumentando la cantidad de bicarbonato [HCO₃⁻] y disminuyendo a la vez la concentración del ión carbonato [CO₃²⁻]. Este decrecimiento en CO₃²⁻ causa una reducción del estado de saturación de la aragonita (Ωarag) (Kleypas et al. 1999; Archer 2007; Hoegh-Guldberg et al. 2007).

Los efectos que esto pueda tener en los corales, sigue siendo tema de debate, mientras unos estudios muestran una relación directa entre la disminución en Ωarag y el decrecimiento en la tasa de calcificación (Gatusso et al 1998; Langdon C. et al 2000; Schneider y Erez 2006), otros estudios demuestran que no hay efecto alguno en la tasa de calcificación (Jury et al 2009; Ries et al 2009, Rodolfo-Metalpa 2009) y que al contrario de lo que se piensa ésta depende más de la concentración de bicarbonato (Jury et al 2009).

Ante estos dos fenómenos, se han hecho numerosos esfuerzos para entender los procesos, mecanismos y respuestas fisiológicas de los corales. Específicamente, se ha propuesto la fotoinhibición de la fotosíntesis y el daño al FOTOSISTEMA II (FSII) de *Symbiodinium*, con el consecuente incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) como la causa del blanqueamiento por estrés térmico (Fitt et al., 2001; Warner et al. 1999; Smith D. J. et al., 2005). Asimismo se ha observado que no todos los corales tienen la misma susceptibilidad al blanqueamiento, y que esto se relaciona con la diversidad e identidad genética de *Symbiodinium spp.* que albergan, así como la capacidad de aclimatación (plasticidad fenotípica) ligada a la tolerancia al estrés térmico y lumínico (Ayala 2000; Fitt et al., 2001). Por esa razón es importante estudiar y caracterizar la capacidad de aclimatación asociada a la capacidad fotosintética del alga simbiote.

A lo largo de más de dos décadas se ha hecho un esfuerzo para entender la fotobiología del género de dinoflagelados *Symbiodinium*, tanto en cultivo como “in hospite” en simbiosis (Chang et al, 1983; Iglesias-Prieto y Trench 1994, 1997; Iglesias-Prieto et al. 1992; Rodríguez-Román e Iglesias-Prieto, 2005; Robison y Warner, 2006; Henninge et al. 2009). El desarrollo de diferentes técnicas (invasivas y no-invasivas) no solamente han posibilitado la comprensión de las respuestas

fisiológicas de este género, sino que en general ha ayudado a un mejor entendimiento de la asociación simbiótica de los corales y *Symbiodinium spp.* En este contexto, la técnica de la interpretación de la señal de fluorescencia de la clorofila *a* ha tomado auge en la investigación científica en años recientes para evaluar los procesos fotosintéticos del género *Symbiodinium*.

Mucha de la investigación de los mecanismos que controlan la utilización de la energía de excitación absorbida por organismos fotosintéticos dependen de las medidas y del análisis de la fluorescencia de la Chl *a*. Esta técnica te brinda información de la composición y organización de complejos proteína-clorofila, te permite medir eventos fotofisiológicos primarios y secundarios cómo: la separación de cargas en el Fotosistema II (FSII) y la transferencia de energía excitación a través de la antena al centro de reacción del FSII, y la tasa de transporte de electrones del FSII al FSI (ETR por sus siglas en inglés) (Govindjee y Papageorgiou, 2004; Govindjee, 1995; Maxwell K. et al 2000). Pero a pesar de la simplicidad de las mediciones, la interpretación de los datos es compleja.

Si bien mucho del desarrollo de las técnicas para evaluar la respuestas de aclimatación se ha basado en el estudio de plantas terrestres, en ocasiones el empleo de conceptos y metodologías no aplican necesariamente a la biología de organismos marinos. (Enríquez y Borowitzka 2010). Este ha sido el caso de las curvas de tasa transporte de electrones (ETR). En esta técnica, graficar el ETR contra la Irradiancia es una práctica común, pero lamentablemente numerosos investigadores interpretan los datos obtenidos utilizando los términos y conceptos tradicionales de las curvas Fotosíntesis–Irradiancia obtenidas con la técnica—de respirometría, asumiendo, que el ETR máximo es representativo de la tasa máxima de fotosíntesis (P_{max}) y que α_{ETR} es equiparable a la eficiencia fotosintética o pendiente del incremento lineal de la fotosíntesis en condiciones subsaturantes. Es importante unificar términos en el campo de la fotobiología de las técnicas utilizadas para evaluar las respuestas fisiológicas del organismo, como de su aclimatación a cambios ambientales. De este modo este estudio tiene dos propósitos, por un lado es descriptivo en cuanto a las respuestas de aclimatación a alta temperatura de dos especies del género *Symbiodinium*: *Symbiodinium kawagutii* y *Symbiodinium sp. filotipo A(53)* y por otro lado evaluamos la validez de las técnicas empleadas para estimar la tasa de transporte de electrones (ETR).

ANTECEDENTES

Diariamente y estacionalmente los organismos fotosintéticos experimentan un amplio rango de fluctuaciones en la irradiancia y la temperatura. Las respuestas a estos cambios pueden dividirse en dos respuestas principales: la adaptación es una respuesta genotípica a un cambio ambiental de larga duración donde las alteraciones en el genoma son estables y permanecen en la poblaciones a través de generaciones. Y por otro lado está la aclimatación, que es una respuesta inducida por un cambio ambiental que ocasiona una alteración fenotípica sin cambiar el componente genético (Raven J. y Geider R.J 2003).

La fotoaclimatación involucra cambios coordinados en la composición y en la funcionalidad de aparato fotosintético en respuesta a la variación en el flujo de fotones. A nivel fisiológico las respuestas de fotoaclimatación se observan en cambios en diversos procesos fotosintéticos cómo la separación de cargas primaria, el transporte de electrones, la evolución de oxígeno, la fijación de carbono y en la expresión de algunos componentes asociados a la fotoprotección (Iglesias-Prieto y Trench 1994; Falkowski y LaRoche 1991).

Numerosas estrategias de fotoaclimatación han sido descritas en algas basados principalmente en los cambios en el tamaño de la unidad fotosintética (PSU por sus siglas en inglés) y/o en el número de PSU's por célula (Falkowski y Owens 1980; More et al. 2006). Los organismos aclimatados a altas irradiancias responden disminuyendo el tamaño y/o el número de PSU, mientras que a bajas irradiancias pasa lo contrario (Fig 1) (Falkowski y LaRoche 1991).

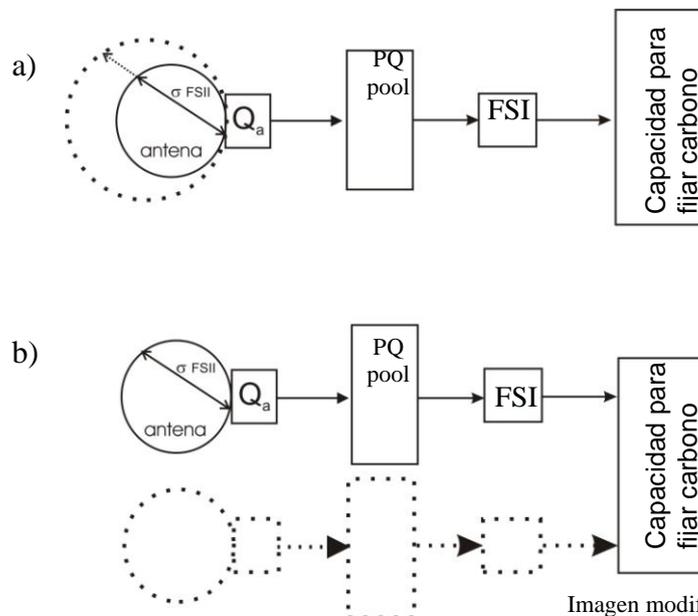


Fig 1. Esquema simplificado del PSU (Unidad Fotosintética) donde se muestran las dos estrategias de fotoaclimatación. a) A bajas irradiancias se da un incremento en el tamaño de la antena del FSII, por lo tanto se incrementa la sección transversal óptica del FSII (σ_{FSII}), cuando el organismo se fotoaclimata a altas irradiancias pasa lo contrario. b) Igualmente a bajas irradiancias puede haber un incremento en el número de PSU.

Los mecanismos de fotoaclimatación han sido descritos comúnmente en términos de las respuestas a irradiancias incidentes, pero es más probable que los mecanismos fundamentales de la fotoaclimatación se asocien más a la percepción celular en la absorción de la tasa de luz que a la irradiancia *per se* (Raven J. A. y Geider R. J. 2003), de esta forma, el requerimiento de lidiar satisfactoriamente con los cambios en la intensidad lumínica se agravan cuando otros tipos de estrés afectan al organismo ya que el concepto de exceso de luz no sólo está en función de la intensidad lumínica, sino está conectada con el balance existente entre la disponibilidad de la luz y cualquier decrecimiento en la capacidad fotoquímica inducida por otro estrés ambiental. (Huner et al. 1998; Bruce D. y Vasil'ev S. 2004)

Iglesias-Prieto y colaboradores 1992 mostraron un desequilibrio en fotosíntesis al incrementar la temperatura en la especie *Symbiodinium miroadriaticum* en cultivo, a partir de temperaturas superiores a los 30°C la tasa fotosintética comenzó a declinar hasta detenerse completamente a temperaturas superiores a los 34°C.

Anteriormente, para comprender las estrategias de aclimatación en el gen. *Symbiodinium*, Chang y colaboradores (1983) midieron las respuestas fotosintéticas del simbionte utilizando métodos de asimilación de ¹⁴C, y aunque sus resultados se basaron en modelos teóricos y no en medidas directas en las características del PSU, mostraron claramente que en las 3 especies de *Symbiodinium* hubo una respuesta diferencial a los cambios de régimen de luz, que junto con otros estudios soportaban la hipótesis de la diversidad de especies dentro del género, posteriormente comprobada.

Tiempo después, Iglesias-Prieto y Trench R. (1994) caracterizaron las respuestas fotosintéticas en 3 especies de *Symbiodinium* en cultivo reduciendo el flujo de fotones. Realizaron medidas directas en los cambios del PSU, encontrando que la respuesta de fotoaclimatación de las 3 especies fue diferencial ya sea incrementando el número y/o el tamaño de PSU. De esta manera se demostró que en éste género, cada especie tiene una única respuesta fotoaclimatativa en términos del rearrreglo del aparato fotosintético, así como diferentes eficiencias en las tasas fotosintéticas como consecuencia de estos rearrreglos en la respuesta fotoaclimatativa, lo que sugiere, que diferentes *Symbiodinium spp* están genéticamente adaptadas (*sensu* Darwin) a diferentes regímenes de luz (Björkman O. 1981).

En 2006 Robison y Warner compararon las respuestas de aclimatación de cuatro distintos filotipos de *Symbiodinium* (F2, A1, B1 y A.1.1) que fueron expuestos a dos regímenes de luz; 100 y 600 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a dos distintas temperaturas 26°C y 32°C. Mientras que todos los filotipos mostraron disminución en la cantidad de pigmentos, (característica aclimatativa típica de la respuesta a alta luz) hubo una respuesta diferencial en tres de los cuatro filotipos (F2, A1, B1). En otros componentes: hubo una disminución del efecto paquete y un posterior aumento de la

eficiencia de absorción, sin embargo este incremento en la eficiencia de absorción en los filotipos A1 y B1 a 32°C provocó una disminución en la máxima eficiencia fotoquímica (Fv/Fm), mientras que en el filotipo F2 no hubo cambios. Todos estos resultados mostraron de nuevo la variabilidad en la capacidad de aclimatación dentro del género así como una sensibilidad térmica diferencial entre filotipos.

Recientemente, Hennige S. J. y colaboradores (2009) basándose en los estudios mencionados anteriormente, investigaron las propiedades biofísicas (fluorescencia de Chl *a*, conteo de centros de reacción) y bio-ópticas (sección óptica de absorción, concentración de pigmentos) de 8 diferentes filotipos de *Symbiodinium*, aclimatados a dos flujos de fotones (100 y 650 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$); comparando las características de fotoaclimatación concluyeron (al igual que los estudios anteriores) que cada especie tiene una estrategia particular de fotoaclimatación pero en sus resultados observaron que esos 8 filotipos preferentemente cambian el número de centros de reacción (PSU's) antes que el tamaño del PSU. En este estudio se resalta la importancia de reunir y complementar técnicas biofísicas y bio-ópticas, invasivas y no invasivas para determinar la fotobiología de las diversas asociaciones que forma el género *Symbiodinium* en la naturaleza.

Como mencionamos previamente, los métodos basados en la fluorescencia de la Chl *a* han sido utilizados extensamente en la investigación científica para dilucidar los procesos fundamentales de la fotosíntesis. Existen diferentes tipos de fluorómetros en el mercado, particularmente el Fluorómetro de Amplitud Modulada (PAM por sus siglas en inglés), es un fluorómetro muy empleado para realizar mediciones *in situ* en ambientes acuáticos, y su uso es relativamente sencillo.

Específicamente, la determinación de la tasa no cíclica de transporte de electrones (ETR), ha sido una de las técnicas más empleadas de la fluorescencia de la Chl *a*. Genty y colaboradores (1989) presentaron una ecuación general para estimar ETR:

$$\text{ETR} = \Delta F / F_m' \times E_{\text{PAR}} \times \sigma_{\text{FSII}} \quad (1)$$

Donde:

$\Delta F / F_m'$ - Eficiencia fotoquímica efectiva

E_{PAR} - Irradiancia fotosintéticamente activa incidente en $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$

σ_{FSII} - sección transversal óptica del FSII

Sin embargo sin una medida directa de σ_{FSII} algunos autores han sustituido este parámetro por la fracción de luz incidente absorbida por los pigmentos fotosintéticos del organismo, mejor conocida como la absorptancia (A) y por la fracción de luz absorbida por el FSII ($\sigma_{\text{FSII}} / \sigma_{\text{PSU}}$) que considerando es sólo del 50% por haber dos fotosistemas, este $\sigma_{\text{FSII}} / \sigma_{\text{PSU}}$ se puede sustituir por 0.5

(Schreiber, 2004; Enríquez y Borowitzka 2011). De este modo, las unidades de ETR quedan en $\mu\text{moles de e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y se expresa la siguiente ecuación:

$$\text{ETR} = \Delta F / F_m' \times E_{\text{PAR}} \times A \times 0.5 \quad (2)$$

Donde:

$\Delta F / F_m'$ - eficiencia fotoquímica efectiva

A- Absorptancia

E_{PAR} – Irradiancia fotosintéticamente activa incidente en $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

0.5 – constante que señala la repartición de los electrones en dos fotosistemas.

El ETR sólo describe el transporte de electrones del FSII al FSII, y los parámetros derivados de estas curvas α_{ETR} y ETR_{MAX} sólo indican el estado redox del FSII hasta el último aceptor de electrones que es la Ferredoxina en el FSI, a partir de ese punto diversos sumideros compiten por el poder reductor de los electrones para distintos procesos metabólicos (Rodríguez-Román e Iglesias-Prieto 2005). Asumir que los parámetros derivados de esta técnica, son equiparables con los obtenidos con las técnicas de evolución de O_2 es un error teórico que comúnmente se comete en campo de la fotobiología. Igualmente, ha habido un auge por utilizar la llamada tasa relativa de transporte de electrones (reETR). Alrededor de 77 artículos publicados (ISI WEB OF KNOWLEDGE) hacen uso de ésta técnica, la cual consideran que mide un estimado relativo del número de fotones utilizados en el proceso fotosintético, y la usan para inferir cambios en la actividad fotosintética durante estrés lumínico o/y térmico (Ralph et al 2002; Schreiber, 2004). El empleo del ETR relativo (reETR) conlleva errores teóricos como metodológicos. Primeramente la fórmula para calcular reETR contiene dos errores fundamentales:

$$\text{reETR} = \Phi_{\text{FSII}} \cdot E_{\text{PAR}} \quad (3)$$

donde:

E_{PAR} - Radiación fotosintéticamente activa incidente en $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$

Φ_{FSII} - Eficiencia cuántica efectiva del Fotosistema II

Primeramente aseguran que están midiendo la eficiencia cuántica efectiva del Fotosistema II (Φ_{FSII}), cuando en realidad lo que se está midiendo es la eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F / F_m'$) que tiene unidades relativas y refleja únicamente la probabilidad de los centros de reacción de FSII para utilizar la energía de excitación disponible para la fotoquímica (Falkowski P. G. y Raven J. 1997; Sakshaug E. et al. 1997). Asimismo no consideran la variación de la absorptancia (A) y consideran la variación relativa de la actividad del FSII. De no considerar A, se está asumiendo que todos los organismos que pueden ser comparados con este descriptor de variación relativa, tienen que tener la misma sección transversal de absorción, pues de lo contrario la variación que se

analice no va a obedecer sólo a cambios en la actividad del FSII sino que también se va a ver afectada por la variación no controlada de la sección efectiva de absorción.

El objetivo de este estudio, aparte de ser una descripción de la estrategia de fotoaclimatación de dos especies del género *Symbiodinium*, es el de evaluar la validez y los límites del uso experimental de la tasa relativa de transporte de electrones (relETR), en su metodología como en la interpretación de resultados, comparando los parámetros obtenidos (α_{ETR} y ETR_{MAX}) con esta técnica, con los parámetros α y Pmax (eficiencia fotosintética y tasa fotosintética máxima, respectivamente) obtenidos de la técnica evolución de O₂.

OBJETIVOS

General

Evaluar la validez experimental de la tasa relativa de transporte de electrones (relETR)

Particular

1.- Determinar la estrategia de fotoaclimatación de *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *Symbiodinium kawagutii* a alta temperatura midiendo los siguientes parámetros fisiológicos:

- Eficiencia de absorción de luz de los pigmentos fotosintéticos- dada por la cantidad de pigmentos fotosintéticos y la absorbancia. Los dos descriptores definen el coeficiente específico de absorción (a^*)
- Eficiencia fotoquímica – dada por la fluorescencia variable entre la máxima fluorescencia (F_v/F_m)
- Eficiencia fotosintética – dada por la pendiente de la fase linear de incremento de la fotosíntesis al incrementarse la irradiancia a luz subsaturante. Depende de la capacidad de absorber luz y de la eficiencia de su uso fotosintético para evolucionar O_2 y fijar carbono.
- Eficiencia cuántica (ϕ) – dada por la eficiencia de evolución de una molécula de oxígeno por fotón absorbido en el aparato fotosintético.

HIPÓTESIS

Los parámetros α_{ETR} y ETR_{MAX} obtenidos de las relETR no serán equiparables con los parámetros α y P_{max} obtenidos con la técnica de evolución de O_2 .

Las especies *Symbiodinium sp.* filotipo A(53) y *Symbiodinium kawagutii* exhibirán diferentes estrategias de fotoaclimatación, en términos del arreglo en la maquinaria fotosintética.

METODOLOGIA

Crecimiento y condiciones experimentales

Se trabajaron con cultivos de dos especies de dinoflagelados simbiotes: *Symbiodinium sp.* filotipo A (53); perteneciente a la colección del Dr. William Fitt (Georgia University) aislada de la medusa *Cassiopeia frondosa* en Jamaica y *Symbiodinium kawagutii*; perteneciente a la colección Dr. Robert K. Trench (UCSB), aislada del coral escleractinio *Montipora verrucosa* en Hawaii, cabe señalar que extrañamente a esta especie no se le ha encontrado nuevamente en la naturaleza.

Ambas especies fueron crecidas en medio ASP-8A (Blank 1987) (Anexo 1) y cada especie se sometió a dos tratamientos experimentales: el control a una temperatura de **28°C** y el experimental a una temperatura de **31°C**, con la especie *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) utilizamos otro tratamiento control a una temperatura de **24 °C**. La temperatura fue controlada con un calentador comercial de acuario y se utilizó un termógrafo (HOBBO pendant Temperature/Ligth Data Logger) para monitorear la temperatura a lo largo de 20 días. El acuario con el tratamiento experimental estuvo a una temperatura de 28 °C los primeros 6 días de crecimiento, y a partir del día 7 se incrementó a 31°C. Las dos especies se crecieron en un ciclo de luz-oscuridad de 14:10 hrs. con un flujo de fotones de **50 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$** , mismo que se midió con un sensor de luz 4 π (US-SQS/L WALZ, Effeltrich, Alemania).

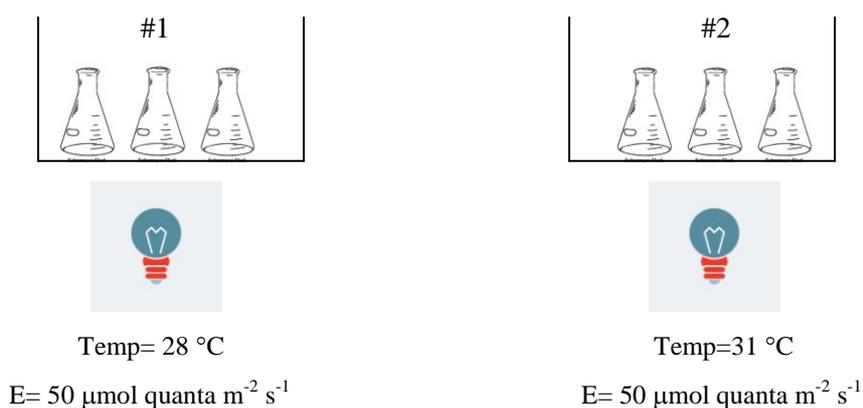


Fig. 2. Esquema del diseño experimental, cada tratamiento tiene 3 matraces de 250ml, la pecera control se mantuvo a una temperatura de 28 °C durante toda la curva de crecimiento.

Estimación de la tasa de crecimiento específica

La tasa de crecimiento en dinoflagelados en cultivo monofásico, básicamente sigue el modelo propuesto por Monod J. (1949) para el crecimiento bacteriano. La velocidad de crecimiento esta influenciada tanto por las condiciones ambientales (temperatura, composición de medio del cultivo, etc), como por las características genéticas del organismo. A partir de la proyección de una curva de crecimiento sigmoideal o logística se pueden distinguir tres fases las cuales corresponden a tres etapas de crecimiento: La fase de latencia o fase lag ocurre los primeros días después de ser sembradas, las células pueden tener el metabolismo activo pero carecen de los componentes esenciales para dividirse (Fig. 3a). En la fase exponencial de crecimiento o fase log, las células se encuentran en el estado fisiológico más sano, por lo cual las alícuotas tomadas en el punto medio de esta fase son las más indicadas para estudios estructurales y enzimáticos (Fig. 3b) (Madigan et al 2003). Finalmente, la fase estacionaria se produce cuando un nutriente esencial del medio de cultivo llega a ser un factor limitante del crecimiento y adicionalmente se acumulan en el medio de cultivo productos de desecho que actúan como inhibidores del crecimiento. Aunque en esta fase no hay un aumento o descenso neto del número de células, diversas funciones celulares como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos se mantienen activos (Fig. 3c).

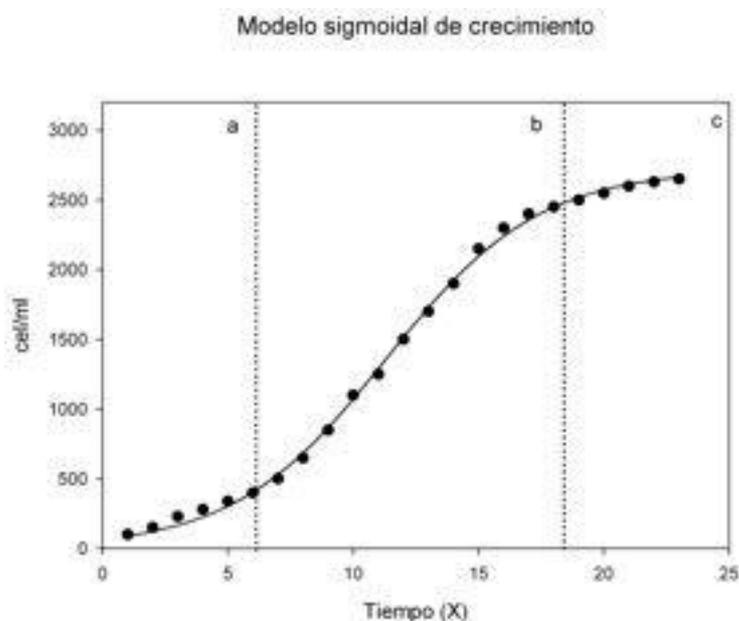


Fig 3. Curva sigmoideal donde se muestra las tres fases de crecimiento: a) fase de latencia, b) fase exponencial y c) fase estacionaria.

A partir de la función sigmoideal se derivaron los siguientes parámetros:

$$y = a_0 / (1 + e^{-(x-a_1)/a_2}) \quad (4)$$

donde:

a₀- amplitud de la curva, se refiere al crecimiento máximo que alcanza.

a₁- centroide de la curva, es un indica el punto medio de la curva.

a₂- tiempo de duplicación (r), se refiere al tiempo que toma en duplicarse la población

Finalmente calculé la tasa de crecimiento específico (μ) con la siguiente formula:

$$\mu = \ln 2 / r \quad (5)$$

donde:

ln2- logaritmo natural base 2

r- tiempo de duplicación

Para medir la tasa de crecimiento, se realizaron conteos de células cada 2 días durante 20 días. Para esto se tomaron alícuotas de 1ml de cultivo de cada matraz, e inmediatamente después se fijaron las células con 40 μ l de Lugol. Utilizando un hemocitómetro y un microscopio óptico se hicieron 10 conteos por repetición del tratamiento (n=3), para estimar el contenido de cel/ml y así proyectar la curva de crecimiento promedio de cada especie en el tratamiento específico. En la Fig se muestra la metodología empleada. Posteriormente se ajustó la curva de crecimiento al modelo sigmoidal de crecimiento propuesto por Monod J. (1945).

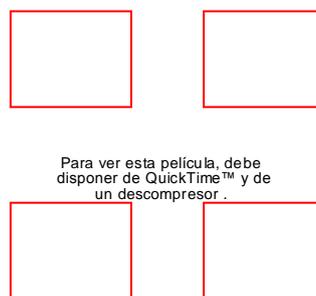


Fig. 4. Diagrama de cámara de Neubauer, donde se muestra las esquinas que se contaron, se realizaron 10 conteos en total por cada repetición (n=3) del tratamiento. Las cuatro esquinas de la cámara (marcado en rojo) equivalen a 1000 μ m, para calcular la concentración de cel/ml utiliza la fórmula: Densidad = $N \times 10^4$.

Concentración de pigmentos fotosintéticos (Chl a y Chl c2)

Para estimar la concentración clorofila a (chl *a*) y clorofila c2 (chl *c*₂) empleé el método propuesto por Iglesias-Prieto y Trench (1992). Los pigmentos se extrajeron utilizando 95% de acetona y 5 % de DMSO (Dimethyl sulfoxido). Primeramente se colectó una alícuota de 1 ml de cultivo por cada repetición, esa muestra se homogenizó muy bien con un Vortex y la centrifugué a 1 pulso a 10000 rpm. Seguido se lavó el pelet con agua fresca y se centrifugó de nuevo a 1 pulso a 10000 rpm. Se secó bien el pelet y posteriormente en condiciones de oscuridad se agregó 50 µl de DMSO y “vortexeamos”, inmediatamente después se agregó 950 µl de acetona fría. Centrifugué a 1 pulso a 10000 rpm, y cubrí las muestras con aluminio para evitar el contacto con la luz. Las muestras se guardaron a 4 °C por 24 hrs. Al sacarlas, nuevamente se centrifugaron a 13000 rpm por 5 minutos, acto seguido se taparon y pusieron en hielo. Empleando un espectrofotómetro ELYPTICA (Ely-2000 Ensenada) se hizo un barrido discreto a 630, 660 y 750 nm y se aplicaron las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975) para cuantificar la concentración en µg/ml y µg/cel de los pigmentos fotosintéticos mencionados.

A cada tratamiento (24°C, 28°C y 31°C) se le realizaron 3 extracciones a lo largo de la curva de crecimiento: uno al inicio de la fase exponencial, el segundo justo a la mitad de la fase exponencial de la curva y el tercero en la fase estacionaria.

Coefficiente específico de absorción (*a*^{*})

El coeficiente específico de absorción (*a*^{*}) se define como la eficiencia de absorción de un determinado pigmento. El coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* normalizado por el contenido de pigmento ha sido utilizado como descriptor de la variación inter e intraespecífica en la eficiencia de absorción. (Enríquez 2005) Para determinar el coeficiente de absorción específico [*a*^{*} (m² mg⁻¹ chl *a*)] de células vivas de la especie en cultivo, se utilizó una suspensión de células de concentración conocida. El patrón de variación de *a*^{*} en función de los cambios en la concentración de la misma suspensión de células, es lo que se utiliza para evaluar el grado de empaquetamiento de los pigmentos en un específico filotipo o a una específica respuesta fotoaclimática. En base a la concentración de cel/ml que la curva de crecimiento proyectó en la fase exponencial de crecimiento, se tomó una alícuota y concentró 3.5x10⁶ cel/ml en 3ml de medio ASP-8A utilizando una centrífuga clínica a 5000 g durante 5min. Para *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) se hicieron 12 diluciones seriadas las cuales corresponden a diferentes concentraciones celulares a partir de 3.5x10⁶ cel/ml hasta 3,13 x10⁵ cel/ml. Con *S. kawagutii* se hicieron 20 diluciones seriadas a partir de la inicial de 3.5x10⁶ finalizando con 3.13 x10⁵ cels/ml.

La absorción de luz se determinó usando el método del “opal glass” para células intactas propuesto por Shibata (1959). Utilizando un espectrofotómetro AMINCO DW2 (SML instrument EUA) controlado por un colector de datos OLIS (EUA), usando una cubeta con 1cm de paso óptico, se realizó un barrido entre 350 y 750 nm. La absorción a 750 nm fue restada en cada espectro para el ajuste a 0, pues representa “scattering residual” o absorción no debida al aparato fotosintético. Se determinó el OD a 676 nm (el cual corresponde al pico de absorción de la clorofila *a*) para cada concentración celular. Del mismo modo conociendo la cantidad de *Chl a* por ml se calculó la cantidad de pigmento para cada concentración celular y finalmente apliqué la siguiente fórmula para obtener el coeficiente específico de absorción [a^* ($m^2 \text{ mg}^{-1} \text{ chl } a$)] (Enríquez et al. 2005):

$$a^* = (D/p) \ln 10 \quad (6)$$

donde:

D – absorbancia (OD)

p – sección transversal de pigmentos o contenido de pigmento por área proyectada

$\ln 10$ – factor de conversión de base 10 (convención de expresión de D en espectroscopía) a base e (patrón de atenuación de luz en el agua).

Una vez obtenido el valor de a^* para cada concentración celular, se graficó contra la concentración de pigmentos correspondiente.

Para poder comparar las eficiencias de absorción intra o/y interespecíficas, normalmente se grafica logarítmicamente los datos para ver la variación en el a^* en función de la densidad de *Chl a* por área (mg m^{-2}), pues estos dos parámetros están asociados de forma no lineal ($y = a^* X^b$, donde b es distinto de 1). Se aplica una regresión lineal para determinar este factor de escala (s en la ecuación que se muestra a continuación). Posteriormente se utiliza un análisis de covarianza (ANCOVA) de una vía, para ver si hay diferencias entre filotipos o respuestas fotoaclimatativas significativas. La ecuación de la función es la siguiente:

$$a^* = b \cdot (\text{mg chl } a)^{-s}$$

$$\log a^* = \log b + s (\log \text{mg chl } a \text{ m}^{-2}) \quad (7)$$

donde:

b - es la ordenada al origen y es un indicador de la eficiencia de absorción.

Factor escala (**s**) – describe la tasa de caída en la eficiencia de absorción conforme la densidad de pigmentos aumenta.

Medidas de fluorescencia: Máxima eficiencia fotoquímica (F_v/F_m), Eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F_m'$) y Tasa de transporte de electrones (ETR).

Todas las medidas de fluorescencia se realizaron con un fluorómetro de amplitud modulada sumergible (Diving-PAM, WALZ GmBH, Effeltrich, Alemania) durante la fase exponencial de la curva de crecimiento para evitar artefactos por autosombreo. Para hacer las mediciones de la máxima eficiencia fotoquímica (F_v/F_m), eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F_m'$) y la tasa de transporte de electrones (ETR) se construyó un arreglo el cual permitiera realizar mediciones por triplicado (Fig. 5). El parámetro $\Delta F/F_m'$ necesario para estimar ETR se determinó haciendo curvas de luz, donde la muestra se ilumina con una serie de luces actínicas de (menor a mayor intensidad).



Fig. 5. El arreglo consistió en 3 celdas de plástico de 1cm de paso óptico montadas paralelamente a lo largo de una base de acrílico, para sostener la fibra óptica se pego una placa de acrílico con tres agujeros a la altura de cada celda. Este arreglo facilitó que la fibra óptica del PAM se pudiera mover de celda en celda, para hacer las mediciones.

A cada celda se le agregó 2 ml del cultivo en tratamiento a una concentración de 3.5×10^6 cels/ml, mismo que se concentro con una centrífuga clínica a 5000 rpm por 5 min A cada celda se le agregó una barra magnética y se montó la base de acrílico a un agitador magnético para asegurar que las células se mantuvieran resuspendidas. La eficiencia fotoquímica máxima (F_v/F_m) se determinó con un pulso de luz saturante de una duración de 0.8 seg después de adaptar a oscuridad las muestras durante 5 min. Posteriormente a esas mismas muestras se les realizaron curvas de luz para determinar la eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F_m'$) y calcular la tasa de transporte de electrones (ETR). Para esto se empleó una fuente de luz actínica externa que consistía en 3 focos dicroicos (Phillips MF-16) y una serie de filtros posicionados enfrente de las cubetas (Fig. 5), se utilizaron 8 intensidades luminicas ($9.5, 24, 56, 84, 122, 200, 302$ y $400 \mu\text{mol quanta m}^{-1} \text{s}^{-2}$) que se calibraron previamente con un sensor de luz 4π (US-SQS/L WALTZ, Effeltrich, Alemania). Previo a las

mediciones se calculó el tiempo de inducción de luz para cada especie, encontrando que 3 minutos es el tiempo que tardan en alcanzar el equilibrio dinámico de la fluorescencia variable. Por lo tanto ese fue el tiempo se utilizó entre cada una de las irradiancias.

Las medidas de absorptancia (A) fueron calculadas apartir de la absorbancia (Shibata 1959) (Densidad Óptica, OD) utilizando un espectrofotómetro AMINCO DW2 (SML instrument EUA) y empleando la ecuación:

$$\text{Absorptancia} = 1 - 10^{-\text{absorbancia}} \quad (8)$$

La absorbancia de cada muestra se midió con un barrido de 350 a 750 nm. Una vez obtenidos los valores de $\Delta F/F_m'$ para cada irradiancia se calculó la tasa de transporte de electrones con la fórmula:

$$\text{ETR} = \Delta F/F_m' \cdot A \cdot \text{PAR} \cdot 0.5 \quad (9)$$

Donde:

$\Delta F/F_m'$ - Eficiencia fotoquímica efectiva.

A – Absorptancia (fracción de luz absorbida).

PAR – La radiación fotosintéticamente activa (Irradiancia).

0.5- constante que se utiliza por considerar los fotones se reparten en los dos fotosistemas.

En los 2 últimos experimentos con la especie *S. kawagutti* se utilizó un arreglo diferente con el fin de poder correlacionar los datos de ETR con los datos de la tasa fotosintética. Para esto se necesita forzosamente que las irradiancias utilizadas en ambas curvas sean idénticas o al menos muy parecidas. Se utilizó una fuente de luz actínica externa (CUDA 1-150 E.UA.) que cuenta con una fibra óptica y un potenciómetro (“dimmer”) el cual permite graduar la intensidad lumínica. Para posicionarla y dirigir la luz hacia la celda empleé una caja de madera 23 cm de largo, 20 cm de ancho y 21 cm de alto, que en su interior tiene una pequeña base de madera para sostener los filtros que atenuan la luz. (Fig. 6).



Fig. 6. Como en el primer arreglo, este consistía en una cubeta de 1 cm de paso óptico montada sobre la base de acrílico, se colocó otra placa de acrílico perpendicularmente con un hoyo con el fin de sostener la fibra del fluorómetro, del mismo modo se monto sobre un agitador magnético, y se le agregó 2 ml de muestra de *S. kawagutii* a una concentración de 3.5×10^6 cels/ml. Para determinar la máxima eficiencia fotoquímica (Fv/Fm) se oscureció la muestra durante 5min y se iluminó con pulso de luz saturante.

Las irradiancias se calibraron con el sensor de luz 4π (US-SQS/L WALTZ, Effeltrich, Alemania) utilizando 3 filtros para atenuar la luz. Las irradiancias que se usaron fueron: 17, 43, 66, 92, 167, 206 268, 292 y 343 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A diferencia de los experimentos anteriores, en este utilicé tres tiempos de inducción de luz diferentes: 10 seg, 1 min y 3 min, esto con el fin de comparar los valores de ETR resultantes al variar los tiempos de inducción. Debido a que este arreglo sólo permitía realizar una curva a la vez se hicieron 3 repeticiones por cada tiempo de inducción, es decir 9 curvas por tratamiento.

El parámetro de α_{ETR} se calculó a partir de la pendiente de la regresión lineal de los primeros 4 puntos de la curva ETR, la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) fue calculada a partir e el promedio de los 4 últimos puntos de la curva.

Curvas Fotosíntesis- Irradiancia (P-E)

Para *Symbiodinium sp* filotipo A (53) y *S. kawagutii* se hicieron curvas Fotosíntesis- Irradiancia (P-E); en la fase exponencial de crecimiento.

La tasa fotosintética fue medida polarográficamente por triplicado a una temperatura de 24°C, 28°C y 31°C en *Symbiodinium sp*. filotipo A (53) y a 28 °C y 31°C en *S. kawagutii*. Para realizar las curvas se empleo una cámara de fase líquida (DW1, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, U.K.) (Fig. 7) utilizando unos electrodos de O_2 tipo Clark (Hansatech). Los datos fueron capturados una computadora equipada con un convertidor análogo/digital usando el programa DATACAN V (Sable systems, Inc., Las Vegas, NV, U.S.A). La cámara estaba conectada a un baño circulador con un controlador de temperatura (Termo Haake DC-10, Alemania) (Fig. 8). Los electrodos fueron calibrados con aire y N_2 en medio de cultivo ASP-8A.



Fig. 7. Cámara de fase líquida para electrodo (DW1, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, U.K)

En ambas especies y para cada tratamiento se concentraron 3.5×10^6 cel/ml en 2 ml de medio de cultivo, justo al empezar las curvas se agregó $10 \mu\text{l}$ de NaHCO_3 a una concentración de 5mM para prevenir limitación de CO_2 . Las células fueron expuestas inicialmente a oscuridad por 5 min para medir la respiración en oscuridad (R_D) y expuestas progresivamente a crecientes intensidades lumínicas: 18, 28, 42, 68, 96, 126 169, 214, 264, 291 344 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un tiempo de inducción de 3 minutos por luz, para esto se usó una fuente de luz actínica externa (CODA 1-150).

Previamente se calibraron las luces empleando tres filtros para atenuar la luz y un sensor de luz 4π (WALTZ). Después de exponer las células a las intensidades lumínicas mencionadas se midió la respiración postiluminatoria (R_{PI}) por 5 min.

Graficando la Irradiancia contra los μmoles de O_2 producidos, se obtuvo la curva P-E, la eficiencia fotosintética (α) fue calculada a partir de la pendiente la regresión lineal de los primeros 5 puntos de la curva P-E, la máxima tasa fotosintética (P_{max}) se calculó promediando los puntos 4 últimos puntos de la curva P-E siempre y cuando no haya fotoinhibición, la irradiancia de saturación (E_k) se calculó dividiendo la tasa fotosintética máxima entre la eficiencia fotosintética (P_{max} / α), la irradiancia de compensación E_c se calculó a partir de dividir la respiración en oscuridad entre la tasa fotosintética (R_D / α). Por último, ajusté las curvas P-E a la función tangencial hiperbólica (Jassby y Platt 1976), sólo por fines estéticos.



Fig. 8. Arreglo que se empleo para hacer las curvas P-E, se utilizo una caja de madera para posicionar la fibra óptica de la lámpara a la misma altura de la cámara de medición.

Eficiencia cuántica (ϕ_{\max} , moles de O₂ evolucionado por fotón absorbido) y requerimiento cuántico mínimo de la fotosíntesis ($1/\phi_{\max}$ moles de fotones requeridos para evolucionar una molécula de O₂)

Una vez calculada la eficiencia fotosintética (α) y conociendo el espectro de absorción de la radiación fotosintéticamente utilizable (PUR) que se calculó a partir de la determinación del espectro de emisión de la lámpara con la que se realizaron las curvas P-E, y del espectro de absorción del PAR obtenido en el espectrofotómetro con luz homogénea en la PAR) se derivó la eficiencia cuántica de la fotosíntesis (ϕ_{\max}) con la siguiente ecuación:

$$\phi_{\max} = \alpha/A \quad (10)$$

Donde:

α - es la eficiencia fotosintética

A- es la absorptancia

Posteriormente se calculó el requerimiento cuántico mínimo ($1/\phi_{\max}$) que es el inverso de ϕ_{\max} .

RESULTADOS

Curvas de crecimiento y tasa de crecimiento específica

Symbiodinium sp. filotipo A (53), en el tratamiento control a 24 °C, mostró una fase de latencia los primeros 6 días, la fase exponencial comenzó al día 7 con un tiempo generacional (r) de 4.1 días, y una tasa de crecimiento específica (μ) de 0.24 d⁻¹. Este filotipo en el tratamiento control alcanzó la fase estacionaria el día 20 con una densidad máxima de 1.6×10^6 cel/ml. (Fig. 9) En el tratamiento a 28 °C no se observó el crecimiento sigmoideal típico descrito para esta especie, probablemente debido a la contaminación del cultivo. Este crecimiento atípico fue lento, alcanzando una densidad máxima de 6×10^5 cel/ml el día 20 del tratamiento (Fig 9). En el tratamiento experimental a 31 °C la fase de latencia duró 6 días, la fase exponencial comenzó el día 7 del tratamiento, el tiempo generacional (r) fue de 3.46 días, la tasa de crecimiento específica (μ) fue de 0.28 d⁻¹, finalmente alcanzó una densidad máxima de 1.2×10^6 cel/ml al día 19, que coincide con el inicio de la fase estacionaria (Fig. 9)

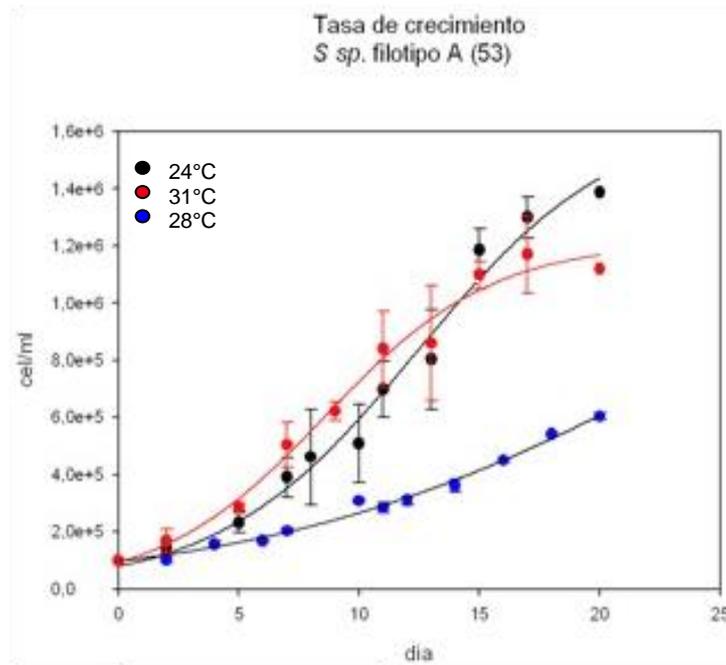


Fig. 9. Curva crecimiento de *Symbiodinium sp.* filotipo A (53).

En la especie *Symbiodinium kawagutii* en el control a 28 °C; la fase de latencia duro 6 días, el crecimiento exponencial comenzó al día 7 con un tiempo generacional (r) de 4.4 días y una tasa de crecimiento de (μ) 0.22 d⁻¹, la fase estacionaria se observó a partir del día 17 (Fig X a) alcanzó una densidad máxima de 1.51×10^6 cel/ml. En el tratamiento a 31 °C la fase de latencia duró 6 días, a

partir del día 7 se observó el crecimiento exponencial, el tiempo generacional (r) fue de 3.3 días con una tasa de crecimiento (μ) de 0.29 d^{-1} , la fase estacionaria se observó a partir del día 17 con una densidad máxima de $1.27 \times 10^6 \text{ cel/ml}$ (Fig. 10).

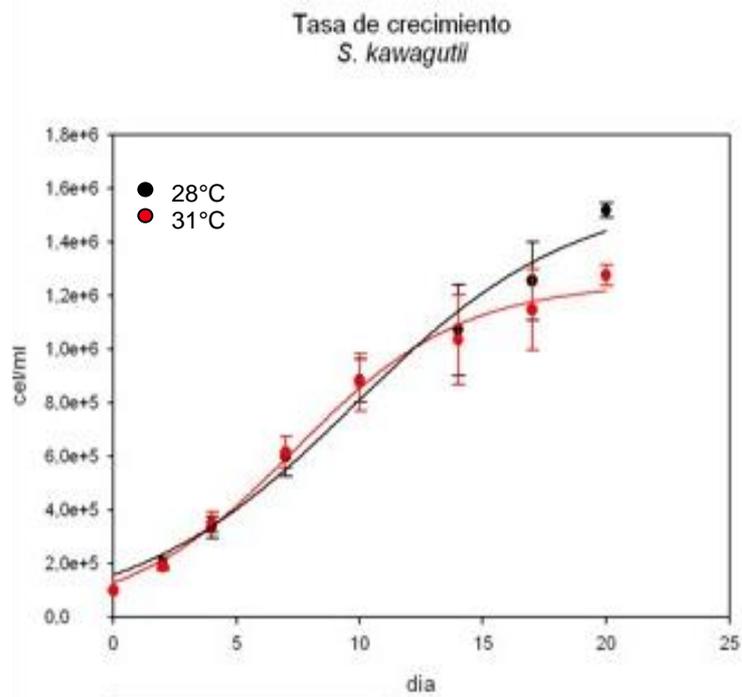


Fig. 10. Curva crecimiento de *Symbiodinium kawagutii*.

Al comparar la tasa de crecimiento específica (μ) entre especies se encontró que el cultivo de *S. kawagutii* a $31 \text{ }^\circ\text{C}$ mostró el valor de μ más alto de 0.29 d^{-1} , seguida por la especie *Symbiodinium sp* filotipo A (53) 0.28 d^{-1} a $31 \text{ }^\circ\text{C}$. El tratamiento control a 24°C mostró un valor de $\mu = 0.24 \text{ d}^{-1}$, y por último fue *S. kawagutii* a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, donde $\mu = 0.22 \text{ d}^{-1}$. Haciendo la prueba estadística encontré diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA) entre trataminetos y especies.

Concentración de pigmentos fotosintéticos (chl *a* y chl *c2*)

Analizando la concentración de pigmentos fotosintéticos, se observó que no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$ ANOVA) en la concentración de clorofila *a* y clorofila *c2* por célula en la especie *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) entre los dos tratamientos a 24 °C y 31 °C para los días 14 y 17 del tratamiento (Tabla X). Lo mismo sucedió con la especie *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C. Por el contrario, se halló una gran diferencia ($p < 0.05$ ANOVA) interespecífica en la concentración de pigmentos, *S. kawagutii* presentó 56% más Chl *a* y 57 % más Chl *c2* que *Symbiodinium sp.* filotipo A (53).

Especie	Temperatura (°C)	Día 14		Día 17	
		pg chl <i>a</i> /cel	pg chl <i>c2</i> / cel	pg chl <i>a</i> /cel	pg chl <i>c2</i> / cel
<i>Symbiodinium sp.</i> filotipo A (53)	24 °C	0.802 (±0.114)	0.261 (±0.046)	0.810 (±0.205)	0.235 (±0.069)
	31 °C	0.947 (±0.170)	0.229 (±0.049)	0.972 (±0.243)	0.206 (±0.044)
<i>S. kawagutii</i>	28 °C	2.02 (±0.125)	0.558 (±0.037)	1.93 (±0.110)	0.541 (±0.039)
	31 °C	2.00 (±0.048)	0.536 (±0.016)	2.07 (±0.121)	0.555 (±0.040)

Tabla 1. Concentración de Chl *a* y Chl *c2* ± SEM (por sus siglas en ingles) en el día 14 y 17 de la fase de crecimiento para *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *S. kawagutii*

Espectros de absorción de luz

Los espectros de absorción *in vivo* corregidos, de las células de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) en los tratamientos a 24 °C y 31°C se muestran en la Fig. 11.a y para la especie *S. kawagutii* a 28 °C y 31°C en la Fig. 11.b

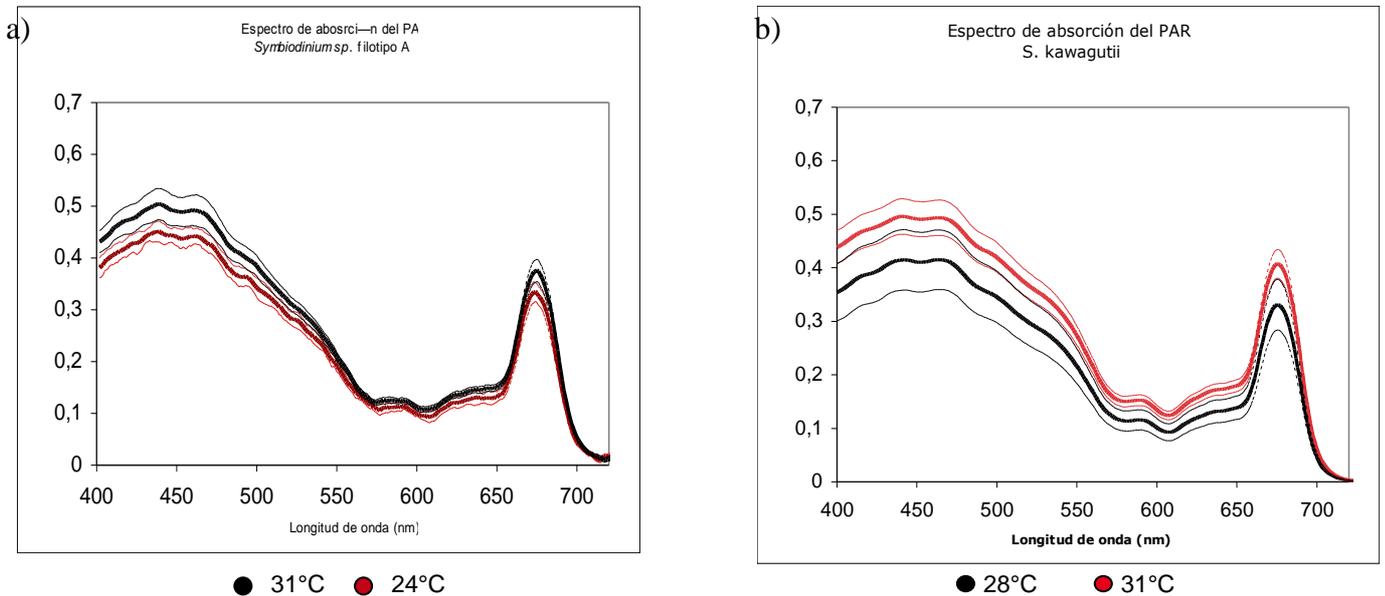


Fig. 11. Espectros de absorción de a) *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y b) *S. kawagutii*

Comparando los valores en el pico de absorción de la Chl *a* (676 nm) no se vieron diferencias significativas (ANOVA $p < 0.05$) entre ambos tratamientos en ambas especies, siendo *S. kawagutii* a 31°C el que mostró los valores más altos a esa longitud de onda y *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) a 24°C la de valores más bajos de absorción.

Coefficiente específico de absorción de la Chl *a* ($a^*_{\text{Chl } a}$)

Al analizar el coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* ($a^*_{\text{chl } a}$) determinado a partir de los espectros de absorción *in vivo* en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) no se encontró diferencias significativas ($p > 0.05$ ANCOVA) entre los valores de las 3 mediciones que se realizaron a lo largo de la curva de crecimiento (fase inicial, exponencial y estacionaria) para cada tratamiento específico. Igualmente no hubo diferencia significativa ($P= 0.6749$ ANCOVA) entre el control a 24°C y el tratamiento experimental a 31°C. (graficos no mostrados)

Con la especie *S. kawagutii* aunque no hubo diferencia en los valores de $a^*_{\text{Chl } a}$ a lo largo de la curva de crecimiento en un mismo tratamiento ($p > 0.05$ ANCOVA), sí encontré diferencias

significativas (p value 0.001 ANCOVA) entre el tratamiento control a 28 °C y el tratamiento experimental a 31°C. Esta diferencia se aprecia a bajas concentraciones de Chl *a* (Fig. 12.a). Al aplicar la prueba estadística ANCOVA sólo a las densidades menores a 6 mg de chl *a* m⁻² se aprecia mejor esta diferencia (pvalue 6.7 x10⁻⁶) Fig 12.b. Esta ligera diferencia la atribuyo al tamaño celular que presentaron las células: a 28°C las células mostraron un diámetro promedio de 7.11 µm y a 31 °C el diámetro promedio fue de 6.66 µm, tomando en cuenta que células grandes tienen mayor efecto paquete, se corrobora porque las células a 28 °C mostraron menor eficiencia de absorción que las células a 31 °C.

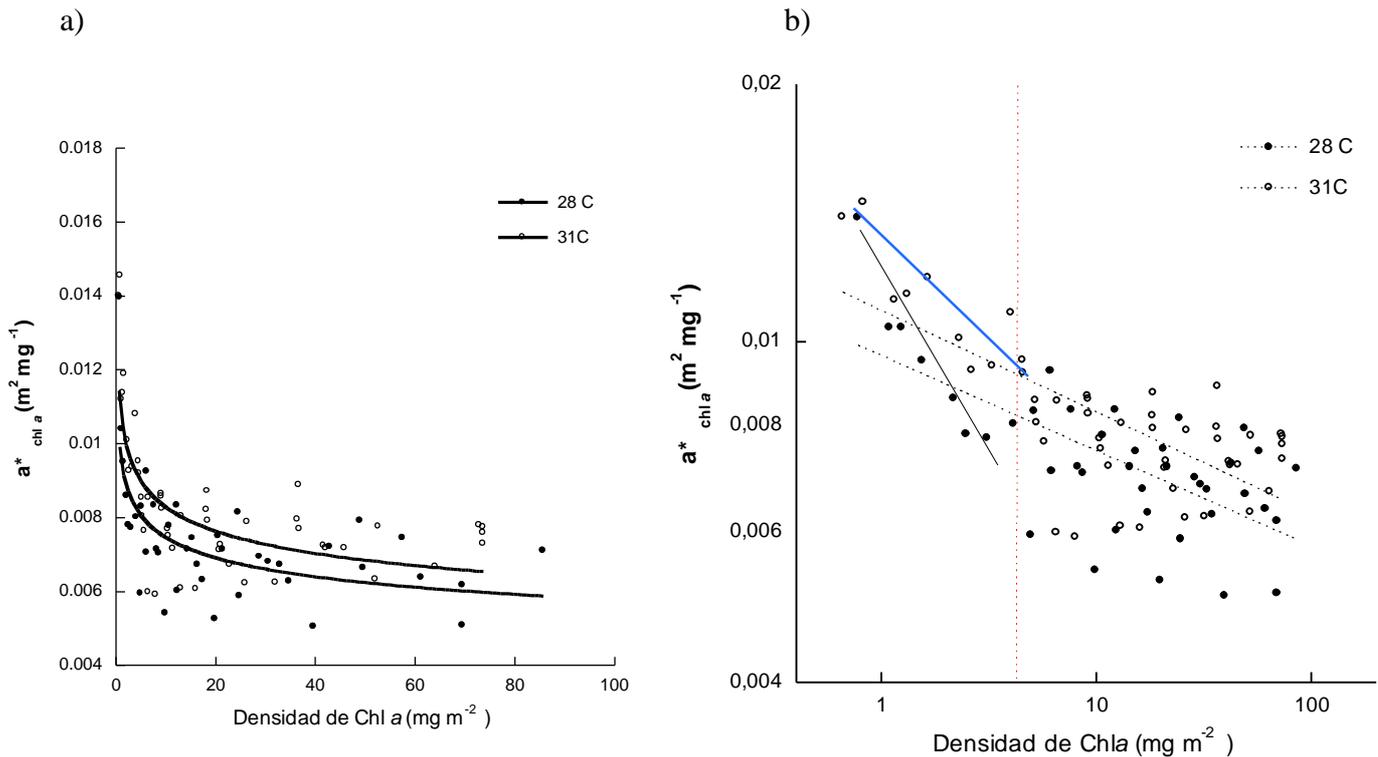


Fig. 12. a) Variación del coeficiente específico de absorción de la Chl *a* en *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C en función de la densidad de la Chl *a* (mg m⁻²), b) Comparación de la variación en la eficiencia de absorción ($a^*_{chl\ a}$) en función de la densidad de la Chl *a* a escala logarítmica

Comparando los valores de $a^*_{chl\ a}$ entre *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *S. kawagutii* (Fig. 13) encontré una diferencia significativa (p < 0.05 ANCOVA) en la eficiencia de absorción. Se observa un mayor empaquetamiento en los pigmentos en las células de *S. kawagutii* con respecto a *Symbiodinium sp.* filotipo A (53), como consecuencia de las diferencias en la cantidad de pigmento por célula que presentaron estas dos especies.

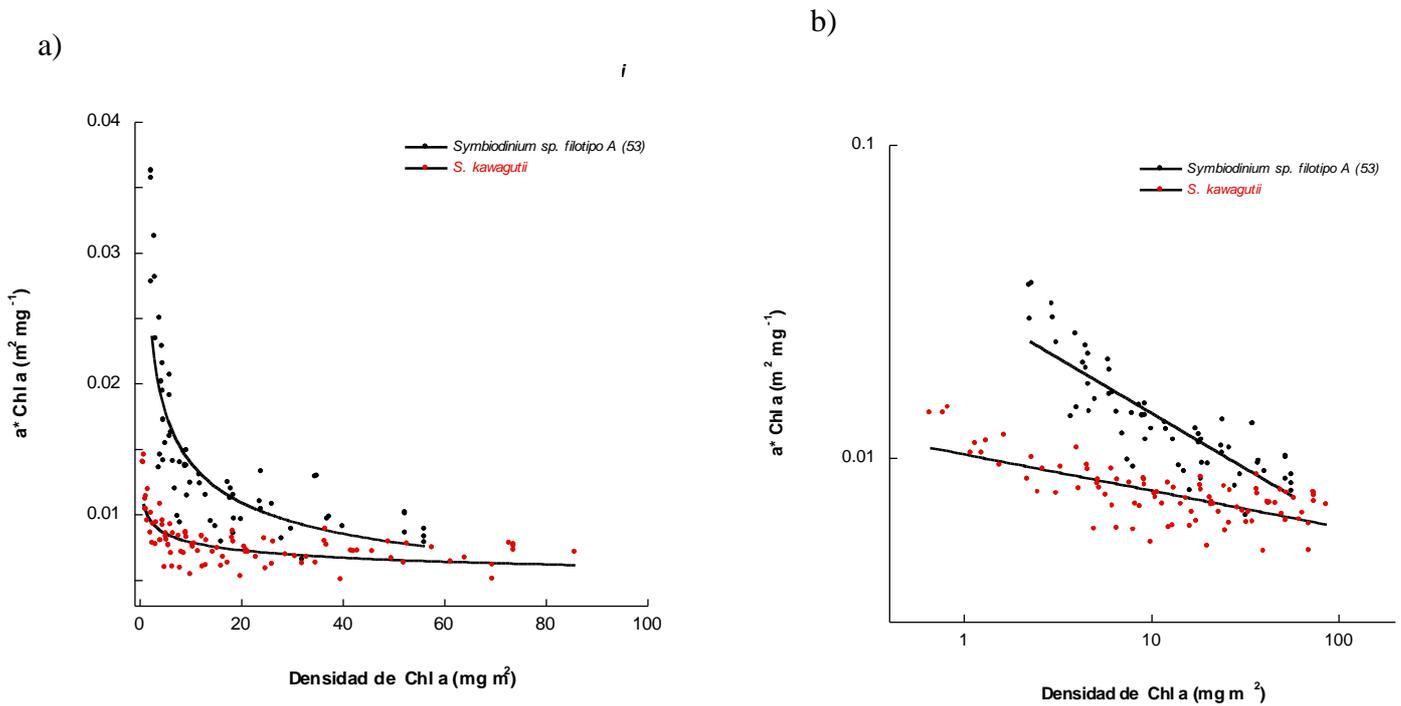


Fig 13. Variación del coeficiente específico de absorción de la clorofila a ($a^*_{chl a}$) en función de la densidad de pigmentos por área ($mg\ Chl\ a\ m^{-2}$) a dos diferentes escalas (a) escala normal, (b) escala logarítmica entre *Symbiodinium sp. filotipo A (53)* y *S. kawagutii*.

Analizando el valor de la pendiente “s” de la ecuación de la regresión lineal de la escala logarítmica (Fig. 13.b) $\log a^* = \log b + s (\log mg\ chl\ a\ m^{-2})$ el cual describe el grado de empaquetamiento de los pigmentos en cada tipo celular o la tasa de caída en la eficiencia de absorción conforme aumenta la sección transversal de pigmentos ($mg\ chl\ a\ m^{-2}$) se encontró que en *Symbiodinium sp. filotipo A (53)* fue de -0.352 mientras en *S. kawagutii* el valor fue de -0.116, lo que indica que la caída de la eficiencia de absorción es mayor en el Filotipo A. En la misma ecuación “b” es la ordenada al origen y es un indicador del valor de la eficiencia de absorción a la misma cantidad de pigmento ($mg\ chl\ a\ m^{-2}$). Los resultados indican que en *Symbiodinium sp. filotipo A (53)* los valores son mayores (intercepto = 0.03) que en *S. kawagutii* (intercepto = 0.01). En promedio los valores de a^* son un 66% menores en esta especie.

Máxima eficiencia fotoquímica (Fv/Fm)

Los valores de la Fv/Fm para ambas especies se muestran en la Tabla 2. En *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) se observó diferencias significativas en los valores de la máxima eficiencia fotoquímica (Fv/Fm) entre los tratamientos a 24°C y 31°C ($p < 0.05$ ANOVA). El tratamiento a 24°C exhibió un Fv/Fm más alto con 0.623 (± 0.004), mientras el a 31°C el valor de Fv/Fm fue de 0.591 (± 0.013). En *S. kawagutii* igualmente se halló diferencias significativas entre 28°C y 31°C ($p < 0.05$ ANOVA). El tratamiento control a 28°C el valor de Fv/Fm fue de 0.654 (± 0.006), mientras que a 31°C fue de 0.634 (± 0.003).

Comparando las dos especies vemos que *S. kawagutii* fue la que tuvo mayores valores de Fv/Fm, siendo mayor a 28°C grados mientras que el valor mínimo fue a 31°C en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53)

Tabla 2.

Especie	Temperatura	Fv/Fm
<i>Symbiodinium</i> sp. filotipo A (53)	24°C	0.623 (± 0.004)
	31°C	0.591 (± 0.013)
<i>S. kawagutii</i>	28 °C	0.654 (± 0.006)
	31 °C	0.634 (± 0.003)

Curvas Fotosíntesis-Irradiancia (P-E)

Las curvas fotosíntesis-irradiancia en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *S. kawagutii* se muestran en la Fig. 14.

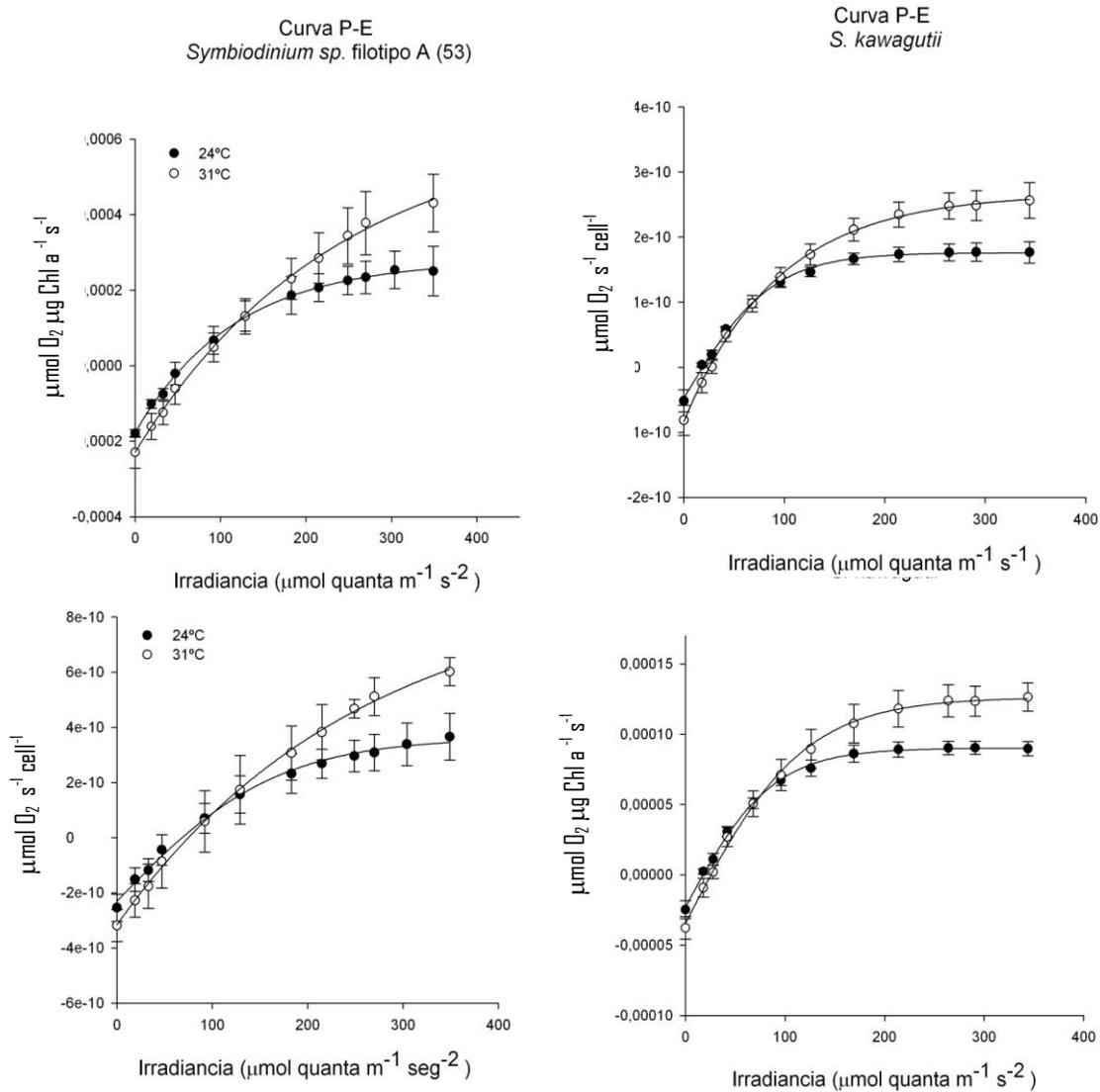


Fig. 14. Curvas Fotosíntesis-Irradiancia (P-E) de *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y de *S. kawagutii* normalizadas por número de células y por chl *a* para el tratamiento control y el tratamiento experimental a 31°C. Cada dato representa el promedio de 6 determinaciones con SEM

Los parámetros obtenidos de las curvas Fotosíntesis-Irradiacia se muestran en la Tabla 3 para la normalización por células, y en la Tabla 4 para la normalización por Chl *a*.

<i>Symbiodinium sp.</i> filotipo A (53)	24°C	31°C
P_{MAX}	3.74x10 ⁻¹⁰ (± 7.13x10 ⁻¹¹)	6.5x 10 ⁻¹⁰ (± 8.78 x10 ⁻¹¹)
α	4.4 x 10 ⁻¹² (± 1.03x 10 ⁻¹³)	5.8 x10 ⁻¹² (± 6.70 x 10 ⁻¹³)
E_k	76.7 (± 6)	114 (± 9.5)
E_c	63.8 (± 16.9)	57.9 (± 15.4)
R	2.54 x 10 ⁻¹⁰ (± 4.93 x 10 ⁻¹¹)	3.3 x x 10 ⁻¹⁰ (± 9.15 x 10 ⁻¹¹)
<i>S. kawagutii</i>	28°C	31°C
P_{MAX}	1.76x10 ⁻¹⁰ (± 1.63x10 ⁻¹¹)	2.5 x10 ⁻¹⁰ (± 2.32x10 ⁻¹¹)
α	2.17x10 ⁻¹² (± 1.8x10 ⁻¹³)	2.5x10 ⁻¹² (± 3.74x10 ⁻¹³)
E_k	82.2 (± 5.9)	103.4 (± 6)
E_c	22.4 (± 5.1)	30.4 (± 3.9)
R	5.18 x 10 ⁻¹¹ (± 1.65 x 10 ⁻¹¹)	8.14 x 10 ⁻¹¹ (± 2.32 x 10 ⁻¹¹)

Tabla 3. Valores promedio (±SEM) de los parámetros de las curvas P-E entre *Symbiodinium sp.* filotipo a (53) y *S. kawagutii* normalizados por células, las unidades de P_{MAX} y respiración (R) están en μmoles de O₂ s⁻¹ cell⁻¹, los valores de E_k y E_c en μmol quanta m⁻¹ s⁻²

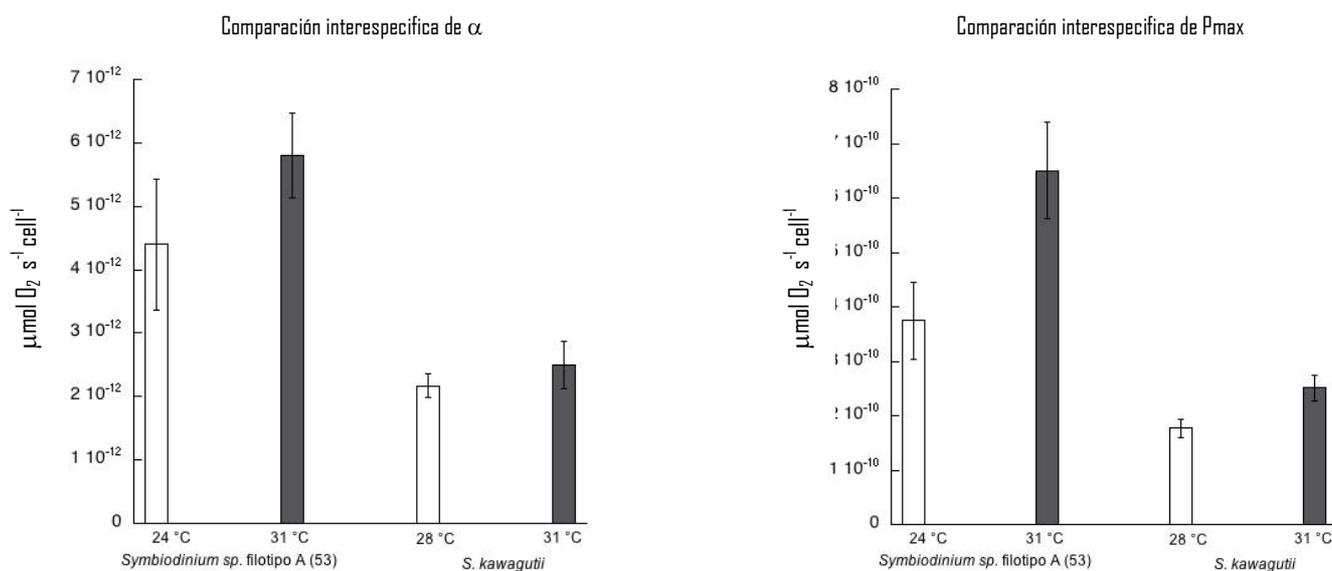
Analizando los valores de la tasa de respiración (R) normalizado por células en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) no encontramos diferencia significativa ($p > 0.05$ ANOVA) entre los tratamientos a 24 °C y 31 °C. En la tasa fotosintética máxima (P_{MAX}) hubo diferencia significativa (ANOVA P = 0.02) entre tratamientos, siendo 42% menor a 24 °C comparada con el tratamiento a 31 °C. En la eficiencia fotosintética (α) no se vieron diferencias significativa ($p > 0.05$ ANOVA), en la irradiancia de saturación (E_k) hubo diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA o ANOVA P = 0.01) 33 % más bajo a 24 °C. Por último no hallamos diferencia significativa ($p > 0.05$ ANOVA) en la irradiancia de compensación (E_c).

En *S. kawgutii* no hubo diferencia significativa en R ($p > 0.05$ ANOVA o ANOVA P= 0.286) entre los

tratamientos a 28 °C y 31 °C. En P_{MAX} si hubo diferencia significativa ($p < 0.05$ ANOVA o ANOVA $P=0.014$), siendo 30 % menor a 28°C comparado a 31 °C, en α no se encontraron diferencias significativas ($P=0.401$ ANOVA), en tanto que en E_K si se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA) 20% más baja a 28 °C. Por último en E_c no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$ ANOVA).

Comparación interespecífica

Comparando las curvas entre especies, hallamos diferencias significativas en la tasa de respiración (ANOVA $P=0.00005$) siendo alrededor de 77% más grande en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) que en *S. kawagutii*. Asimismo encontramos diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA) en P_{MAX} , *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) mostró los valores más altos de P_{MAX} en ambos tratamientos (Fig. 15). Igualmente los valores de α fueron más altos en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) ($p < 0.05$ ANOVA). El valor más alto de E_K lo presentó *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) a 31 °C, seguido de *S. kawagutii* a 31 °C , 28 °C y finalmente *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) a 24 °C ($p < 0.05$ ANOVA). Igualmente los valores de E_c fueron más altos en esta especie que en *S. kawagutii*.



Comparación interespecífica de E_K

$\mu\text{mol quanta m}^{-2}\text{s}^{-1}$

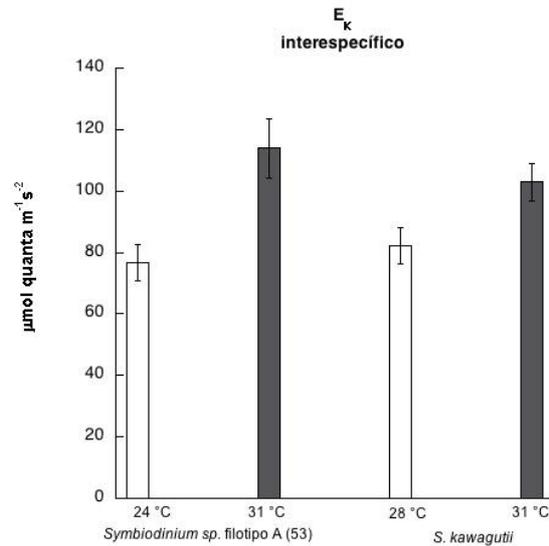


Fig. 15. Gráficas de los valores promedio de P_{MAX} y E_k (\pm SE) normalizados por células de *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) a 24 °C y 31 °C y *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C.

	24 °C	31 °C
P_{MAX}	$2.4 \times 10^{-4} (\pm 4.7 \times 10^{-5})$	$4.72 \times 10^{-4} (\pm 5.2 \times 10^{-5})$
α	$3.2 \times 10^{-6} (\pm 7.4 \times 10^{-7})$	$4.6 \times 10^{-6} (\pm 3.6 \times 10^{-7})$
E_k	73.9 (\pm 5.6)	103 (\pm 7.7)
E_c	50.3 (\pm 6.1)	53 (\pm 14.5)
R	$1.82 \times 10^{-4} (\pm 1.2 \times 10^{-5})$	$2.37 \times 10^{-4} (\pm 6.2 \times 10^{-5})$
<hr/>		
<i>S. kawagutii</i>	28 °C	31 °C
P_{MAX}	$9.01 \times 10^{-5} (\pm 5.38 \times 10^{-6})$	$1.24 \times 10^{-4} (\pm 1.05 \times 10^{-5})$
α	$9.67 \times 10^{-7} (\pm 3.65 \times 10^{-8})$	$1.2 \times 10^{-6} (\pm 2.23 \times 10^{-7})$
E_k	93.2 (\pm 3.1)	133 (\pm 13)
E_c	25.6 (\pm 6.4)	32.6 (\pm 3.5)
R	$2.4 \times 10^{-5} (6.5 \times 10^{-6})$	$3.9 \times 10^{-5} (9.6 \times 10^{-6})$

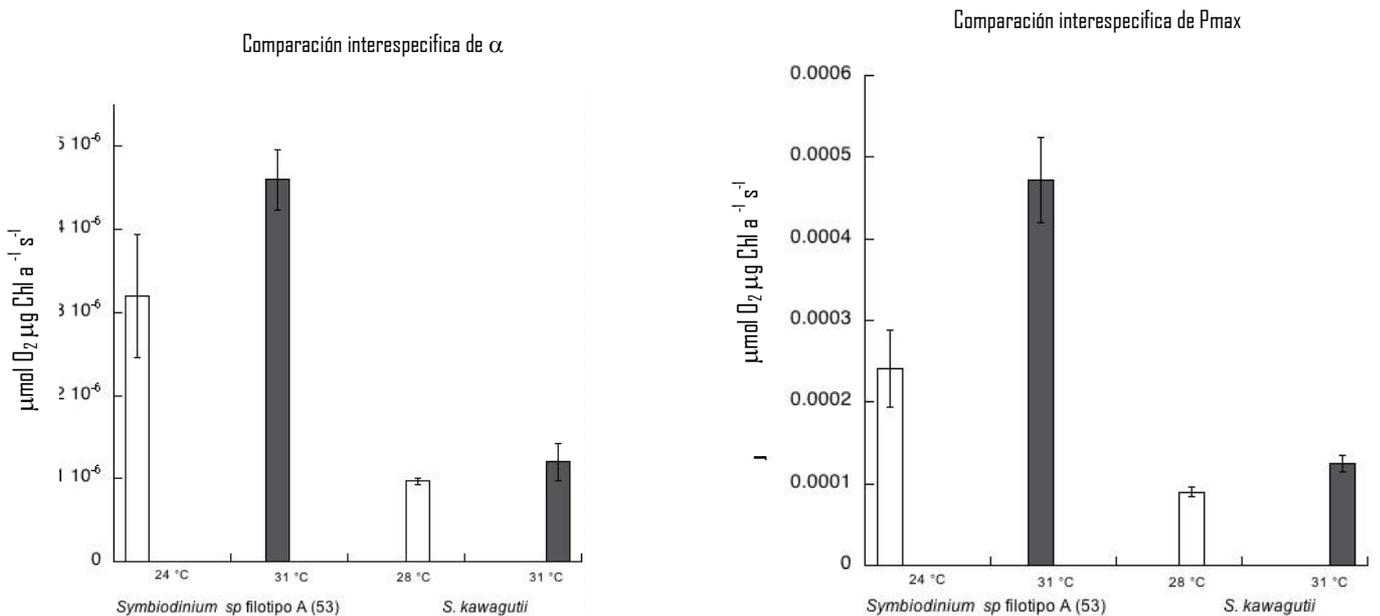
Tabla 4. Valores promedio (\pm SEM) de los parámetros de las curvas P-E en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *S. kawagutii* normalizados por Chl *a*, las unidades de P_{MAX} y respiración (R) están expresado en μ moles de O_2 seg/ μ g de chl *a*, E_k y E_c están expresados en μ mol quanta $m^{-1} s^{-2}$

Examinando los valores de la tasa de respiración (R) normalizado por Chl *a* en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) no hallamos diferencias significativas (ANOVA $P = 0.41$ o $p > 0.05$ ANOVA) entre los tratamientos a 24 °C y 31 °C. Ni en los valores de P_{MAX} , ($P = 0.18$), ni en α , ($P = 0.1$) encontramos

diferencias, pero si en Ek ($P= 0.02$) siendo 28% menor a 24 °C que a 31°C. En Ec no hubo diferencia entre los valores ($P=0.86$).

En *S. kawagutii* la tasa de respiración (R) normalizado por Chl *a* no mostró diferencias significativas ($P= 0.17$) en ambos tratamientos a 28 °C y 31 °C, , en tanto en P_{MAX} si encontramos diferencias ($P=0.008$) siendo 28% más bajo a 28 °C que a 31°C. En α no hubo diferencias ($P= 0.23$). En Ek si hallamos diferencias significativas ($P=0.008$), 30% más chica a 28 °C que a 31 °C y en Ec no hallamos diferencias ($P=0.33$)

Similar a lo ocurrido en la normalización por células, encontramos que comparando entre especies, *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) exhibió los valores más altos en la tasa de respiración (R) normalizado por Chl *a*, siendo alrededor de 85% mayor que en *S. kawagutii*. De igual modo los valores en P_{MAX} y α fueron más del 50% mayores en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) (Fig. 16). En tanto, los valores de E_K fueron mayores para los tratamientos a 31 °C de ambas especies, seguidos por el tratamiento a 28°C en *S. kawagutii* y por último 24°C en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53). Finalmente los valores de Ec en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) en mabos tratamientos fueron más altos que en *S. kawagutii*.



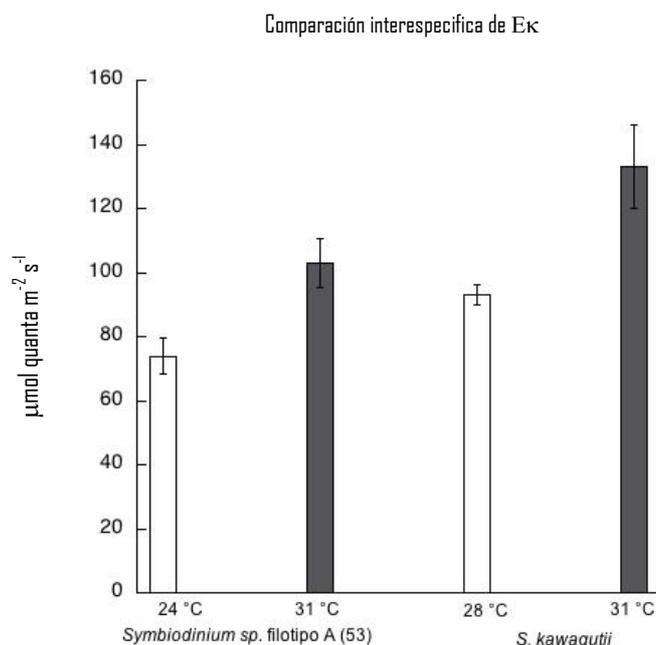


Fig 16. Graficas de los valores promedio de α , P_{max} y E_K (\pm SE) normalizados por Chl *a* de *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) a 24 °C y 31 °C y *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C

Curvas ETR

Los valores que encontramos en la tasa de transporte de electrones (ETR) se vieron fuertemente afectados por los valores estimados de absorptancia (A) de cada experimento en ambas especies. En la Tabla 5 mostramos los valores de A para cada especie, tratamiento, y experimento.

Especie	Experimento	Temperatura (°C)	Absorptancia (A)
<i>Symbiodinium sp.</i> filotipo A (53)	4to	24	19%
		31	18%
	5to	24	34%
		31	36%
<i>S. kawagutii</i>	2do	28	44%
		31	40%
	3er	28	32%
		31	38%
	4to	28	36%
		31	39%

Tabla 5. Valores de absorptancia (A) de *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) a 24°C y 31°C para el 4to y 5to experimento y de *S. kawagutii* a 28 °C y 31°C del 2do, 3er y 4to experimento.

Debido a esta variabilidad encontrada en los valores de las curvas ETR sólo presentamos la variación intraespecífica, omitiendo la interespecífica, sin embargo los valores de los parámetros α_{ETR} y la tasa máxima de transporte de electrones (ETR_{max}) de cada especie para cada experimento y tratamiento se muestran en la Tabla 6.

Especie	Experimento	Temperatura (°C)	α_{ETR}	ETR_{max} ($\mu\text{moles de e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	
<i>Symbiodinium sp.</i> filotipo A (53)	4to	24	0.0637 (± 0.003)	10.21 (± 0.83)	
		31	0.0553 (± 0.006)	9.91 (± 1.05)	
	5to	24	0.106 (± 0.003)	15.18 (± 0.41)	
		31	0.102 (± 0.005)	13.28 (± 0.23)	
	<i>S. kawagutii</i>	2do	28	0.140 (± 0.012)	28.13 (± 1.43)
			31	0.129 (± 0.006)	25.76 (± 1.82)
3er		28	0.106 (± 0.004)	14.96 (± 1.12)	
		31	0.117 (± 0.009)	17.21 (± 2.03)	
4to		28	0.108 (± 0.0003)	19.29 (± 0.63)	
		31	0.116 (± 0.00004)	19.65 (± 0.71)	

Tabla 6. Valores promedio (\pm SEM) de los parámetros α_{ETR} y ETR_{max} en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) a 24°C y 31°C en el 4to y 5to experimento, y en *S. kawagutii* a 28 °C y 31 °C en el 2do, 3er y 4to experimento.

Las curvas ETR-Irradiancia para *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) se muestra en la Fig. 17, no observamos fotoinhibición en ninguna de las curvas de ningún experimento.

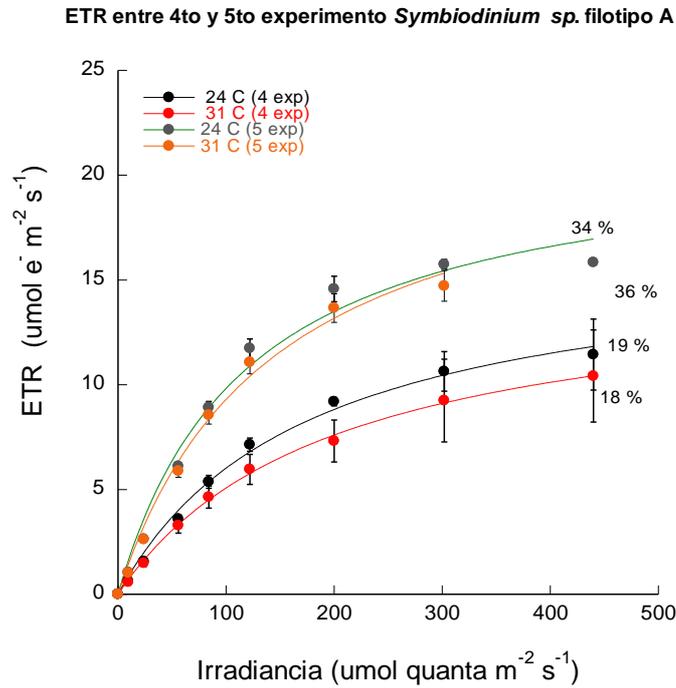
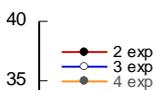


Fig. 17. Curvas de ETR vs. Irradiancia (\pm SE) entre el 4to y el 5to experimento a 24°C y 31°C en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53), no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$ ANOVA) en ETR_{max} y α_{ETR} en 4to, en el 5to experimento encontramos diferencia significativa (ANOVA $P=0.005$) en ETR_{max} , en α_{ETR} no observamos diferencia significativa (ANOVA $P=0.05$). Pese a la diferencia en la absorptancia (A), en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53), en el parámetro α_{ETR} no hallamos diferencia estadística significativa ($p > 0.05$ ANOVA) entre tratamientos a 24°C y 31°C en ambos experimentos. En los valores de ETR_{max} no hubo variación en el 4to experimento entre tratamientos, mientras que en el 5to experimento si encontramos diferencia significativa ($P=0.005$ ANOVA), siendo 16 % mayor a 24°C que a 31°C, esto probablemente debido a que a 31°C no se alcanzó el nivel de saturación de ETR. Entre el 4to y 5to experimento en ambos parámetros hubo diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA).

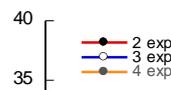
En *S. kawagutii* la absorptancia (A) varió entre el 2do, 3er y 4to experimento, esto provocó diferencias en las curvas ETR- Irradiancia (Fig. 18), aún así en ninguna curva observamos fotoinhibición. En el parámetro α_{ETR} no hubo diferencia estadística ($p > 0.05$ ANOVA) en 2do y 3er experimento entre tratamientos a 28°C y 31°C, mientras que en el 4to si observamos diferencia significativa ($p < 0.05$ ANOVA) entre tratamientos, siendo 7 % menor a 28°C que a 31°C. En ETR_{max} no encontramos diferencia significativa entre tratamientos en ninguno de los experimentos ($p > 0.05$ ANOVA). En el 2do experimento a 28°C la curva no alcanzó el estado de saturación probablemente debido a que el porcentaje de luz absorbida fue de 44%.

Curvas ETR del 2do, 3er y 4to experimento a 28°C en *S. kawagutii*



44%

Curvas ETR entre el 2do, 3er y 4to experimento a 31 C en *S. kawagutii*



Entre experimentos encontramos que el valor de α_{ETR} sólo varió en el 2do experimento ($p < 0.05$ ANOVA) comparándolo con los valores del 3er experimento y 4to experimento a 28 °C. En los demás valores de α_{ETR} entre experimentos no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$ ANOVA). En ETR_{MAX} los valores del 2do experimento mostraron diferencias significativas con los valores 3er y 4to, mientras que en estos últimos no hubo diferencia ($p > 0.05$ ANOVA) en el parámetro.

Comparación interespecífica en α_{ETR}

Es difícil atribuir la variación observada sólo a la absorptancia, ya que cada experimento se hizo independientemente, no se logró discernir puntualmente el efecto de la temperatura en este parámetro, aún así comparando los parámetros de ETR entre especies, se observa a primera instancia, que los valores de α_{ETR} son similares en las dos especies, exceptuando los valores del 4to experimento en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) en donde α_{ETR} se redujo casi 50%, mostrando claramente diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA) con demás valores de α_{ETR} en los distintos experimentos en *S. kawagutii*. En cambio, los valores de α_{ETR} del 5to experimento en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) sólo mostró diferencias significativas con el 2do y el 4to experimento a 31°C en *S. kawagutii* ($p < 0.05$ ANOVA); sin mostrar diferencia alguna con el 3er y el 4to experimento a 28 °C ($P=0.073$ y $P=0.431$ ANOVA respectivamente).

Comparación interespecífica en ETR_{max}

El valor de ETR_{max} del 2do experimento en *Symbiodinium kawagutii* fue el más alto. Hubo diferencia significativa interespecífica en todos los experimentos exceptuando entre el 3er experimento en *S. kawagutii* y el 5to experimento a 24°C y a 31 °C *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) ($p > 0.05$ ANOVA). La irradiancia a la cual se saturaron las curvas igualmente vario entre experimentos y especies, esto esta relacionado muy probablemente con los valores obtenidos en la absorptancia (A), aunque no totalmente ya que las condiciones experimentales del los cultivos o un error experimetal al momento de hacer las curvas, pudo haber influido en los valores de estos parámetros. Aún así considero que en base a otros parámetro podemos describir las diferencias enter especies y el efecto de la temperatura.

Eficiencia cuántica (ϕ_{max}) y mínimo requerimiento cuántico de la fotosíntesis ($1/\phi_{max}$)

El valor encontrado de la eficiencia cuántica (ϕ_{max}) de la fotosíntesis en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) para el tratamiento a 24°C fue de 0.105 (± 0.012) moles de O_2 /fotón absorbido; el mínimo requerimiento cuántico de la fotosíntesis ($1/\phi_{max}$) fue de 9.8 (± 1.2) fotones/ O_2 ; en el tratamiento a 31°C la eficiencia cuántica (ϕ_{max}) fue de 0.082 (± 0.005) moles de O_2 /fotón absorbido y el mínimo rendimiento cuántico de la fotosíntesis ($1/\phi_{max}$) fue de 12.3 (± 0.89) fotones/ O_2 . Haciendo la prueba estadística, no encontramos diferencia significativa entre los tratamientos en ninguno de los dos parámetros ($p > 0.05$ ANOVA). En la especie *S. kawagutii* el valor de la eficiencia cuántica (ϕ_{max}) para el tratamiento a 28°C fue de 0.109 (± 0.01) moles de O_2 /fotón absorbido, en tanto el mínimo requerimiento cuántico ($1/\phi_{max}$) fue de 9.5 (± 1.04) fotones/ O_2 . Para el tratamiento a 31°C ϕ fue de 0.117 (± 0.002) moles de O_2 /fotón absorbido y $1/\phi_{max}$ fue de 8.5 (± 0.25) fotones/ O_2 . En ninguno de los parámetros encontramos diferencia estadística significativa ($p > 0.05$ ANOVA) entre tratamientos.

A pesar de no haber encontrado diferencias intraspecíficas entre tratamientos, sí encontramos diferencias estadísticas significativas entre especies ϕ_{max} ($P=0.02$ ANOVA) y en $1/\phi_{max}$ ($P=0.03$ ANOVA), se pueden observar en la Fig. 19.

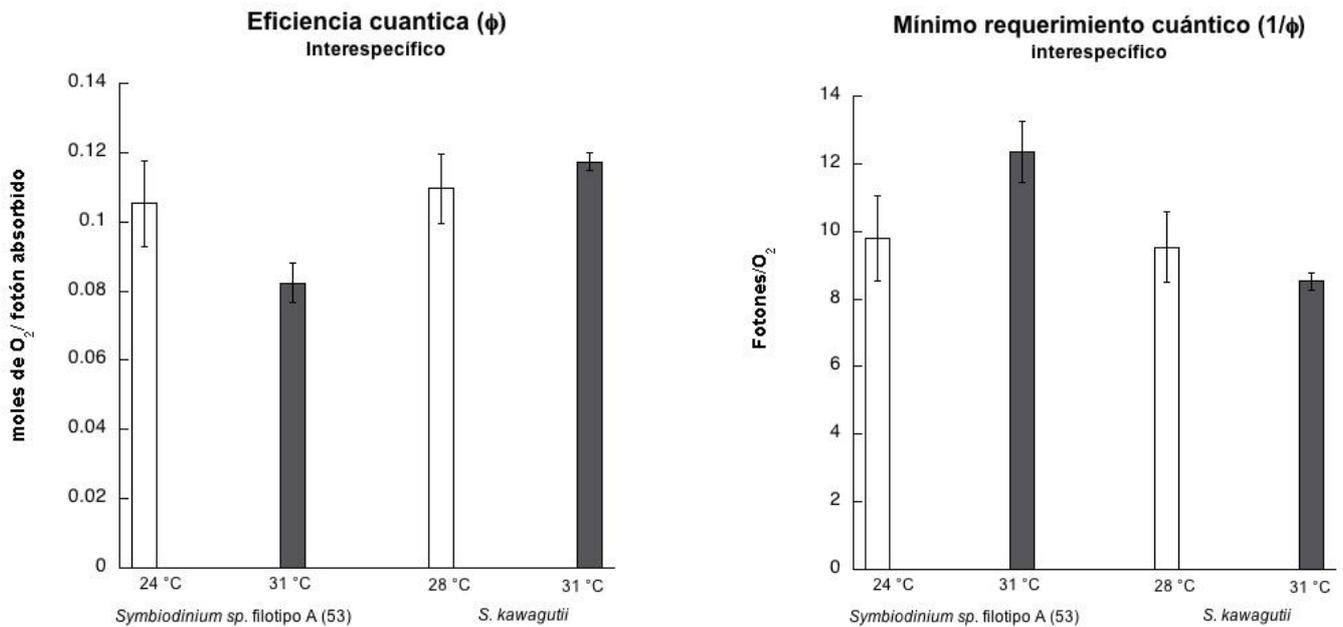


Fig. 19. Graficos de los valores de la eficiencia cuántica (ϕ) y del mínimo requerimiento cuántico ($1/\phi$) para *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *S. kawagutii*.

DISCUSIÓN

Crecimiento

La tasa de crecimiento específica (μ) para varias especies del género *Symbiodinium* en cultivo ha sido medida por varios autores: Chang et al. (1983) reportaron valores de μ entre 0.22 d^{-1} a 0.43 d^{-1} ; por su parte Robison y Warner (2006) encontraron valores de μ entre 0.19 d^{-1} y 0.44 d^{-1} , por último Henninge et al. (2009) midiendo 8 filotipos diferentes midieron valores de μ entre 0.19 d^{-1} y 0.76 d^{-1} . Hay que tomar en cuenta que μ varía dependiendo de la especie, así como del tratamiento y las variables que se estén controlando (ej. temperatura, salinidad, y disponibilidad de CO_2 , etc). En este trabajo para detectar el efecto de la temperatura en la fotoaclimatación utilizamos un flujo de fotones relativamente bajo $50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, y comparando los valores de μ obtenidos para *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *S. kawagutii* con los reportados previamente, se encontró que aunque son un poco bajos (0.24 d^{-1} y 0.28 d^{-1} a 24 y 31 °C respectivamente en *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y 0.22 d^{-1} y 0.29 d^{-1} a 28 y 31 °C en *S. kawagutii*) concuerdan y entran en el rango de lo reportado previamente. Esta variabilidad en μ entre *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) y *S. kawagutii* sugiere en primera instancia que cada especie tiene un mecanismo específico de aclimatación para regular la maquinaria fotosintética.

Estrategia de aclimatación de *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii*

Uno de los objetivos de esta tesis fue determinar las diferencias en las fisiologías, resultantes de las respuestas de aclimatación a alta temperatura en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii*. Dependiendo del flujo de fotones al que esté aclimatado el organismo. Este responderá diferencialmente en los ajustes del PSU. En un ambiente con poca luz los organismos deben de maximizar su capacidad de absorción de luz, ya sea invirtiendo en un mayor número de PSU (número de antenas) o/y en el tamaño de PSU. En organismos unicelulares, se conoce como la sección transversal de absorción de luz del FSII (σ_{FSII}), que sólo considera los pigmentos que participan en la transferencia de energía de excitación al centro de reacción (Falkowski y LaRoche 1991).

El aumento en el tamaño de la sección transversal efectiva de absorción de luz (σ_{FSII}), por parte de los organismo aclimatados a baja luz, provoca un aumento en la eficiencia de absorción (a^*) y en la transferencia de la energía de excitación a los centros de reacción, debido a esto por lo general, los organismos aclimatados a bajo flujo de fotones exhiben eficiencias fotosintéticas (α) y fotoquímicas mayores en comparación a los organismos aclimatados a altos flujos de fotones. Estos últimos al reducir el número de PSU o/y en el tamaño del PSU se esta reduciendo la cantidad de pigmentos fotosintéticos y la sección transversal efectiva de absorción de luz, por lo tanto exhibirán eficiencias fotosintéticas y fotoquímicas menores comparados con los organismos aclimatados a baja luz. (Fig 20) (Iglesias Prieto y Trench 1997, Falkowski y LaRoche 1991).

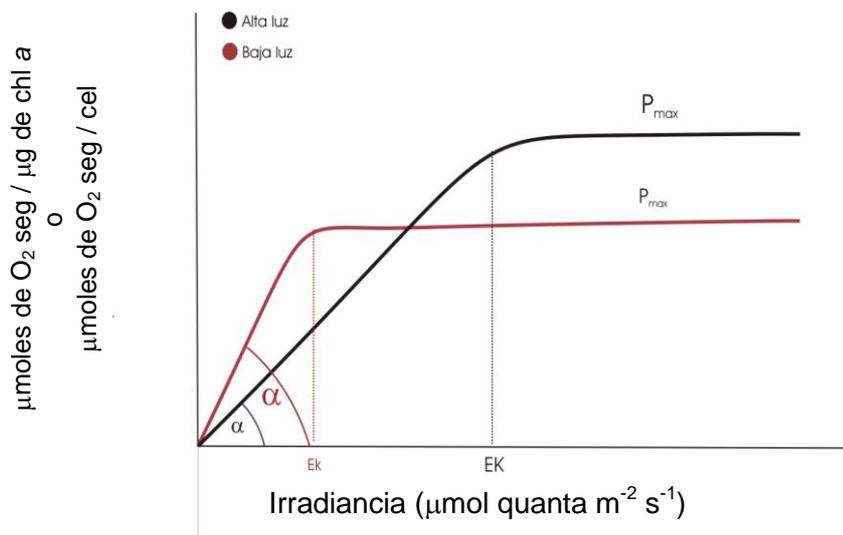


Fig. 20. Curvas P-E idealizadas de organismos aclimatados a baja luz y alta luz. Las unidades de biomasa están normalizadas por células y por contenido de Chl *a*. Por lo general los organismos aclimatados a baja luz tienen un α mayor en comparación con organismos aclimatados a alta luz. Sin embargo estos últimos tienen un P_{max} y un E_k mayor en comparación a los de baja luz.

Utilizando modelos conceptuales del PSU algunos autores han propuesto que cambios en la organización del PSU pueden detectarse solamente con análisis simultáneos de curvas P-E y de contenido de pigmentos, y predicen que los valores de P_{max} normalizados por células son proporcionales al número de PSU por célula, sin embargo pueden ocurrir cambios en la maquinaria fotosintética y la productividad puede no cambiar (Iglesias- Prieto y Trench 1997). Para hacer una medición adecuada de los cambios en el PSU deben hacerse medidas directas del tamaño de la antena fotosintética y del número y proporción de centros de reacción. En este trabajo no realizamos medidas directas del PSU, sino inferimos la estrategia de aclimatación a partir de los cambios en respuesta fotosintética; midiendo la eficiencia de absorción, dada por la cantidad de pigmentos por célula y el coeficiente específico de absorción (a^*); la eficiencia fotoquímica (F_v/F_m), la eficiencia fotosintética (α) y la eficiencia cuántica (ϕ_{max}).

Eficiencia de absorción de luz

Las respuestas fotoaclimatorias dependen en parte del flujo de fotones de la radiación activa fotosintética (PAR) incidente; ya sea limitante o saturante. Un organismo aclimatado a un bajo flujo de fotones, (que presenta mayor número o/y tamaño de PSU's) involucra un alto contenido de pigmentos por célula, presentan un grosor óptico alto y un gran efecto paquete. Un subsecuente aumento en la concentración de pigmentos como respuesta de fotoaclimatación, comúnmente esta asociado con el decrecimiento en la eficiencia de absorción de la sección transversal efectiva de absorción de luz normalizada por clorofila en células aclimatadas a baja luz. Aún así tienden a tener mayor eficiencia fotosintética que las células aclimatadas a alta luz (Falwoski y Raven 1997). Por el contrario, en el caso de células aclimatadas a altas irradianzas generalmente, presentan unidades fotosintéticas pequeñas o/y menor número de unidades fotosintéticas, asimismo tienen altas concentraciones de pigmentos fotoprotectores (carotenoides) relativo a la concentración de clorofila *a*, ésto para minimizar el daño ocasionado por el exceso de luz absorbida (fotoinhibición). (Raven y Geider, 2003; Falkowski y Raven 1997). En el caso de las dos especies con las que trabajamos no sólo encontramos que *S. kawagutii* tuvo 56 % más Chl *a* y 57% más Chl *c2* que *Symbiodinium sp.* filotipo A (53), sino que estos pigmentos estaban más empaquetados, mostrando una eficiencia de absorción (a^*) 66% menor que *Symbiodinium sp.* filotipo A (53), lo que sugiere aparentemente, que *S. kawagutii* exhibe un fenotipo de aclimatación a baja luz y *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) un fenotipo a alta luz, sin embargo para corroborar ésto, debemos analizar los demás parámetros.

Eficiencia fotoquímica

La máxima eficiencia fotoquímica (Fv/Fm) es un indicador de estado redox del Fotosistema II, el cual refleja los cambios en la presión de excitación del mismo FSII cuando los organismos están expuestos a cambios ambientales (Gonvindjee y Papageorgiou, 2004). Este parámetro ha sido ampliamente utilizado en trabajos en el campo y en el laboratorio para medir el estado fisiológico de los corales y de *Symbiodinium spp.* en cultivo. Rodríguez- Roman e Iglesias-Prieto (2005) comprobaron que Fv/Fm está controlado por las condiciones de luz y no por la disponibilidad de nutrientes como se pensaba anteriormente. En este género los valores de Fv/Fm varían de 0.4 a 0.7 dependiendo de la identidad y estado fisiológico del organismo, y del ambiente lumínico que perciben. Por lo general un organismo aclimatado a alta luz exhibe valores de Fv/Fm menores que un organismo aclimatado a baja luz, en ambos casos un decaimiento drástico en los valores de Fv/Fm indican daño en el FSII (Warner et al. 1999). En este estudio aunque los valores de Fv/Fm fueron menores en los tratamientos a 31°C en ambas especies, no se observó una caída drástica de los valores como esperábamos; *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) a 24°C fue sólo 5% mayor que a 31°C, mientras que en *S. kawagutii* sólo fue 3% mayor a 28 °C (ver Tabla 2). Pienso que esto probablemente se debió al poco flujo de fotones utilizado ($50 \mu\text{mol quanta m}^{-1} \text{s}^{-2}$) y/o a la duración del experimento que fue de 20 días, considero que si el experimento hubiera durado más, muy probablemente hubiera observado una disminución mayor en este parámetro.

Eficiencia fotosintética

La eficiencia fotosintética (α) está determinada por la capacidad de coleccionar la luz (a^*) y la eficiencia de usar esa luz absorbida en la evolución de O_2 y la fijación de carbono (ϕ) (Geider y Osborne 1992). A pesar de que no encontramos diferencia intraespecífica en α entre el tratamiento control y de alta temperatura en ambas especies, encontramos una gran diferencia interespecífica; donde *S. kawagutii* presentó un valor de α casi 50 % menor que *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) (Fig. 15 y 16) en ambas normalizaciones de biomasa. Estos resultados aunque no fueron los esperados, son consistentes si consideramos que *Symbiodinium sp.* filotipo A (53) presentó una absorptancia mayor, asimismo muestran la variación en la eficiencia del aparato fotosintético dentro del género *Symbiodinium* para hacer uso de la energía absorbida para evolucionar O_2 y fijar CO_2 .

Tasa de respiración y tasa fotosintética máxima

La tasa de respiración (R) en un organismo aclimatado a baja luz, tiende a ser menor debido a que no necesita esa energía para producir los diversos componentes necesarios del PSU, que exacerbaban el flujo de fotones y funcionan como sumideros de electrones (Björkman, 1981). En cambio un organismo aclimatado a alta luz respira más por que necesita ese ATP para producir los diversos componentes del PSU. Nosotros observamos una drástica diferencia interespecificas en la respiración para ambas normalizaciones siendo 77% (por chl_a) y 85 % (cel) mayor en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) que en *S. kawagutii* (Tablas 3 y 4), esto se expresa directamente en la máxima tasa fotosintética (P_{max}).

Anteriormente en una misma especie crecida a diferentes flujos de fotones, atribuían las diferencias observadas en P_{max} sólo a los cambios en el número o/y tamaño de PSU, considerando que era proporcional a la tasa de fotones capturados (Geider y Osborne 1992). Ahora se sabe que los valores de P_{max} son independientes de los procesos de absorción de luz y que su variación esta atribuida a tres factores principalmente: 1) la capacidad enzimática para fijar carbono, asociada principalmente a Rubisco, 2) la capacidad de transporte de electrones y 3) la limitación de CO₂. (Björkman 1981). El incremento en P_{max} requiere un incremento en la capacidad para fijar carbono, por lo tanto un incremento en el transporte de electrones, debido a esto, cuando hay una reducción en los sumideros de electrones se traduce en una reducción en P_{max}. En este parámetro sí encontramos diferencias significativas intraespecificas en las dos especies; en ambos casos el tratamiento de alta temperatura a 31°C presentó valores más altos que los tratamientos control, aún así las diferencias interespecificas fueron más marcadas, siendo que los dos tratamientos en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) mostraron valores mucho más altos que los de *S. kawagutii* (Fig 15 y 16), estos resultados corroboran que *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) muestra un fenotipo de aclimatación a alta luz y *S. kawagutii* a un fenotipo de baja luz a esas condiciones experimentales.

Mínimo requerimiento cuántico ($1/\phi_{max}$) y Eficiencia cuántica (ϕ_{max})

El mínimo requerimiento cuántico ($1/\phi_{max}$) y al eficiencia cuántica (ϕ_{max}) son descriptores de gran importancia del proceso fotosintético, ya que describen la cantidad de fotones utilizados para evolucionar una molécula de O₂ o fijar una molécula de carbono. Diversos estudios; han demostrado que la eficiencia para colectar (Enríquez et al 2005) y utilizar la luz (Rodríguez-Roman et al. 2006) por parte de los corales es muy alta en la naturaleza (Enriquez et al 2005). Estudiando la aclimatación de *Stylophora pistillata* Dubinsky y colaboradores (1984), reportaron que corales aclimatados a baja luz absorben más de 5 veces la luz incidente que conoespecificos aclimatados a alta luz, y que estos corales aclimatados a baja luz utilizan esta más eficientemente en el sentido de que su eficiencia cuantica (ϕ_{max}) y mínimo requerimiento cuántico ($1/\phi_{max}$) se acercan más al límite teórico que es 8 fotones por molécula de O₂ evolucionada o de carbono fijada.

Si bien la respuesta de fotoaclimatación del holobionte difiere de la respuesta del simbiote aislado (Stambler N . 2010) los valores reportados de $1/\phi_{\max}$ en este trabajo estuvieron más cercanos al mínimo teórico: *Symbiodinium sp* filotipo A (53) mostró valores 9.8 (± 1.2) fotones/ molécula de O₂ evolucionada a 24°C y de 12.3 (± 0.89) fotones/ molécula de O₂ evolucionada a 31°C, aunque no se observó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (P= 0.146 ANOVA). Igualmente en *S. kawagutii* obtuvimos valores cercanos al mínimo teórico 9.5 (± 1.04) fotones/ molécula de O₂ evolucionada a 28 °C y de 8.5 (± 0.25) fotones/ molécula de O₂ evolucionada a 31°C, in observar diferencia significativa entre tratamientos (P=0.307 ANOVA). Según estos resultados aunque *S. kawagutti* haya mostrado una eficiencia fotosintética y una eficiencia de absorción de luz menores que *Symbiodinium sp*. filotipo A (53), esta especie utiliza menos fotones en fijar una molécula de O₂ (aún así ambos valores son increíblemente bajos), y es más eficiente a estas temperaturas, recordemos que fue la especie que presentó valores más altos de tasa de crecimiento específica (μ) a a 31°C.

Limitaciones de relETR

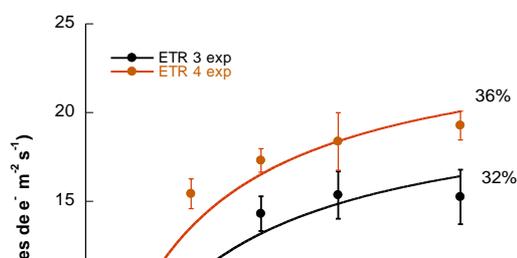
Para una adecuada estimación de ETR es necesario conocer la eficiencia en la absorción de luz por los pigmentos fotosintéticos del organismo, ya sea midiendo directamente la σ_{PSII} o midiendo la absorptancia (A) (ver ecuación 2). En los resultados de este trabajo, intra e interespecíficamente se observa una variabilidad en A, lo que influye directamente en la variación en las curvas ETR. Esto resalta lo crítico e importante que es calcular este parámetro(o σ_{PSII}) para una estimación precisa de ETR cómo de los parámetros α_{ETR} y ETR_{MAX} derivados de las curvas las curvas de luz (ETR-E). En plantas terrestres se ha observado con regularidad valores de A de 0.84 (Enríquez y Borowitska 2011), debido a las características del tejido de estos organismos su utilización es apropiada, pero no sucede así al trabajar con organismos acuáticos que por lo general presentan tejidos más delgados y valores de absorptancia menores. Comúnmente en la investigación con organismos acuáticos se

han reportado valores de ETR tomando la absorptancia como constante y en ocasiones sin tomarla en cuenta en absoluto, de este modo se asume que toda la radiación del PAR incidente es absorbida por los pigmentos del organismo (Masojídek et al 2001; Schreiber 2004). Suponer esto, implica no considerar los cambios que pueden ocurrir en la sección transversal efectiva de absorción de luz (σ_{PSII}), asumiendo a la vez que todos los organismos tienen la misma eficiencia para colectar luz o/y que ésta no varía en el tiempo.

Como he ido exponiendo a lo largo de este trabajo, los cambios que puedan ocurrir en σ_{PSII} influyen directamente en la eficiencia fotoquímica (F_v/F_m) y fotosintética (α). Aún así, la respuesta de fotoaclimatación es específica para cada organismo, por ende hay que considerar que la eficiencia en la absorción de luz también puede verse afectada por sus características inherentes: los espacios intracelulares o/y superficies refractantes dentro del tejido, pueden provocar la dispersión múltiple de la luz, particularmente en corales de la clase Scleractinia el esqueleto funciona como dispersor de la luz facilitando la captación de esta por las algas simbiotas dentro del tejido del coral (Enríquez et al. 2005a). Por otra parte puede haber una acumulación excesiva de pigmentos, provocando autosombreado, este efecto mejor conocido como “efecto paquete”, puede expresarse en diferentes niveles de organización dentro de un mismo organismo ya sea en la hoja, tejido, célula, cloroplasto, tilacoide, o/y antena colectora de fotones (Kirk 1994). Ambos fenómenos influyen directamente en la eficiencia de absorción de luz y del transporte de energía a los centros de reacción del FSII y FSI donde ocurre los procesos fotoquímicos, y la cadena transportadora de electrones (Enríquez et al 2005b).

Por lo tanto asumir que todos los fotones incidentes son absorbidos es un error. Es sumamente difícil encontrar tejidos de organismos que presenten la misma sección transversal de absorción (σ_{PSII}), cualquier diferencia significativa en σ_{PSII} hace imposible de calcular por medio del relETR la contribución relativa en la absorción observada en las ETR, ocasionando que se sobrevalore la cantidad de electrones que se están moviendo (Enríquez y Borowitzka 2011). De este modo suponer que se está estimando cuantitativamente la cantidad de electrones transportados del Fotosistema II al Fotosistema I en $\mu\text{moles de e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ utilizando relETR sin conocer σ_{PSII} es un desacierto, que hace que los parámetros $r\alpha_{ETR}$ y $rETR_{MAX}$ carezcan de todo sentido biológico para cualquier fin descriptivo o/y comparativo. Para ilustrar mejor este argumento en la Fig. 21. hago una comparación de los valores de ETR contra los valores relETR sustrayendo la A de los valores de ETR.

ETR 3er y 4to experimento 28°C *S. kawagutii*



rel ETR 3er y 4to experimento 28°C *S. kawagutii*

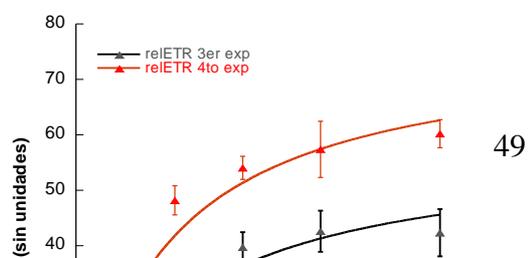


Fig. 21. Curvas ETR y curvas reIETR del 3er y 4to experimento a 28°C en *S. kawagutii*, (a) ETR, las diferencias se ven afectadas tanto por el rendimiento de la eficiencia fotoquímica efectiva y la A, las unidades son $\mu\text{moles de e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, los valores de los parámetros α_{ETR} (0.106 y 0.108) y ETR_{MAX} (14.9 y 19.2 $\mu\text{moles de e}^- \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) para el 3er y 4to experimento respectivamente. En la grafica (b) se muestra las curvas reIETR, substrayendo la A la diferencia entre las curvas se incrementa y le atribuye solamente al rendimiento de la eficiencia fotoquímica efectiva, los valores de los parámetros $r\alpha_{\text{ETR}}$ (0.296 y 0.339) $r\text{ETR}_{\text{MAX}}$ (41.56 y 60.28 sin unidades) no tienen relación con los valores de los parámetros reales que muestra la grafica (a). En la gráficas (c) y (d) se muestran los valores de ETR (a) y reIETR (b) en unidades relativas, sólo así los valores de los parámetros α (0.0069 y 0.0054) y ETR_{MAX} (0.97 y 0.95) son comparables pero en ambos casos carecen de sentido al tratar de medir cuantitativamente los electrones transferidos del FSII al FSI.

Los valores de reIETR así como de los parámetros derivados de estos han sido ampliamente publicados en la literatura científica, el carácter no- invasivo y la facilidad del método ha atraído a los investigadores a convertir las medidas de la fluorescencia en evolución de O_2 o fijación de CO_2 . Tomando en cuenta que el ETR se refiere al total de electrones que transfiere el FSII al FSI no es de sorprenderse la correlación que hacen, sin embargo, sí es que ocurre, ésta se da únicamente en condiciones fisiológicas óptimas no cambiantes, y sólo a intensidades bajas de luz que es donde se da la relación lineal de ETR con la eficiencia fotoquímica efectiva (Genty et al., 1989). A altas irradiancias se ha observado una desviación de esta correlación debido a que los electrones son redireccionados a sumideros alternativos tales como el transporte cíclico del FSII, o/y el ciclo de Mehler (Genty et al., 1989; Asada, 2000; Jakob et al., 2007).

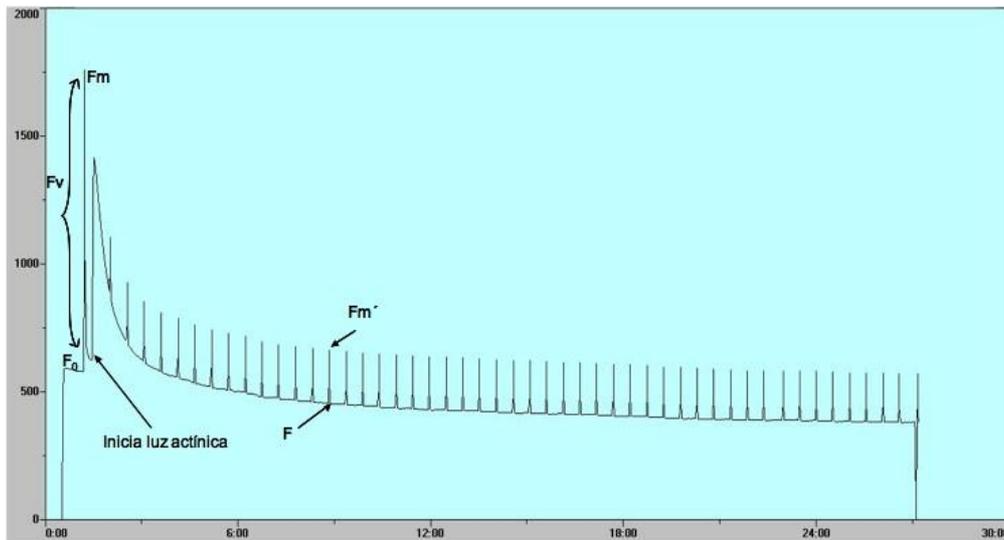


Fig. 23. Curva de inducción que muestra el decaimiento de la eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F_m'$), conforme aumenta la intensidad de la irradiancia hasta alcanzar el equilibrio dinámico (F).

Las curvas rápidas de luz (RLC's) consideran tiempos de inducción de sólo 10 seg, este tiempo no es suficiente para alcanzar el equilibrio dinámico (F) y por lo tanto subestima los valores de la eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F_m'$), lo que conlleva a sesgos en los valores de ETR, encima de que no se genera el poder reductor necesario para evolucionar O_2 y fijar CO_2 en el organismo. Para ejemplificar el tiempo que tarda en alcanzar el equilibrio dinámico (F) en la Fig. 24 se muestra una curva de inducción realizada con el coral *Montastrea faveolata*.

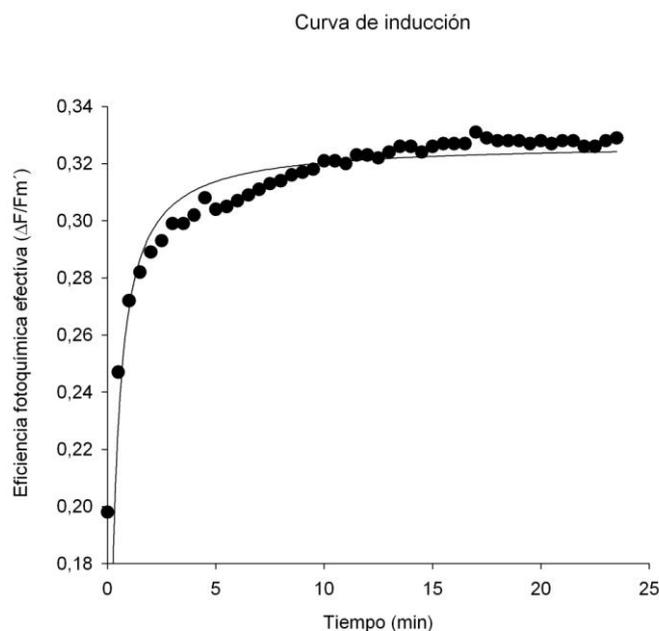


Fig. 24. Curva de inducción de luz en *Montastrea faveolata* donde graficamos ($\Delta F/F_m'$) contra tiempo (min), el equilibrio dinámico (F) lo alcanza aproximadamente a los 3 min

La información que se obtiene con esta técnica empleando tiempos de inducción cortos es difícil de interpretar ya que no se genera el flujo de electrones necesario entre los dos fotosistemas para alcanzar el equilibrio dinámico. En la Fig. 25 se muestra la relación entre la irradiancia de las luces actínicas (lámpara del PAM) contra el tiempo que tarda en alcanzar el equilibrio dinámico, donde se observa como conforme incrementa la irradiancia los tiempos de inducción se van alargando.

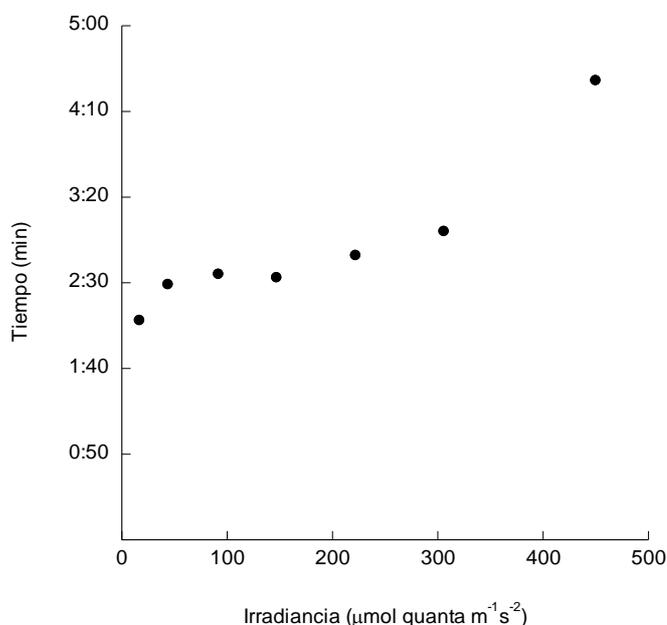


Fig. 25. Gráfico del tiempo de inducción contra Irradiancia (luces actínicas del PAM 17, 44, 92, 147, 222, 306, y 450 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) en el coral *Monstastrea annularis*, conforme aumenta la intensidad las luces aumenta el Tiempo de inducción para alcanzar F, las luces fueron calibradas con el sensor de luz del mismo PAM.

De este modo, sí se estandarizan las condiciones experimentales: se mide la historia de luz previa, los procesos de fotoprotección, la eficiencia de absorción, esta técnica puede brindar información de los procesos de saturación de ETR, así como los cambios relativos en este parámetro (Enríquez y Borowitska 2011). En la Fig. 26 se muestra la correlación de la tasa de transporte de electrones contra la evolución de O_2 a 3 diferentes tiempos de inducción 10 seg, 1 min y 3 min a 28°C en *S. kawagutii*, se observa como la saturación de ETR utilizando RLC's se alcanza antes que al utilizar tiempos de inducción más largos. En la luz, la evolución de una molécula de O_2 depende del flujo de 4 electrones provenientes del H_2O al reducir 2NADP^+ a 2NADPH , el carbono inorgánico es el único de los aceptores de electrones que compite por el poder reductor producido por el flujo lineal de electrones (Geider y Osborne 1992). Otros aceptores de electrones incluyen el nitrato, nitrito, sulfato y oxígeno molecular. La saturación del transporte de electrones ocurre a valores mayores a $2.5 \mu\text{moles de O}_2$. A bajas irradiancias se observa una relación lineal entre los diferentes tiempos de inducción, asimismo se observa como la saturación de la fotosíntesis se alcanza en los tres casos, pero a tiempos de inducción mayores a los 10 seg sigue habiendo un movimiento de electrones redireccionados a los sumideros alternativos antes mencionados. Esta correlación entre

ETR y O_2 producido muestra que el acoplamiento entre estos dos procesos sólo se da a bajos niveles de irradiancia.

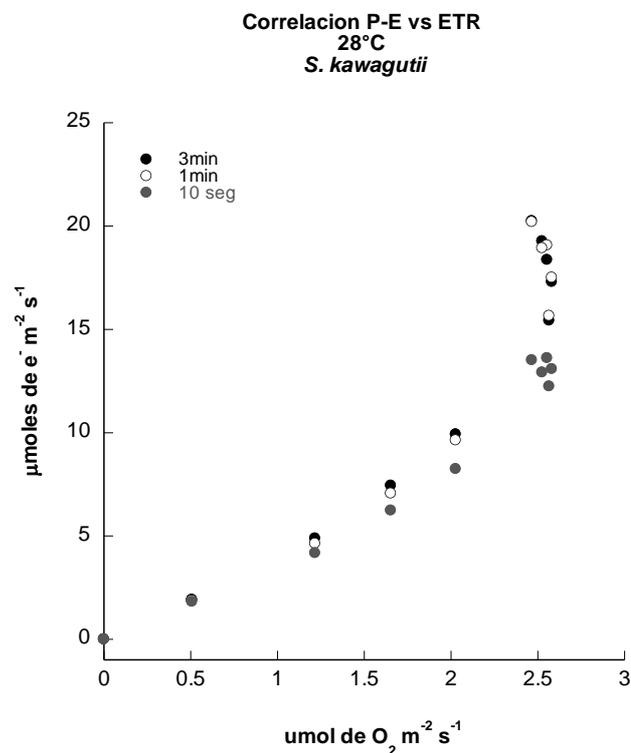


Fig. 26. Correlación de ETR contra la evolución de O_2 a tres tiempos de inducción de luz actínica (10 seg, 1min y 3min). Calculando la pendiente de la regresión lineal de los primeros 4 puntos se obtiene el número de electrones que se necesitan para evolucionar una molécula de O_2 los valores para 10 seg = 3.97, 1min =4.6 , 3min = 4.8. Los valores a los 10 seg están por debajo del mínimo teórico probablemente debido una subestimación de la evolución de O_2 .

La señal de la fluorescencia de la chl *a* para es una herramienta bastante útil para describir los procesos fotosintéticos, aún así, es necesario establecer la validez de las técnicas y fijar una nomenclatura en común para su uso en ambientes acuáticos. Tomando en cuenta los resultados y consideraciones de este trabajo, se recomienda en medida de lo posible, calcular y utilizar el tiempo de inducción específico del organismo de trabajo para estimar ETR, asimismo enfatizó que para calcular cuantitativamente los electrones transferidos es determinante conocer el tamaño de la sección transversal óptica de absorción del FSII (o A en su defecto). Igualmente, el empleo en conjunto de otras técnicas, permite una mejor descripción de la dinámica y respuesta de fotoaclimatación, dando más robustez a los resultados obtenidos y posibilitando la comparación entre organismos.

CONCLUSIONES

- La tasa relativa de transporte de electrones (relETR) carece de validez para estimar cualquier proceso fotosintético.
- Los parámetros α_{ETR} y ETR_{MAX} derivados de las curvas ETR no son equiparables con los obtenidos con la técnica de evolución de O_2 .
- Las curvas rápidas de luz (RLC's), pueden dar información acerca del nivel de saturación de ETR y estimar cambios relativos siempre y cuando conozcas la historia de luz previa del organismo.
- No hubo respuesta de fotoaclimatación diferencial intraespecífica en *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) a 24°C y 31°C, ni en *S. kawagutii* a 28°C y 31°C
- Entre *Symbiodinium* sp. filotipo A (53) y *S. kawagutii* hubo diferencia significativa en la respuesta de aclimatación, en componentes como la eficiencia de absorción por unidad de pigmento y por célula, en la eficiencia fotosintética, en la tasa fotosintética máxima, y en la tasa de transporte de electrones.
- Las diferencias en la respuesta de aclimatación no reflejaron las diferencias encontradas en la tasa específica de crecimiento (μ)

ANEXO

1- Composición del medio ASP-8A, Blank 1987.

Aforar a 1 L

Compuesto	Concentración	Cantidad
NaCl	0.43 M	10mg
KCl	3.87 mM	0.5mg
CaCl ₂ *2H ₂ O	7.48 mM	0.5 mg
NaNO ₃	0.5 mM	2.5mg
KH ₂ PO ₄	0.7 mM	1000mg
Ácido nitrilo-acético	0.15 mM	100mg
Tris pH 9.0	8.25 mM	20mg
Mezcla de metales		10 ml
Mezcla de vitaminas		0.25 ml

REFERENCIAS

- Archer D. (2007) Global warming: understanding the forecast. Blackwell Publishing. United Kindom 2007., p.p. 195.
- Asada K. (2000) The water-water cycle as alternative photon and electro sinks. *Phil.Trans. R. Soc. Lond.* 355, 1419-1431
- Ayala S. N. (2000) Variaciones interespecíficas en la sensibilidad térmica de dinoflagelados simbios de coral y su papel en el blanqueamiento de coral. *Tesis de Maestría. ICMYL-Posgrado, UNAM, Agosto 2000.*
- Blank, R.J. and Trench, R.K., (1985a). Speciation and symbiotic dinoflagellates. *Science* 229, 656–658.
- Blank, R.J., Trench, R.K., (1985b) *Symbiodinium microadriaticum*: a single species? In: Proceedings of the Fifth International Coral Reef Conference, vol. 6, pp. 113–117.
- Bruce D. y Vasil'ev S. (2004) Excess Light Stress: Multiple Dissipative Processes of Excess Excitation. En Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Papageorgiou G. C. y Govindje (Eds) 2004 Springer p.p 497-523.
- Björkman, O. (1981) Responses to different quantum flux densities. en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 12A, O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, y H. Zeigler, eds., Springer, Berlin, pp. 57–107.
- Buddemeier R., Kleypas J. A., Aronson R.B. (2004). Coral reefs and global climate change: Potential Contributions of Climate Chage to Stresses on Coral Reef Ecosystems, Prepared for the Pew Center on Global Climate Change.

- Chang S. S., Prézelin B. B., Trench R. K. (1983). Mechanisms of photoadaptation in three strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *Mar. Biol.* 76, 219-229.
- Chang S. S. and Trench R. K. (1984) The isoelectric forms quaternary structure and amino acid composition of peridinin-chlorophyll *a*-proteins from the dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* (Freudenthal). *Proc. R. Soc. Lond (B)* 222, 259-271.
- Colombo-Pallota M. F., Rodríguez-Román A., Iglesias-Prieto R. (2010) Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. *Coral Reefs*. 29:4; 899-907.
- Douglas A.E. (2003) Coral bleaching- how and why? *Marine Pollution Bulletin* 46, 385-392
- Dubinsky Z., Falkowski P. G., Porteer J. M., y Muscatine L. (1987) Absorption and Utilization of Radiant Energy by Light- and Shade-Adapted Colonies of the Hermatypic Coral *Stylophora pistillata*. *Proc. R. Soc. Lond.* 222, 203-214
- Enríquez S., Mendez E., Iglesias-Prieto R., 2005a Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae *Limnol. Oceanogr.*, 50, 1025–1032
- Enriquez S. 2005b. Light Absorption efficiency and the package effect in the leaves of the seagrass *Thalassia testudinum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 263, 140-150
- Falkowski PG, Raven JA (1997) Aquatic photosynthesis. 2th ed (2007) Blackwell Science, Oxford.
- Falkowski P.G. y LaRoche J., (1991) Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27, 8-14.
- Falkowski P. G. y Owens T. G., (1980) Light-Shade Adaptation: Two strategies in marine phytoplankton *Plant Physiol.* 66:592-595
- Fitt W.K., Chang S. S y Trench R.K (1981) Motility patterns of different strains of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* (Freudenthal) in culture. *Bulletin of Marine Science* 31 (2) 436-443
- 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
- Freudenthal, H.D., (1962) *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a Zooxanthella: Taxonomy, life cycle, and morphology. *J. Protozool.* 9, 45–52.
- Gatusso J. P., Frankignoulle M., Bourge I., Romaine S. y Buddemeier R. W. (1998) Effect of calcium carbonate saturation of seawater on coral calcification. *Global and Planetary Change.* 18: 37–46.

- Geel C., Versluis W., Snel J.F.H., (1997) Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of Photosystem II electron flow. *Photosynthesis Research* 51: 61-70, 1997.
- Geider J. R. y Osborne B. A., 1992, Algal photosynthesis: the measurement of algal gas exchange, Current phycology 2 Chapman and Hall, 1992, New York p.p 256.
- Genty B, Briantais JM, Baker NR. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990, 87-92.
- Govindje, (1995). Sixty-three years since Kausty: Chlorophyll *a* fluorescence". *J. Plant Physiol.*, 22, 131-60.
- Gonvindjee y Papageorgiou: Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, (2004), Springer. The Netherlands, p.p 818
- Henninge S.J., Suggett D. J., Warner M. E., McDougall K. E., Smith D. J. (2009) Photobiology of *Symbiodinium* revisited: bio-physical and bio-optical signatures. *Coral Reefs* 28:179-195
- 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., Hatziolos M.E. (2007) Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science* 318: 1737-1742.
- Hughes T P., Ayre D., Conell J. H., (1992) The evolutionary ecology of corals *Elsevier Science Publishers*
- 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.
- Huner P. A. N., Örqvist G., y Sarhan F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends Plant Sci.* 3: 224-2305
- Iglesias-Prieto R. y Trench R. K. (1994) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Response of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Mar Ecol Prog Ser* 133:163-175
- Iglesias-Prieto R. y Trench R. K. (1997) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of the chlorophyll-protein complex to different photon-flux densities. *Marine Biology* 130:23-331072
- Iglesias-Prieto R., Matta J. L., Robins W. A., Trench R. K., (1992) The photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:10302-10305

- Jakob T, Wagner H., Stehfest K., Wilhelm C. 2007 A complete energy balance from photons to new biomass reveals a light- and nutrient-dependent variability in the metabolic costs of carbon assimilation *Journ Exp. Bot* 58 2101-2112.
- Kirk J.T.O., (1994) Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. 2th edition (1994) Cambridge University Press, Cambridge U.K., p.p. 500.
- Kleypas J. A., Buddemeier R.W., Archer D., Gattuso J. P., Langdon C., Opdyke B. N. (1999) Geochemical Consequences of Increased Atmospheric Carbon Dioxide on Coral Reefs. *Science*. 284: 218-220.
- 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.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock *Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, 2003.
- Masojídek J., Grobbelaar J.U., Pechar L., Koblíže'k. (2001) Photosystem II Electron Transport Rates and Oxygen Production in Natural Waterblooms of Freshwater Cyanobacteria During a Diel Cycle. *Journal of Plankton Research* 23(1), 57-66.
- Maxwell K. y Johnson G. N., (2000) Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *J. Exp. Botany*. 51: 659-668.
- Moberg F., y Folke C. (1999) Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecological Economics* 29, 215-133.
- Moore C. M., Suggett D. J., Hickman A. E., Kim Y. N., Tweddle J. F., Sharples J., Geider R. J., Holligan P. M., (2006) Phytoplankton photoacclimation and photoadaptation in response to environmental gradients in a shelf sea. *Limnol Oceanogr* 51:936-949
- 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.p 75-87. Elsevier, Amsterdam.
- Rowan R. (1998) Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J. Phycol.* 34, 407-417.
- Rowan, R., Knowlton, N., (1995) Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 2850-2853.
- Ralph P. J., Gademann R., Larkum A.W.D., Schreiber U., (1999). In *situ* underwater measurements of photosynthetic activity of coral zooxanthellae and other reef-dwelling dinoflagellate endosymbionts. *Mar Ecology* 180, 139-147.
- Ralph P. J., Gademann R., Larkum A.W.D., (2002) Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues. *Mar Biology* 141: 639-646
- Ralph P. J. y Gademann R., (2005). Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. *Aquatic Botany* 82, 222-237.
- Robison J., Warner M. E., (2006) Differential impacts of photoacclimation and thermal stress on the photobiology of four different phylotypes of symbiodinium (pyrrhophyta) *J. Phycol.* 42, 568-579.

- Raven J. y Geider R.J (2003) Acclimation and Regulation in Algal Photosynthesis. En Photosynthesis in algae. Larkum A.W.D, Douglas S.E y Raven J. eds. 2003 Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p.p. 457.
- Rodríguez – Roman A., (2000) Regulación de la fotosíntesis dependiente de la disponibilidad de nitrógeno en dinoflagelados simbiotes. *Tesis de Maestría*, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Marzo, 2000.
- Rodríguez Román A. e Iglesias-Prieto R. (2005). Regulation of photochemical activity in cultured symbiotic dinoflagellates under nitrate limitation. *Marine Biology* 146, 1063–1073.
- Rodríguez–Roman A., Hernandez –Pech X., Thome P. E., Enriquez S., e Iglesias-Prieto R. (2006) Photosynthesis and light utilization in the Caribbean coral *Montastraea faveolata* recovering from a bleaching event. *Limnol. Oceanogr.*, 51, 2702–2710.
- Sakshaug E., Bricaud A, Dandonneau Y, Falkowski P.G., Kiefer D. A., Legendre L., Morel A. Parslow J., Takahashi M. (1997). Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *J. Plankton Research* 19,1637-1670.
- 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.
- Stambler N. (2011) Zooxanthellae: The Yellow Symbionts Inside Animals. En Coral reefs: An ecosystem in transition. Dubinsky Z y Stambler N (Eds), Springer, 2011.
- 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.
- Schoenberg D.A y Trench R . K. (1980) Genetic Variation in Symbiodinium (=Gymnodinium) microadriaticum Freudenthal, and Specificity in its Symbiosis with Marine Invertebrates. I. Isoenzyme and Soluble Protein Patterns of Axenic Cultures of Symbiodinium microadriaticum. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 207, 1169, 405-427.
- Schreiber U. (2004) Pulse-Amplitude-Modulation (PAM) Fluorometry and Saturation Pulse Method: An Overview. En Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis, Papageorgiou G. C. y Govindje (Eds) 2004 Spinger p.p 279-319.
- Trench R. K. (1987) Dinoflagellates in non-parasitic symbioses. En *The Biology of Dinoflagellates*, F. J. R. Taylor, Cap 12. ed. Blackwell, Oxford. p.p 530–570.
- Trench, R.K., Blank, R.J., 1987. Symbiodinium microadriaticum Freudenthal, S. Goreauii sp. nov., S. kawagutii sp. nov. and S. pilosum sp. nov.: gymnodinoid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. *J. Phycol.* 23, 469–481.
- Trench R. K. (1993) Microalgal-invertebrated symbioses: a review., *Endocytobiosis and Cell Res.* 9, 135-175.

Veron J.E.N (1995) Corals in space and time: the biogeography and evolution of Scleractinia, Comstock Publishing p.p 321.

Warner M. E, Fitt W. K, Schmidt G. M. (1999) Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8007–8012.