



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



Producción del Glicerol en Algas del Género *Symbiodinium* Bajo Estrés Osmótico

LUIS PARMENIO SUESCÚN BOLÍVAR

**Trabajo de grado para optar al Título de
Maestro en Ciencias del Mar y Limnología
Especialidad Química Acuática**

Directora
Dra. Patricia E. Thomé

Comité Tutorial
Dr. Marco Villanueva
Dr. Antonio Peña Díaz
Dra. Rosario Vera Estrella
Dra. Rosalba Alonso Rodríguez

INSITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADEMICA PUERTO MORELOS
PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO.
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.

A mis mujeres y a mi padre

Tia'al in kóolelo'ob yéetel in yuumo'ob

Agradecimientos

Agradezco a CONACyT por el apoyo económico brindado durante dos años. A la UNAM por darme el privilegio de hacer parte de ella. También, agradezco al posgrado y al Instituto en Ciencias del Mar y Limnología, por darme la oportunidad de construir parte de mi proyecto de vida jugando a ser científico. Y además, quiero agradecerle a la Unidad de Sistemas Arrecifes y a todos los que hacen parte de ella, por brindarme una habitación donde vivir dignamente y sus laboratorios para realizar mis experimentos.

Especialmente le agradezco a la Dra. Patrica E. Thomé por darme el privilegio de ser su estudiante, su amigo y su hijo adoptivo. Gracias por estar siempre dispuesta en cada momento, sin importar el día o la hora, por ayudarme en mis experimentos, a explicar y responder mis dudas, a leer y releer mi tesis y por supuesto a corregirla y corregirla.

Al Dr. Roberto Iglesias le quiero agradecer por todas las explicaciones y sugerencias en el desarrollo de mis experimentos, que permitieron situarme dentro del universo de la simbiosis dinoflagelado-cnidario, para así llegar a tratar de explicar una pequeña pero importante parte del diálogo metabólico entre estos dos organismos.

Le agradezco a la Dra. Susana Enríquez y la Dra. Dra. Anastazia Banaszak por facilitarme los equipos y su laboratorio para llevar acabo algunos experimentos.

Agradezco al Dr. Marco Villanueva por hacer parte de mi comité tutorial ayudándome a dar forma y coherencia a mi tesis, por dejarme trabajar en su laboratorio y con sus equipos. También por dejarme participar en el seminario de su laboratorio, donde pude revisar desde el punto bioquímico lo que se ha estudiado y lo que se podría estudiar en la simbiosis.

Quiero agradecer al Dr. Antonio Peña por hacer parte de mi comité tutorial y por todos los aportes e ideas que ayudaron a dar forma a mi investigación.

A la Dra. Rosario Vera y a la Dra. Rosalba Alonso les agradezco por hacer parte de mi comité evaluador y porque se tomaron la molestia de leer y corregir mi escrito de tesis. Además, le agradezco a la Dra. Rosario por ayudarme realizar las medidas de presión osmótica de las soluciones que utilicé en mis experimentos.

También le agradezco al M. en C. Román Vásquez, al Biól. Luis González y a la Dra. Nadine Schubert, por su colaboración y explicación en el desarrollo de las técnicas para evaluar la fotosíntesis en *Symbiodinium*.

Agradezco a la Dra. Mónica Medina y al Dr. Till Bayer, por las secuencias de los genes de *Symbiodinium* que estudié en este trabajo.

Le agradezco a la Biól. Mar. Claudia Galindo por enseñarnos a utilizar el Ocean Optics y al Biól. Mar. Sergio Guendolain por ayudarme hacer el montaje para medir la eficiencia cuántica de PSII en *Symbiodinium* y por leer y criticar mi tesis.

Muchas gracias al Biól. Tadeo Ruiz y al M. en C. Juan Pablo Huchin por ayudarme con las determinaciones de concentración de ADN y ARN en las instalaciones del CINVESTAV, y también, gracias Juan por leer y criticar mi tesis.

Le agradezco a la M. en C. Laura Celis por cuidar de los cultivos de *Symbiodinium*.

Gracias M. en C. Elisa López por caracterizar a la cepa mfl1 y por leer y criticar mi tesis.

Biól. Laura Peñaranda, gracias por ayudarme a que se vieran mejor las gráficas de expresión de genes.

Agradezco al grupo del seminario del Dr. Marco por la retroalimentación de conceptos y temas científicos de interés, gracias Raul, Mario, Juan, Rebeca, Georgina, Dalia y Alma.

De igual modo le agradezco al M. en C. Mario Ortiz por la colaboración en la adecuación de algunos protocolos utilizados en mi investigación.

Gracias M. en C. Fernando Negrete, M. en C. Cecilia Barradas y M. en C. Edgar Escalante por el curso de buceo.

Muchas gracias, ya que esta investigación fue posible por el granito de arena colocado por cada uno de ustedes y gracias a cada uno de los lectores de esta tesis.

Contenido

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	12
Objetivo general.....	12
Objetivos específicos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. Condiciones experimentales y cultivo de <i>Symbiodinium</i>	13
2. Fotosíntesis de <i>Symbiodinium</i>	15
3. Expresión de genes relacionados con la síntesis de glicerol vía ciclo de Calvin-Benson en <i>Symbiodinium</i>	17
4. Actividad enzimática específica de DHAP-reductasa.....	19
5. Análisis estadístico.....	20
RESULTADOS	21
1. Producción de glicerol en <i>Symbiodinium</i>	21
2. Fotosíntesis en <i>Symbiodinium</i>	24
3. Expresión de genes relacionados con la síntesis de glicerol vía ciclo de Calvin-Benson en <i>Symbiodinium</i>	29
4. Crecimiento en <i>Symbiodinium</i>	30
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	49
I. Composición del medio ASP-8A (Blank, 1987).....	49
II. Análisis de secuencias génicas y definición de cebadores.	49
a. dihidroxiacetona fosfato reductasa (<i>dhapr</i>)	49
b. 6-fosfogluconato deshidrogenasa (<i>6pg</i>).	49
III. Actividad catalítica específica (<i>Z_c/m_s</i>) (Bergmeyer, 1983)	50

Índice de figuras.

Figura 1. Estructura general del pólipo y del simbiosoma.....	5
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Symbiodinium</i>	6
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>Symbiodinium</i>	21
Figura 4. Producción del glicerol en <i>Symbiodinium</i> bajo choque osmótico.	22
Figura 5. Efecto del Na ⁺ en la producción de glicerol en <i>Symbiodinium</i>	24
Figura 6. Curva P-I de <i>Symbiodinium</i> bajo 1 h de estrés y 1 semana de estrés.....	25
Figura 7. Eficiencia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}) en <i>Symbiodinium</i> bajo estrés osmótico.....	28
Figura 8. Expresión de genes asociados con la fijación de carbono y síntesis de glicerol en <i>Symbiodinium</i> bajo choque osmótico	29
Figura 9. Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de <i>Symbiodinium</i>	31
Figura 10. Efecto del estrés osmótico sobre la producción de glicerol durante el crecimiento de <i>Symbiodinium</i>	32
Figura 11. Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de <i>Symbiodinium</i> antes de haber alcanzado la fase estacionaria.....	33
Figura 12. Cambio del tamaño celular de <i>Symbiodinium</i> bajo estrés osmótico	33
Figura 13. Posible mecanismo de inducción de la producción de glicerol en <i>Symbiodinium</i>	40

Índice de tablas.

Tabla 1. Presión osmótica de solutos utilizados en los experimentos.....	14
Tabla 2. Condiciones para la RT-PCR en el análisis de expresión.....	19
Tabla 3. Porcentaje de glicerol extracelular producido en <i>Symbiodinium</i>	23
Tabla 4. Producción del glicerol en el genotipo B17 bajo 12h de estrés hiper-osmótico	23
Tabla 5. Parámetros fotosintéticos de <i>Symbiodinium</i> expuesto a alta osmolaridad.....	26
Tabla 6. Concentración de clorofila <i>a</i> en los tratamientos.....	27
Tabla 7. Actividad catalítica específica de DHAPR (Z_c/m_c) de <i>Symbiodinium</i>	30

Abreviaturas y siglas.

ADN ácido desoxirribonucleico

α eficiencia fotosintética

ARN ácido ribonucleico

Chl *a* clorofila *a*

cDNA ADN complementario sintetizado por transcripción inversa a partir de un templado de ARN

Curva P-I curva de fotosíntesis contra irradiancia, indica la cinética de las reacciones orgánicas de la fotosíntesis

DHAP dihidroxiacetona fosfato

DHAPR dihidroxiacetona fosfato reductasa

DMSO dimetil sulfóxido

DMSP dimetilsulfopropionato

E_c irradiancia de compensación

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

E_k irradiancia de saturación

EST expressed sequence tag, fragmentos de secuencias transcrita

Φ_{PSII} eficiencia fotoquímica del fotosistema II

F_0 rendimiento mínimo de fluorescencia

F_m máxima fluorescencia después de aclimatarse a la oscuridad

F'_m máxima fluorescencia con luz actínica

F_v/F_m eficiencia cuántica máxima

F_v/F'_m eficiencia cuántica máxima efectiva

GADPH gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa

G3P glicerol 3-fosfato

GPD glicerol 3-fosfato dehidrogenasa

HRF host release factor, factor que induce la liberación de fotosintetatos en *Symbiodinium*

ITS internal transcribed spacer, secuencia de ARN no funcional ubicado entre ARN ribosomal estructural en un precursor de transcripto

μ tasa crecimiento

NPQ non-photochemical quenching, disipación de energía por vías no fotoquímicas como modo de foto-protección

PAM fluorómetro con pulsos de amplitud modulada

PCR polymerase chain reaction, técnica para amplificar cadenas específicas de ácidos nucleicos

PEG polietilenglicol

PIF photosynthesis inhibiting factor, factor que inhibe o disminuye la fotosíntesis en *Symbiodinium*

P_{max} tasa fotosintética máxima

PSII fotosistema II

rcb A locus donde se ubica el gen *rcb* que codifica a Rubisco en *Symbiodinium*

R_D respiración en oscuridad

Rubisco ribulosa 1,5 bisfosfato carboxilasa oxigenasa

R respiración

6PG 6-fosfogluconato dehidrogenasa

SDS dodecilsulfato de sodio

RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction, amplificación de una secuencia específica de ARN a ADN mediante la transcriptasa reversa

dT₁₅ cebador de 15 nucleótidos de desoxitimina.

RESUMEN

La simbiosis mutualista entre cnidarios y dinoflagelados del género *Symbiodinium* se caracteriza por el reciclamiento de nutrientes, en donde el dinoflagelado aporta al hospedero fotosintetatos, principalmente en forma de glicerol, para su crecimiento y calcificación (en el caso de los corales escleractinios). Sin embargo, el mecanismo de la producción del glicerol no ha sido elucidado de manera concluyente. Debido a esto, en este trabajo se evaluó la producción del glicerol estimulada por estrés osmótico en dos especies de *Symbiodinium* en cultivo, originalmente extraídas de cnidarios. Se determinó el efecto del estrés sobre el crecimiento (curvas de crecimiento), fotosíntesis (curvas P-I y la eficiencia fotoquímica del fotosistema II), y expresión de genes (RT-PCR) relacionados con la fijación de carbono y síntesis de glicerol. Los resultados mostraron que el incremento de la presión osmótica afecta positivamente la producción del glicerol, reduce la tasa de crecimiento y no afecta la fotosíntesis en *Symbiodinium* sino hasta después de una semana. Se demostró por primera vez que, al igual que ocurre en simbioses recién aislados estimulados por extractos del hospedero, la producción de glicerol puede ser estimulada por condiciones de osmolaridad elevada en cultivos de *Symbiodinium*, sin afectar el desempeño fotosintético del simbiote, pero sí su crecimiento. En términos de la relación simbiótica alga-cnidario, estos resultados sugieren que el flujo de carbono es desviado hacia la síntesis de glicerol para compensar un desajuste osmótico, lo que establece una competencia con la síntesis de lípidos y proteínas, llevando a reducir la división celular del simbiote e incrementando la translocación de glicerol hacia el cnidario. Se presenta un mecanismo hipotético del estímulo que podría resultar en la producción del glicerol en la simbiosis.

INTRODUCCIÓN

La relación *Symbiodinium*-cnidario, es una interacción simbiótica donde ambos organismos obtienen beneficios para su desarrollo debido a un reciclaje de nutrientes, haciendo de estos un consorcio capaz de prosperar en aguas oceánicas tropicales poco profundas y oligotróficas (Yellowlees *et al.*, 2008). Tal es la eficiencia de esta simbiosis, que lleva a la formación de estructuras geológicas conocidas como arrecifes coralinos, considerados como unos de los ecosistemas más diversos del planeta, que además de proteger las costas de fenómenos meteorológicos como los huracanes, generan 30,000 millones de dólares netos por año en diversas economías (Cesar *et al.*, 2003).

Esta eficiencia simbiótica brinda tres ventajas generales para el hospedero. Primero, las algas simbiotas exportan la mayor parte del carbono fijado al hospedero principalmente en forma de glicerol (Muscatine, 1967; Trench 1971b), aumentando la tasa de crecimiento del mismo (Allemand *et al.*, 2004). Segundo, permite que el hospedero pueda tomar nutrientes inorgánicos como el amonio y el fosfato que no son absorbidos por los cnidarios no simbióticos (Muller-Parker *et al.*, 1990; Pomeroy y Kuenzler, 1969). Y tercero, en el caso de los corales escleractinios, eleva las tasas de calcificación (Allemand *et al.*, 2004). Las ventajas para el alga simbiota son, la maximización para la captación de la luz (Enríquez *et al.*, 2005) y el acceso a concentraciones más elevadas y poco fluctuantes de nutrientes que las del agua de mar en donde habitan (Yellowlees *et al.*, 2008).

Debido a la importancia de la transferencia de carbono hacia el cnidario, se han planteado algunas hipótesis que tratan de explicar los factores que activan la fijación del CO₂ y liberación de los productos fotosintéticos en *Symbiodinium* (Yellowless *et al.*, 2008). Algunos investigadores atribuyen este efecto a un “factor hospedero” (Muscatine, 1967; Trench 1971c y Gates *et al.*, 1995) y otros dicen que es un artefacto creado por el cambio de las condiciones del microambiente del dinoflagelado recién aislado (Seibt y Schlichter, 2001) todavía sin llegar a conclusiones claras.

El glicerol es el principal fotosintetato transferido al cnidario, (Muscatine, 1967; Trench 1971b) y el osmolito mayormente utilizado por células eucariotas para contrarrestar el

estrés de agua (Yancey *et al.*, 1982, Yancey, 2005), lo cual sugiere que la síntesis de este polialcohol en el dinoflagelado simbiote podría inducirse por gradientes o estímulos osmóticos. En la búsqueda de explicar y demostrar este posible mecanismo, se estudió *in vitro* la síntesis del glicerol en dos especies de *Symbiodinium* estresadas con alta osmolaridad en condiciones de luz.

ANTECEDENTES

En la evolución, las relaciones interespecíficas tienen una participación importante al permitir que los organismos puedan co-evolucionar y surgir favorablemente en diferentes hábitats. El ejemplo más relevante está representado por la relación endosimbiótica, por la cual probablemente se originaron las células eucariotas (el origen de la mitocondria y el cloroplasto, propuesto por Margulis en 1967). La simbiosis, fue definida por de Bary a mediados del siglo XIX como la asociación mutua permanente o duradera entre dos o más organismos de especies diferentes (Thrall *et al.*, 2006).

De forma general, el término simbiosis se emplea para referirse a la interdependencia de dos o más especies. Cuando un simbiote vive a expensas del otro la simbiosis se califica como parasitismo, y como mutualismo cuando ambas especies se benefician de esta asociación. Existen muchos ejemplos de asociaciones simbióticas entre diferentes grupos de organismos, tales como las interacciones alga-hongo, hongo-planta, bacteria-mamíferos, bacteria-planta y la interacción alga-cnidario (Ahmadjian y Paracer, 1986; Muscatine y Porter, 1977).

El phylum Cnidaria incluye las clases, Anthozoa (corales), Hydrozoa (hidras, anémonas), Scyphozoa y Cubozoa (medusas) (Veron, 2000; Barnes, 1974). Están compuestos básicamente por dos capas de células, el ectodermo y la gastrodermis, separadas por la mesoglea (capa no celular gelatinosa que puede servir de sostén e intercambio de sustancias, Veron, 2000) (Fig. 1).

Las especies simbióticas de los cnidarios, albergan comúnmente a algas dinoflageladas del género *Symbiodinium* en células endodérmicas que recubren la cavidad gastrovascular dentro de vacuolas denominadas simbiosomas (Fig.1). Una excepción son las almejas y los caracoles del genero *Strombus* que los albergan extracelularmente en canales especializados del manto, manteniendo una asociación mutualista entre ellos (Stat *et al.*, 2006, Begon *et al.*, 2006).

Los corales (clase Anthozoa, orden Scleractinia. Bourne, 1990), se dividen en *hermatípicos*, los cuales son constructores de arrecifes y se distribuyen sólo en las regiones tropicales, y los *ahermatípicos*, que no forman arrecifes y se distribuyen en todo el mundo. Muchos corales hermatípicos mantienen una asociación simbiótica con *Symbiodinium*, mientras que son pocos los corales ahermatípicos que poseen esta característica (Veron, 2000; Nybakken, 1993).

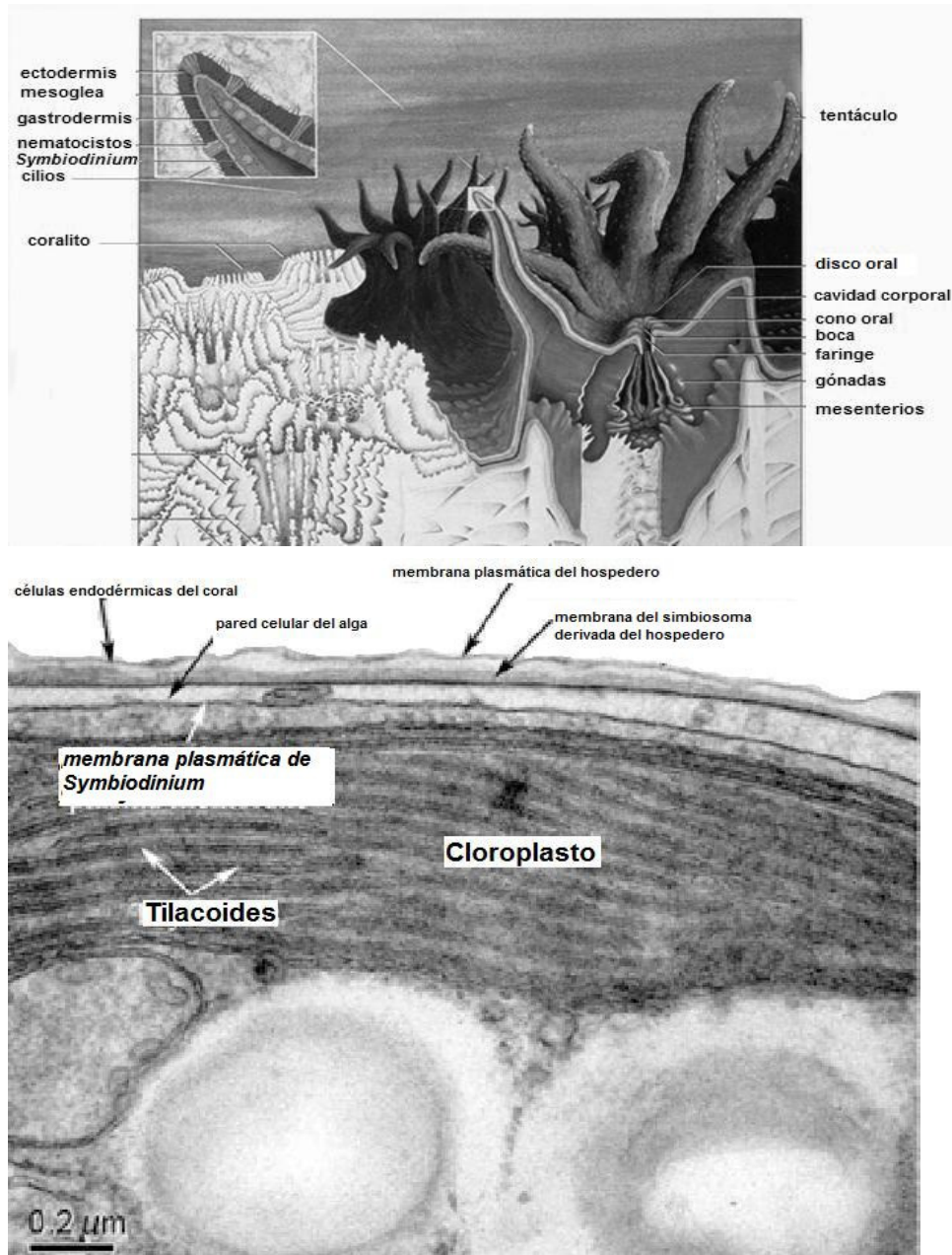


Figura 1. Estructura general del pólipo (arriba) y del simbiosoma (abajo). Ilustraciones tomadas de Veron, 2000; Yellowless *et al*, 2008.

Los *dinoflagelados* (clase Dinophyceae) son protistas alveolados con un origen monofilético cercanamente relacionado con los apicomplexa (Stat *et al.*, 2006). Forman parte del plancton, poseen dos flagelos que les sirven para su movilidad en vida libre y están armados con placas hechas de celulosa, llamadas tecas. Los *dinoflagelados* pueden ser autótrofos, heterótrofos o de nutrición mixta (Nybakken, 1993). Los dinoflagelados autótrofos se caracterizan por presentar un cloroplasto con tres membranas y poseer el carotenoide peridininina (Morse *et al.*, 1995).

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* (familia Symbiodiniaceae, Orden Suessiales, clase Dinophyceae, Stat *et al.*, 2006), pueden establecer simbiosis mutualista con otros Phyla de invertebrados marinos como, Mollusca (caracoles y almejas), Plelmintos (gusanos planos) y Porifera (esponjas), y con protistas unicelulares como los foraminíferos (Trench, 1979; Pawlowski *et al.*, 2001). Además, constituyen un género diverso que contiene por lo menos nueve (A-I) clados divergentes (Pochon y Gates, 2010), donde seis de ellos (A-D, F y G) están presentes en los corales escleractinios (LaJeunesse, 2001; Coffroth y Santos 2005; Stat *et al.*, 2006; Stambler, 2011).

Symbiodinium puede estar en forma de quiste vegetativo (5-15 µm de tamaño) o en zoospora móvil. El quiste vegetativo haploide es la forma simbiótica dominante y la zoospora en vida libre (Fig.2, Stat *et al.*, 2006).

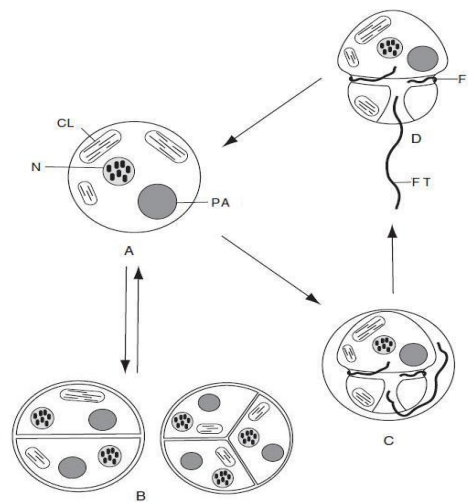


Figura 2. Ciclo de vida de *Symbiodinium*. A, quiste vegetativo. B, quiste vegetativo en división. C, zoospora en desarrollo. D, zoospora. CL, cloroplasto. N, Núcleo. PA, productos de acumulación. FL, flagelo longitudinal. FT, flagelo transversal (diagrama tomado de Stat *et al.*, 2006).

Entre las principales ventajas de la relación simbiótica cnidario-*Symbiodinium* se encuentra la maximización de la captación de luz por la arquitectura del esqueleto de los cnidarios (Enríquez *et al.*, 2005) y la disposición de nutrientes inorgánicos como, el amonio y los fosfatos productos del metabolismo del hospedero, elementos fundamentales para que el alga fotosintetice eficientemente y pueda transferir el carbono fijado hacia el cnidario para que este pueda crecer y calcificar (Pearse y Muscatine, 1971; Allemand *et al.*, 2004).

La fotosíntesis es básicamente la reducción del CO₂ a carbohidrato (CH₂O) por los electrones del H₂O utilizando la luz como catalizador (Berg *et al.*, 2008). La luz cataliza la transferencia de electrones desde el centro de reacción *P680* del fotosistema II (PSII) hasta el centro de reacción *P700* del fotosistema I y la reducción de la ferredoxina, a través de transportadores de electrones especializados, para generar ATP y NADPH (Berg *et al.*, 2008; Nelson y Cox, 2004; Falkowski y Raven, 1997).

Los productos de las reacciones fotoquímicas son utilizados principalmente en las reacciones orgánicas del ciclo de Calvin-Benson; además, se utilizan en la reducción de tiorredoxina, para la regulación de la fijación de carbono y síntesis de ATP (Berg *et al.*, 2008), en la reducción de nitrato o sulfato y en la reacción de Mehler, para la eliminación de radicales libres de oxígeno y formación de ATP (Falkowski y Raven, 1997). Y cuando hay un exceso de energía, ésta puede ser disipada de forma no fotoquímica (NPQ, de sus siglas en inglés, non-photochemical quenching, Bilger y Björkman, 1990; Maxwell y Johnson, 2000; Lombardo, 2011) o simplemente se pierde como fluorescencia (Falkowski y Raven, 1997).

La fijación de carbono ocurre con las reacciones del ciclo de Calvin-Benson; primero se da la fijación de CO₂ sobre la ribulosa 1,5-bisfosfato para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato utilizando 3 moléculas de ATP. Seguidamente se reduce el 3-fosfoglicerato para generar hexosas consumiendo 2 moléculas de NADPH, y por último, se regenera la ribulosa 1,5-bisfosfato para que se pueda seguir con la fijación de CO₂ (Berg *et al.*, 2008).

Sobre la base de la eficiencia de la simbiosis alga-cnidario, la transferencia de carbono orgánico del dinoflagelado al cnidario puede representar hasta el 50 % del carbono fijado en incubaciones *in vitro*, siendo un fenómeno sostenible (Trench, 1971a, 1971b y 1971c; Muscatine *et al.*, 1972), que puede llegar a cubrir el 70 % de los requerimientos basales del coral (Muscatine *et al.*, 1981; Gates *et al.*, 1999) e incluso el 95 % del requerimiento energético del hospedero (Falkowski *et al.*, 1993). En comparación con las demás algas que pierden algo del carbono fijado al medio externo por procesos de “escurrimiento”, en los dinoflagelados en simbiosis este carbono es “exportado” hacia el coral, llegando a funcionar el cnidario holosimbionte (unidad hospedero y huésped) como un autótrofo (capaz de sintetizar su propio alimento) (Iglesias-Prieto y Trench, 1997b).

El fenómeno de transferencia de fotosintetatos fue observado inicialmente en experimentos que emplearon bicarbonato radioactivo, indicando la presencia de ^{14}C en tejidos del animal, lo que demostró que dicha fijación ocurría por las algas simbiontes (Muscatine, 1967; Trench, 1971b; Muscatine *et al.*, 1972). Posteriormente se emplearon algas recién aisladas que al ser expuestas a extractos crudos preparados de tejido animal, estimulaban la fijación de carbono y liberación de fotosintetatos (Muscatine, 1967; Trench, 1971a, b, c; Muscatine *et al.*, 1972). El posible inductor de este proceso se le dio el nombre de “factor hospedero”. Sin embargo, se han encontrado resultados contradictorios de este “factor hospedero” que ponen en duda su existencia, como la inhibición o ausencia de estímulo en la liberación de fotosintetatos (Withers *et al.*, 1998; Davy y Cook, 2001; Grant *et al.*, 2004). Además, se ha podido aumentar el estímulo de liberación de fotosintetatos al diluir el factor hospedero en agua de mar (Muscatine *et al.*, 1972). Para explicar estos controvertidos resultados Grant *et al.*, (2003) propusieron la existencia de un factor hospedero de liberación y otro de inhibición de la fotosíntesis (HRF y PIF respectivamente, por sus siglas en inglés) en los extractos crudos de tejido animal

Las caracterizaciones parciales del factor hospedero indican que se trata de moléculas de tamaño pequeño (<1 kDa), aparentemente representadas por aminoácidos, que estimulan una mayor producción de glicerol que el agua de mar en *Symbiodinium* (Battey y Patton, 1987; Gates *et al.*, 1995; Cook y Davy, 2001; Grant *et al.*, 2004). Sin embargo, en la

purificación parcial de ambos factores se observan incongruencias en la metodología utilizada y ausencia de caracterizaciones cromatográficas de dicha purificación (Grant *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2006). Además, Seibt y Schlichter (2001) demostraron que el agua de mar afecta la fotosíntesis de algas recién aisladas, lo cual genera resultados que podrían interpretarse como artefactos. De esta forma, el estímulo e inhibición en la producción de fotosintetatos estudiado hasta ahora *in vitro* podría ser un sinergismo del cambio drástico del microambiente del dinoflagelado cuando es sacado de su microhábitat natural (el simbiosoma) (Goiran *et al.*, 1997; Wang y Douglas, 1997), lo cual deja este proceso aún sin explicación.

En microalgas como la clorofita halotolerante *Dunaliella* y *Symbiodinium* en simbiosis, uno de los mayores productos de la fijación de carbono es el glicerol; además, es la principal forma de carbono orgánico transferido por *Symbiodinium* al cnidario (además de transferir péptidos, amino ácidos, azúcares, lípidos, carbohidratos complejos e incluso proteínas; Muscatine, 1967, Muscatine *et al.*, 1984; Trench, 1971b, 1979; Markell y Wood-Charlson, 2010), indicando posiblemente que la fijación de carbono en el dinoflagelado se desvía hacia la formación de glicerol (Withers *et al.*, 1998; Davy y Cook, 2001; Grant *et al.*, 2006).

El glicerol se forma por la reducción de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a glicerol 3-fosfato (G3P), reacción llevada a cabo por la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) o dihidroxiacetona fosfato reductasa (DHAPR) (Ghoshal *et al.*, 2002). Además, el glicerol puede ser sintetizado a partir de la hidrólisis de triglicéridos o por la interconversión de la DHAP proveniente del ciclo de las pentosas fosfatos y/o glucólisis, o por la gliceroneogénesis donde se convierte el piruvato a DHAP, de la cual se genera glicerol 3-fosfato (Nelson y Cox, 2005). En organismos fotosintetizadores osmoreguladores como *Dunaliella*, la producción de glicerol es regulado por la osmolaridad externa y su síntesis proviene principalmente de la fijación de carbono (Liska *et al.*, 2004) y de la degradación de almidón (Avron, 1986).

En términos de adaptación al estrés de agua u osmótico, los organismos se dividen en: a) osmo-conformadores, que utilizan osmolitos orgánicos para mantener la presión osmótica celular igual que la del fluido medioambiental externo; y b) osmo-reguladores que usan transportadores iónicos y osmolitos orgánicos para regular homeostáticamente la presión osmótica interna (Yancey, 2005).

Los osmolitos compatibles u orgánicos, además de sus funciones metabólicas, son los mayores componentes utilizados por las células para mantener su presión osmótica basal y para soportar cambios osmóticos de su medio exterior, sin producir el efecto desfavorable que podrían tener algunos iones sobre la estructura y función de las macromoléculas (Yancey, 1982).

Yancey *et al.*, 1982 y Yancey, 2005 categorizaron los osmolitos compatibles según su naturaleza química, en carbohidratos, aminoácidos y derivados, metilaminas y urea (ésta última podría ser no compatible). Todos los organismos utilizan estos osmolitos para protegerse del estrés de agua, con excepción de las halobacterias que utilizan el K^+ (Yancey *et al.*, 1982, Yancey, 2005).

El holosimbionte cnidario-alga, presumiblemente se comporta como osmoconformador a nivel del animal (Somero y Yancey, 1997) y como osmo-regulador por parte de *Symbiodinium* (Yancey *et al.*, 1982, 2010; Goiran *et al.*, 1997). En algunos cnidarios (corales, medusas y anémonas), los mayores osmolitos son las betaínas, la dimetiltaurina, la taurina y el dimetilsulfopropionato (DMSP), este último se encuentra en bajas concentraciones en los corales simbióticos, ya que supuestamente provienen del simbionte (Yancey *et al.*, 2010).

Se ha mostrado evidencia experimental que sugiere que el glicerol producto de la fotosíntesis de *Symbiodinium*, es la fuente de energía para la calcificación en los corales escleractinios (Colombo-Pallotta *et al.*, 2010). Sin embargo, el estímulo que induce la síntesis de este fotosintetato no ha sido esclarecido. En otros organismos incluyendo algas verdes, la producción del glicerol ocurre comúnmente como respuesta a un desequilibrio

osmótico (Yancey *et al.*, 1982). Por lo tanto, en este trabajo de tesis se plantea el estudio *in vitro* de la producción de glicerol en el alga simbiote bajo un estímulo de alta osmolaridad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la inducción de la síntesis del glicerol en *Symbiodinium* bajo estrés osmótico.

Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto del estrés osmótico en *Symbiodinium*, sobre la producción de glicerol, fotosíntesis y crecimiento.
2. Determinar el efecto del estrés osmótico en la expresión de los genes que codifican para las enzimas, ribulosa 1, 5-bifosfato carboxilasa/oxidasa, gliceraldehído fosfato dehidrogenasa, glicerol 3- fosfato dehidrogenasa, y 6-fosfogluconato dehidrogenasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Condiciones experimentales y cultivo de *Symbiodinium*

Se utilizaron dinoflagelados aislados de dos especies de cnidarios simbióticos, el coral *Montastrea faveolata* (mf11.5b.1, genotipo “ITS2” B17) y la medusa *Cassiopeia xamachana* (KB8, genotipo “ITS2” A1) de la colección de cultivos de la Dra. M. A. Coffroth (Universidad Estatal de Nueva York en Buffalo, USA).

Primero se realizó la curva de crecimiento de *Symbiodinium*, sembrando 5×10^5 cel mL⁻¹ de cada cepa en 50 mL de medio ASP-8A¹ (Blank, 1987, ver anexos) en condiciones control y de presión osmótica de ~ 1075 mOsM kg⁻¹ producida por 9 % de PEG 3350 en medio ASP-8A. Las curvas se realizaron por triplicado y los conteos se hicieron en un hemocitómetro cada dos días (para el genotipo B17) y cada cinco días (para genotipo A1) durante aproximadamente 30 días. Además, fueron tomadas muestras de cada cepa para determinar el glicerol producido durante los días de conteo.

También se evaluó el efecto del estrés osmótico en el crecimiento del genotipo B17 durante la fase logarítmica de la curva de crecimiento (a los 19 días); para ello se hicieron conteos cada dos días.

Para determinar el efecto de la alta osmolaridad en la producción de glicerol, se cultivaron los genotipos A1 y B17 de *Symbiodinium* en medio APS-8A hasta el día 15 de crecimiento. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio ASP-8A fresco a una concentración celular de 1.2×10^7 cel mL⁻¹; luego se tomaron 500 μ L de células después de terminado su ciclo de oscuridad y se incubaron a presiones osmóticas crecientes producidas con diferentes solutos (Tabla 1) durante una hora (1 h) con iluminación de $62 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (medido con un sensor 4π wallz LI-LICOR 1400 data logger). Bajo las mismas condiciones anteriores, se determinó el porcentaje de glicerol extracelular en el experimento con máxima presión osmótica para ambos genotipos.

¹ El medio ASP-8A es un medio definido que equivale a agua de mar artificial

Posteriormente, se midió el efecto del estrés osmótico durante 12 horas de luz utilizando 100 mM de sorbitol, manitol y glicina betaína. Los experimentos se realizaron inmediatamente después de terminar el ciclo nocturno y por triplicado, cada uno con su control.

Tabla 1. Presión osmótica de solutos utilizados en los experimentos¹.

Concentración (mM)	Presión Osmótica (mOsM Kg ⁻¹)			
	Sorbitol	Manitol	Betaína	PEG
25	874.4 ± 3.4	874.4 ± 3.4	874.4 ± 3.4	
50	907.6 ± 1.2	905.3 ± 4.7	896 ± 1.4	
100	953.3 ± 2.1	959.7 ± 0.6	940.5 ± 4.9	
200	1044.3 ± 4.0	1064.7 ± 1.5	1043 ± 0	
4.5 % p/v				949.3 ± 4.0
9 % p/v				1075.3 ± 1.5

¹ presión osmótica del medio ASP-8A = 852 ± 2.1 mOsm Kg⁻¹. Los valores representan el promedio de tres medidas independientes. Se muestra la media ± DE

Los diferentes solutos se prepararon en medio ASP-8A y se determinó la presión osmótica producida de las soluciones por medio de un osmómetro crioscópico (Osmomat 030, Gonotec, Tabla 1). El valor dado de 25 mM para todos los solutos fue obtenido por regresión lineal.

Se evaluó el efecto del Na⁺ sobre la producción de glicerol en *Symbiodinium* utilizando las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente, con modificaciones en el medio ASP- 8A. Se realizaron dos experimentos, en el primero se cambiaron las concentraciones de KCl y NaCl (de 3.87 mM en ASP-8A a 140 mM KCl y de 430 mM a 152.5 mM NaCl) del medio ASP- 8A, según Seibt y Schlichter, 2001; y en el segundo se emplearon concentraciones de 0 mM KCl y 50 mM NaCl. Todo ello con el fin de amplificar el efecto del Na⁺ sobre *Symbiodinium* al aumentar su concentración. En el primer experimento con Na⁺, se utilizó 100 mM de NaCl y 9 % de PEG 3350, para ejercer presión osmótica, y en el segundo se utilizaron concentraciones de 50 mM, 100 mM y 200 mM de NaCl. Sólo se presentan resultados para el genotipo B17, ya que el genotipo A1 no creció favorablemente en estas condiciones.

Transcurrido el tiempo de estrés, para estimar glicerol total, las células se hirvieron durante 15 minutos y recolectaron por centrifugación (5 minutos a 13800 X g); para las mediciones de glicerol extracelular, las células fueron primero centrifugadas y el sobrenadante se hirvió. Se colectó el sobrenadante con el glicerol disuelto y se determinó su concentración empleando un ensayo comercial colorimétrico (Free Glycerol Reagent A, Sigma). Este ensayo mide el glicerol libre y consiste en una reacción enzimática donde el glicerol es fosforilado por la glicerol cinasa (GK), produciendo glicerol-1-fosfato, el cual es oxidado por la glicerol fosfato oxidasa a deshidroacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), donde este último es acoplado por la peroxidasa (POD) con 4-aminoantipirine (4-AAP) y *N*-etil-*N*-(3-sulfopropil) *m*-anisidina de sodio (ESPA) para producir el colorante quinoneimina, que muestra una absorbancia máxima a 540 nm. De este modo se cuantificó la concentración de glicerol presente en las muestras contra un estándar de glicerol (0.26 mg mL⁻¹).

2. Fotosíntesis de *Symbiodinium*

Se determinó el efecto del estrés osmótico sobre la eficiencia fotosintética de *Symbiodinium*, mediante curvas de fotosíntesis versus irradiancia (P-I) y el cálculo de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{PSII}).

Para realizar las curvas P-I se utilizaron cultivos en fase exponencial de crecimiento (día 15) con una densidad de 3.5 X 10⁶ cel mL⁻¹.

La tasa fotosintética se midió polarográficamente por triplicado a una temperatura de 27°C, siguiendo el método descrito en Iglesias-Prieto y Trench, 1994, para lo cual se empleó una cámara de fase líquida (DW1, Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, U.K.), conectada a un baño circulador con un controlador de temperatura (Termo Haake DC-10, Alemania). La evolución de oxígeno se midió mediante electrodos tipo Clark (Hansatech), calibrados con aire y N₂ en medio de cultivo ASP-8A. Los datos fueron capturados en una computadora equipada con un convertidor analógico/digital usando el programa DATACAN V (Sable systems, Inc., Las Vegas, NV, U.S.A).

Al empezar las curvas P-I se agregó NaHCO_3 hasta alcanzar una concentración final de $16.6 \mu\text{M}$ a fin de evitar la limitación de CO_2 . Las células fueron expuestas inicialmente a oscuridad por 5 min para medir la respiración en oscuridad (R_D) y posteriormente expuestas a diferentes intensidades lumínicas (I): 8, 15, 42, 87, 105, 171, 207 y $300 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un tiempo de inducción de 3 min (las dos primeras intensidades se midieron por 5 min); para esto se utilizó una fuente de luz actínica² externa (CODA I-150). Previamente se calibraron las luces empleando tres filtros para atenuar la luz y un sensor de luz 4π (WALTZ).

La eficiencia fotosintética (α) fue la pendiente de la regresión lineal de los primeros 4 puntos en la curva P-I. La tasa fotosintética máxima (P_{max}) se calculó del punto más alto de producción de oxígeno de la curva P-I, la irradiancia de saturación (E_k) se calculó dividiendo la tasa fotosintética máxima entre la eficiencia fotosintética (P_{max}/α), y la irradiancia de compensación E_c se calculó a partir de la respiración en la oscuridad entre la tasa fotosintética (R_D/α). Estos resultados fueron normalizados por célula y por clorofila a (Chl *a*).

La extracción de clorofila se hizo con acetona fría y dimetil sulfóxido (DMSO) durante toda la noche y luego se cuantificó espectrofotométricamente a 630, 663 y 750nm (Jeffrey y Humphery, 1975).

Los resultados se graficaron mediante el ajuste de la ecuación de Jassby y Platt (1976), agregando la respiración (r) para obtener la fotosíntesis neta.

$$P=r+ (P_{\text{max}}*\tanh (\alpha*I/ P_{\text{max}}))$$

Donde P es la tasa de producción instantánea; tanh, tangente hiperbólica.

² Luz que induzca fotosíntesis.

Para determinar la eficiencia del PSII se utilizó 1.2×10^7 cel mL⁻¹ de concentración celular de cada cepa en 3mL, en la fase exponencial de crecimiento (día 15). Se midió la fluorescencia variable con un fluorómetro de pulsos de amplitud modulada (PAM). Se dispuso de una cámara oscura conectada a la fibra óptica del PAM y perpendicular a este se conectó una fuente de luz actínica (CODA I-150), con una intensidad de luz 352 $\mu\text{mol quanta m}^{-1} \text{s}^{-2}$, medida con un sensor de luz 4π (WALTZ).

Antes de empezar las mediciones, las cepas de *Symbiodinium* se aclimataron a la oscuridad durante 1 h, para asegurar la relajación total del PSII. En seguida se empezaron las mediciones, dando un primer pulso de luz saturante (en ausencia de luz actínica) para determinar la eficiencia cuántica máxima (F_v/F_m). Luego de relajarse PSII, se retiró la mitad del volumen de cultivo y se agregó este mismo volumen de medio ASP-8A para el control y 18 % de PEG 3350 en ASP-8A como tratamiento de choque osmótico, simultáneamente se encendió la luz actínica. Seguidamente se dieron pulsos de luz saturante cada 5 min durante 50 minutos para determinar la eficiencia cuántica máxima efectiva (F_v/F'_m). Los pulsos fueron de máxima intensidad (12) y de 0.6 s de duración. Los experimentos fueron hechos por triplicado.

La eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Φ_{PSII}) se determinó mediante la relación de la fluorescencia variable (F_v) y la fluorescencia basal (F_0) ($\Phi_{\text{PSII}} = F_v / F_m$ ó F_v / F'_m); la fluorescencia variable fue calculada a partir de la diferencia entre la fluorescencia máxima (F_m ó F'_m) y F_0 (Maxwell y Johnson, 2000).

3. Expresión de genes relacionados con la síntesis de glicerol vía ciclo de Calvin-Benson en *Symbiodinium*

Se extrajo el ADN de 100 μL de células sedimentadas de cada una de las cepas de *Symbiodinium* para estandarizar las reacciones de PCR de los diferentes genes en estudio (Tabla 2). Las células se rompieron con un buffer de lisis (0.2 M tris, 2 mM EDTA, 0.7 % SDS, pH 7) y perlas de vidrio bajo agitación. Posteriormente se precipitaron las proteínas

con una solución de 9 M acetato de amonio. El ADN se precipitó con isopropanol y 3 M de acetato de sodio y se lavó con etanol al 70 % (LaJeunesse *et al.*, 2003).

Para evaluar la integridad del ADN, se realizó una amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores de ITS (Internally Transcribed Spacer, para el ADN ribosomal 18s) para *Symbiodinium*. La PCR se llevó a cabo por 40 s a 94 °C, 40 s a 52 °C y 1 min a 72 °C, por 35 ciclos. Los productos de PCR fueron visualizados en un trans-iluminador (ULTRA-LUM) después de una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹).

Para el análisis de la expresión de algunos genes relacionados con la fijación de carbono y la síntesis de glicerol (Tabla 2) se tomaron 1×10^7 células, colectadas por centrifugación a 4000 X g, para cada tratamiento (control y estrés) después de estimular su fotosíntesis durante 1 h a $62 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Las células se rompieron con reactivo TRI Reagent[®] (SIGMA) y perlas de vidrio durante 3 min de agitación a 4600 rpm en un agitador de perlas (Bead Beater, BioSpec). Seguidamente, se extrajo el ARN de estos lisados según las recomendaciones del fabricante y modificaciones de Rosic y Hoegh-Guldberg (2010).

El ARN se resuspendió en 20 μL de agua libre de ARNasas y se determinó su concentración y pureza en un espectrofotómetro Nanodrop 2000 C (Thermo Scientific).

Los cebadores para los genes *gpd* y *6pg* se construyeron de secuencias EST del "Comparative transcriptome analysis of dinoflagellate symbionts from reef-building corals" (en preparación, Till Bayer *et al.*, 2011), para *rcb* se utilizó la secuencia descrita para *Symbiodinium* en el GeneBank con clave de acceso AF298221.1 y para *gapdh* se utilizaron cebadores que amplifican específicamente la *gapdh* de cloroplasto (Takishita *et al.*, 2003).

Los oligonucleótidos se escogieron de las regiones conservadas de aminoácidos de las secuencias anteriormente nombradas en comparación con sus homólogos en distintos organismos, mediante el programa BLAST COBALT (ver anexos). La extensión de los

oligonucleótidos fue de 21 nucleótidos, y el producto de PCR fue de alrededor de 500 pares de bases (pb) (Tabla 2).

Para el análisis de expresión se utilizó la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo. Se obtuvo el ADN complementario (cDNA) a partir del ARN aislado (1 µg) de simbiontes estresados osmóticamente y de simbiontes en condiciones control, utilizando oligonucleótidos de dT₁₅, siguiendo las indicaciones del fabricante (PROMEGA, USA). Luego de obtener el cDNA, se realizó la reacción de PCR con 0.4 µM de oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 2). El número de ciclos fue establecido por la estandarización del producto de PCR (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones para la RT-PCR en el análisis de expresión.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Producto esperado	Condiciones de PCR (40 ciclos)
<i>rcb</i>	5': TTCTCCGCCAACATAAC(t/c)GC 3': AG(a/g)TTCTCGAAGAAGGC(c/t)GG	466 pb	94 °C, 3 min; 62.8 °C 50 s; 72 °C 1 min
<i>gapdh</i> *	DINPLA1. 5': ATHGCNATGAARGAYCCNGA DINPLA2. 3': ATYTCNGCRCADATYTCYTC	752 pb	94 °C, 40 s; 50 °C 40 s; 72 °C 1 min
<i>6pg</i>	5': CACAATGCAGGCGAGTATGCG 3': ACATTTGCGCATAAGAGGCAAT	474 pb	94 °C, 50 s; 66 °C 50 s; 72 °C 1 min
<i>dhapr</i>	5': GTCCTCATGGGCGCCAAC 3': GGCGGCAGGAATCGAAAA	378 pb	94 °C, 40 s; 64 °C 40 s; 72 °C 1 min

*gen control ("housekeeping gene")

El producto de PCR se evaluó mediante electroforesis horizontal de agarosa al 1.5 % y teñido con bromuro de etidio; se hizo una foto de los geles y se cuantificaron los pixeles de cada banda mediante el programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>). Todas las PCRs se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 2400.

4. Actividad enzimática específica de DHAP-reductasa

Para evaluar el efecto de la alta osmolaridad en la actividad específica de DHAP-reductasa, se incubaron 2×10^7 cel mL⁻¹ de *Symbiodinium* por una hora en condiciones control y en 1075 mOsM Kg⁻ (9 % PEG, 3350) en luz luego de salir del ciclo de oscuridad.

Seguidamente se colectaron las células por centrifugación, se resuspendieron en buffer TrEd (10 mM de trietanolamina, 1 mM de EDTA, 1 mM DTT, pH 7.5) con inhibidores de proteasas (SIGMA) y se rompieron con perlas de vidrio en un agitador de perlas (bead beater) por 2 minutos a 4800 rpm.

El extracto crudo se colectó en hielo y se centrifugó por 15 min a 8100 X g, se tomó el sobrenadante (extracto de proteínas) y se dividió la muestra para determinar la concentración de proteínas y para realizar la medida de la actividad específica de DHAP-reductasa, a esta última muestra se agregó PEG, 3350 hasta una concentración de 15 %. La actividad específica de DHAP-reductasa se midió mediante la absorbancia a 339 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro DW-2 (SLM-AMINCO). Los ensayos se prepararon en un volumen final de 2 mL a pH 7.5 con una concentración final de 200 μ M de NADH y 500 μ M de DHAP. La reacción se inició agregando 100 μ L de extracto crudo, tomando mediciones al tiempo cero y después de 5 min para determinar la delta de absorbancia.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford utilizando una curva estándar de albúmina según las indicaciones del fabricante (SIGMA). Las mediciones de absorbancia se realizaron a 595 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro (DW-2, SLM-AMINCO).

Los cálculos de la actividad específica se realizaron según Bergmeyer y Graßl (1983, ver anexos) cuyas unidades son $U\ g^{-1}$, donde U se define como un μ mol de sustrato por minuto y g son gramos de proteína.

5. Análisis estadístico.

A fin de corroborar la significancia de los resultados comparativos, se emplearon pruebas estadísticas ANOVA de una vía y prueba-T (Zar, 2010), utilizando el software STATISTICA 8. Las gráficas se realizaron con el software Sigmaplot y Microsoft Office Excel.

RESULTADOS

1. Producción de glicerol en *Symbiodinium*

Se realizó la curva de crecimiento de cada una de las cepas de *Symbiodinium* (genotipos A1 y B17, Fig. 3), en ellas se observó que la fase de crecimiento exponencial comprende aproximadamente los primeros 10 días para el genotipo A1 y del día 4 al 15 para el genotipo B17, mientras que la fase estacionaria fue alcanzada en el día 20 por ambos genotipos. Todos los experimentos de estrés osmótico fueron realizados al día 15, ya que las células no se encontraban limitadas por nutrientes (Rodríguez-Román e Iglesias-Prieto, 2005) y estaban en una concentración celular adecuada de la fase de crecimiento exponencial.

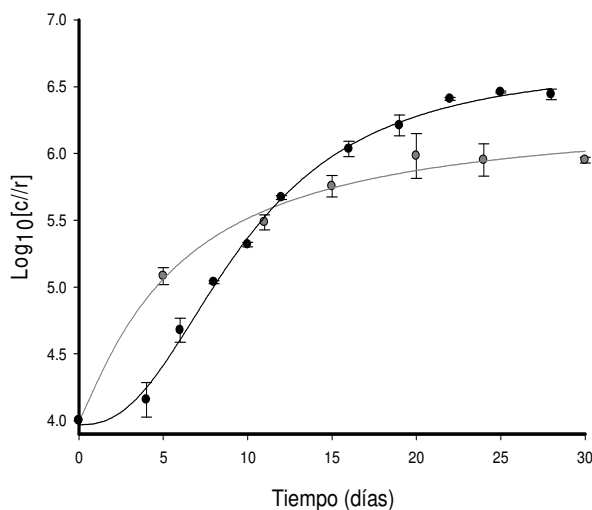


Figura 3. Curva de crecimiento de *Symbiodinium*. Se muestra la cinética de crecimiento del genotipo B17 (línea y punto negro) y el genotipo A1 (línea y punto gris). Los conteos celulares se hicieron cada dos y cinco días respectivamente para cada cepa. N= 3. Se muestra la media \pm DE

Seguidamente se determinó si la síntesis de glicerol en *Symbiodinium* se podía estimular al incrementar la presión osmótica exterior (Fig. 4A y 4B). Los resultados obtenidos mostraron que la producción de glicerol total en ambos genotipos (A1 y B 17) era inducida a razón del incremento de la presión osmótica exterior (Fig. 4A y 4B), sin que este efecto

fuera exclusivo a un soluto en particular. Sin embargo, la producción de glicerol en el genotipo A1 fue mayor que en el genotipo B 17 (Fig. 4A y 4B).

El efecto de todos los solutos sobre ambas cepas fue similar, a excepción de la betaína que solo indujo la producción de glicerol a partir de 900 mOsM kg⁻¹ de presión osmótica, observándose además, la disminución de este efecto a 1050 mOsM kg⁻¹ (Fig. 4B). Por otro lado, el polietilenglicol (PEG), el sorbitol y el manitol, fueron los solutos que indujeron mayormente la producción del glicerol (Fig. 4A y 4B), aunque este último produjo un efecto menor en el genotipo A1 en comparación con los demás solutos (Fig. 4A y 4B).

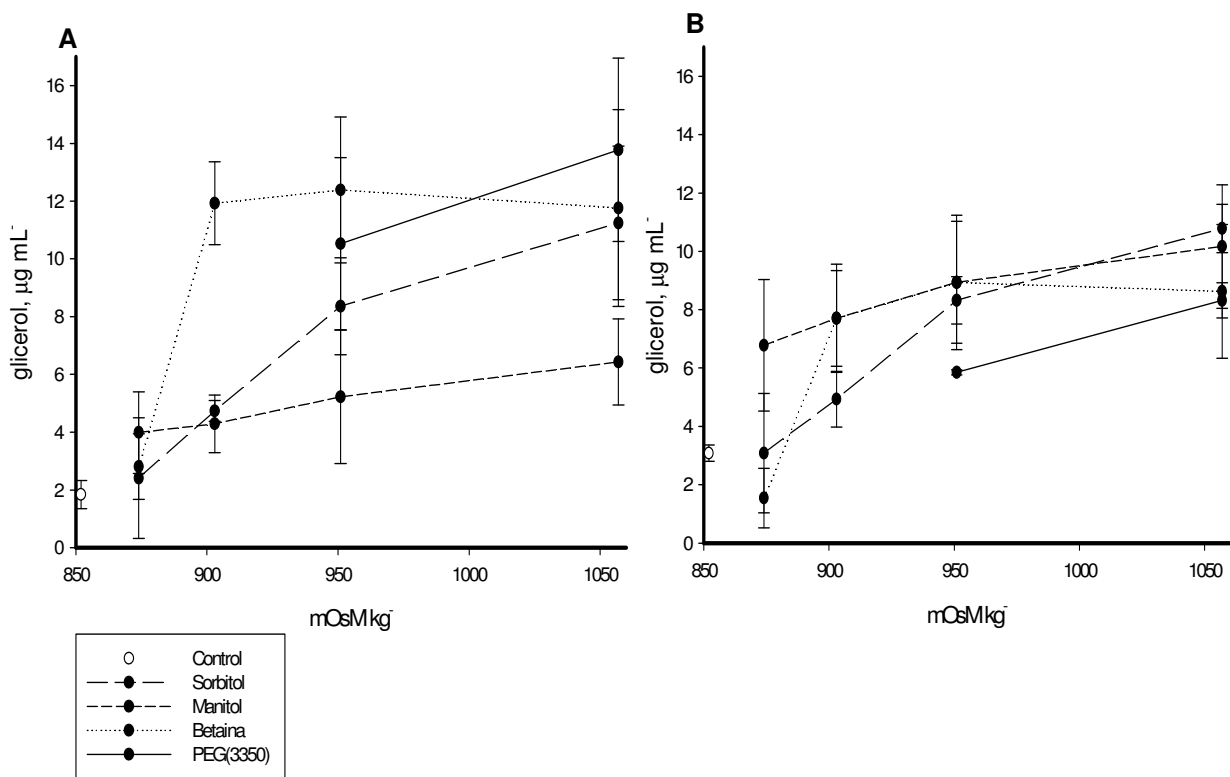


Figura 4. Producción del glicerol en *Symbiodinium* bajo choque osmótico. A) Genotipo A1; B) Genotipo B17. Se incubaron 1×10^6 cel mL⁻¹ durante 1 h en diferentes presiones osmóticas (852 mOsM kg⁻¹ control, 874 mOsM kg⁻¹, 903 mOsM kg⁻¹, 951 mOsM kg⁻¹ y 1057 mOsM kg⁻¹, empleando: medio de cultivo ASP-8A (control), sorbitol, manitol, betaína y polietilenglicol (PEG, 3350). N=3. Se muestra la media \pm DE.

Aunado a los resultados anteriores, se determinó que hasta el 100 % del glicerol producido por *Symbiodinium* es liberado al medio extracelular (Tabla 3); además, se observó que la producción de glicerol en el genotipo B17 bajo un estrés osmótico inducido con 100 mM de

sorbitol, manitol o betaína, puede ser sostenida durante 12 h en condiciones de luz (Tabla 4). Estos resultados son similares a los obtenidos por Muscatine (1967), Muscatine *et al.*, 1972 y Trench (1971a,b,c) quienes observaron una liberación continua de glicerol hasta por 10 h al incubar simbiontes recién aislados en extracto crudo de tejido de hospedero.

Tabla 3. Porcentaje de glicerol extracelular producido en *Symbiodinium*.

Genotipo	% de glicerol Extracelular	
	Control	Alta osmolaridad*
A1	100 ±6.63	96 ±6.01
B17	100 ±14.90	100 ±31.48

*9 % de PEG, 3350, ~1075 mOsM kg⁻¹. Se muestra la media ± DE

Tabla 4. Producción del glicerol en el genotipo B17 bajo 12h de estrés hiper-osmótico. Las células fueron incubadas por 12h en presencia de los solutos, sorbitol, manitol y betaína, a una concentración de 100 mM.

	Control	Sorbitol	Manitol	Betaína
Glicerol total después de 12 h (µg mL ⁻¹ en 10 ⁶ cel mL ⁻¹)	0.93 ± 0.45	4.65 ± 0.19	3.22 ± 1.36	1.29

N = 2. Se muestra la media ± DE. Resultados normalizados a 1X10⁻⁶ Cel mL⁻¹.

El efecto del Na⁺ en la producción de glicerol sólo fue medido en el genotipo B17 debido a que el genotipo A1 no creció adecuadamente bajo estas condiciones de cultivo. La concentración de glicerol producida por el simbionte incubado en 100 mM de NaCl fue similar a la concentración medida en condiciones control (t=-1.265; df=4; p=0.275, Fig.5A); mientras que los incubados en 9 % de PEG produjeron 2.6 veces más glicerol que el control (t = -9.803; df = 4; p = 0.0006, Fig. 4 y 5A). Además, el incremento de la concentración de NaCl (50 a 200 mM) en los cultivos, estimuló negativamente la producción de glicerol en *Symbiodinium* (Fig. 5B), debido posiblemente al efecto negativo que tiene sobre su fotosíntesis (Seibt y Schlichter, 2001).

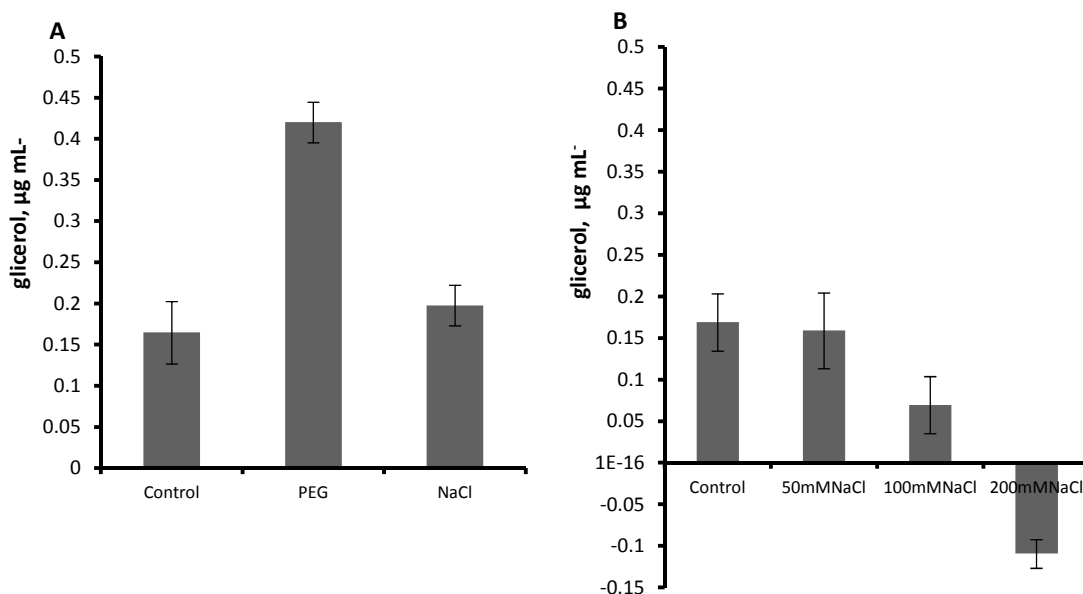


Figura 5. Efecto del Na⁺ en la producción de glicerol en *Symbiodinium*. A) *Symbiodinium* crecidos en medio ASP-8A modificado en las concentraciones de K⁺ y Na⁺ (140 mM y 152.5 mM, respectivamente). Condiciones control (C), con 100 mM de NaCl y 9 % de polietilenglicol (PEG, 3350) por 1 h en condiciones de luz. B) *Symbiodinium* cultivadas en medio ASP-8A 0 mM KCl y 50 mM NaCl (control), experimentos de 1 h en condiciones de luz. N=3. Se muestra la media ±DE. Concentración celular A, 8.8X10⁵ cel mL⁻¹ y B, 2.3X10⁶ cel mL⁻¹.

2. Fotosíntesis en *Symbiodinium*

Una vez que se determinó que el aumento de la presión osmótica induce la producción de glicerol en *Symbiodinium*, se estudió el efecto de este estrés sobre su fotosíntesis (Fig. 6 y 7, Tabla 6). En los resultados obtenidos se observó que la alta osmolaridad no afectó significativamente la tasa máxima de fotosíntesis (P_{max}) durante la primera hora de estrés (Fig. 6A y 6C; Tabla 5).

Al igual que los resultados en la producción de glicerol (Fig. 4A y 4B), se observaron algunas diferencias significativas entre ambos genotipos en la evolución de las reacciones orgánicas de la fotosíntesis. Al finalizar la hora de estrés, el genotipo A1 fue más eficiente por célula, mientras que el genotipo B17 parece ser más eficiente por clorofila *a* (Fig. 6A y 6C; Tabla 5). No obstante, el genotipo B 17 disminuye su eficiencia fotosintética (parámetro α) en condiciones de estrés sin afectar su P_{max} (Fig. 6A y 6C; Tabla 5).

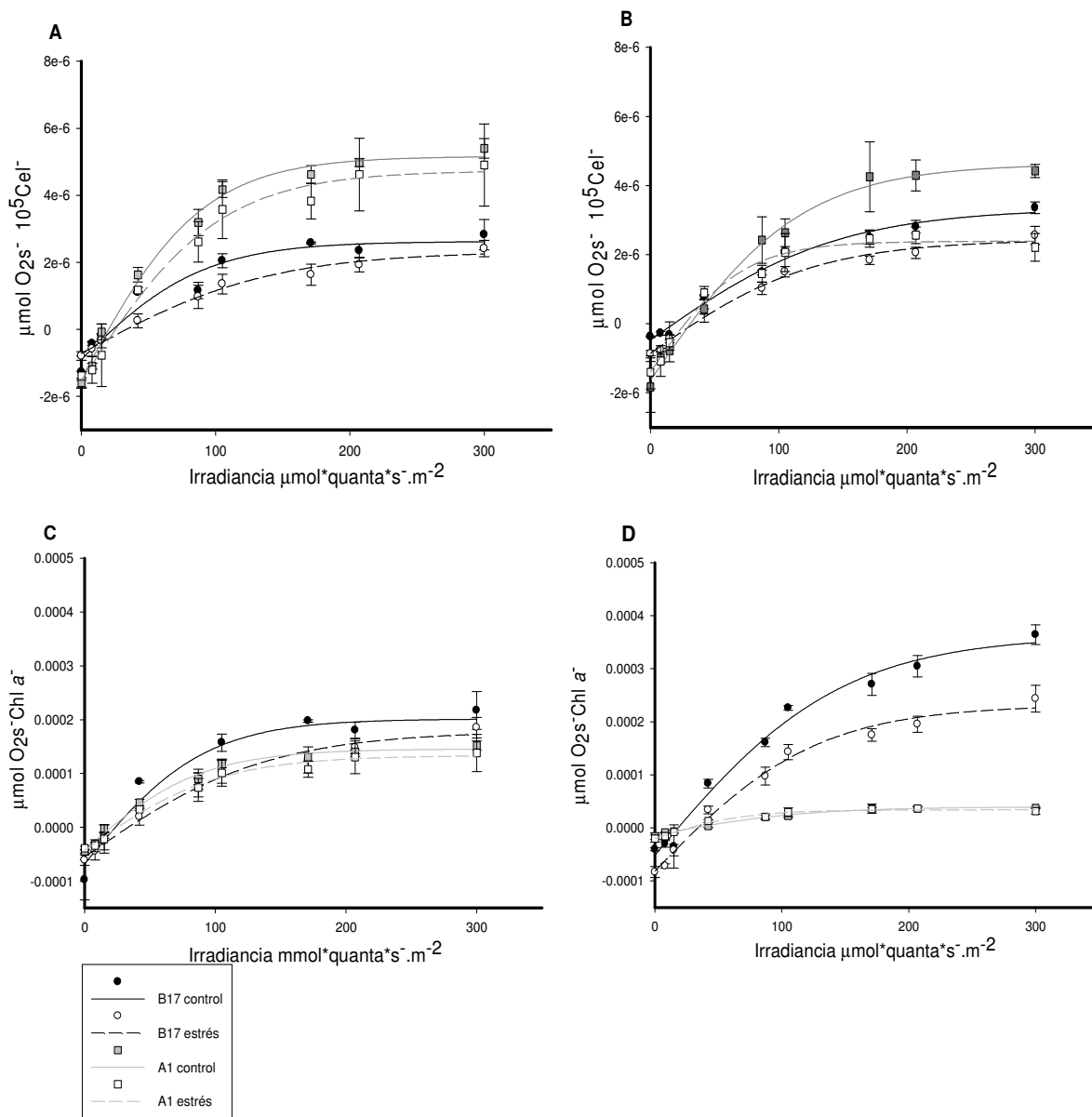


Figura 6. Curva P-I de *Symbiodinium* bajo 1 h de estrés (A y C,) y 1 semana de estrés (B y D). Arriba A y B normalizada por célula (10^5 cel); abajo, C y D normalizada por miligramo de clorofila *a* ($\text{mg Chl } a$). Osmolaridad de $1075 \text{ mOsM kg}^{-1}$ equivalente a 9 % PEG 3350. $N=3$. Se muestra la media \pm DE.

El efecto más evidente del estrés osmótico sobre la fotosíntesis se observó después de una semana. Ambos genotipos disminuyeron significativamente su fotosíntesis máxima (P_{max}) por célula con respecto a su control (6B; Tabla 5). Además, el genotipo A1 también redujo su P_{max} con respecto al obtenido al inicio del estrés (Fig. 6A y 6B; Tabla 5).

Igualmente, el genotipo B17 disminuyó su P_{\max} por clorofila a (Chl a) con respecto a su control (Fig. 6D; Tabla 5), además de incrementar 4 veces su respiración (R) (Tabla 5). Mientras que el genotipo A1 en ambas condiciones experimentales, disminuyó únicamente su P_{\max} por Chl a con respecto al obtenido después de 1 h de estrés (Fig. 6C y 6D; Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros fotosintéticos de *Symbiodinium* expuesto a alta osmolaridad. Fotosíntesis máxima (P_{\max}) y respiración (R). Valores expresados en $\mu\text{mol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ cel}^{-5}$ y $\mu\text{mol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg Chl } a^{-1}$. Concentración celular $3 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$. $N = 3$. Se muestra la media \pm DE. Muestras de una semana de cultivo incubadas una hora (1 h) y una semana (1S) bajo alta osmolaridad. Datos analizados por ANOVA de 1-vía.

		A1		estadístico $\alpha=0.05$	B17		estadístico $\alpha=0.05$	
		CONTROL	ESTRÉS		CONTROL	ESTRÉS		
1h	$\mu\text{mol O}_2 \text{ s}^{-1} 10^5 \text{ cel}^{-1}$	P_{\max}	5.40E-6 $\pm 2.92\text{E-}7$	5.12E-6 $\pm 1.07\text{E-}6$	0.937783	2.83E-6 $\pm 4.56\text{E-}7$	2.41E-6 $\pm 2.47\text{E-}7$	0.838496
		R	1.59E-6 $\pm 1.29\text{E-}7$	1.32E-6 $\pm 8.22\text{E-}8$	0.793110	1.27E-6 $\pm 4.87\text{E-}7$	7.94E-7 $\pm 1.27\text{E-}7$	0.207280
		α	7.67E-8 $\pm 1.1547\text{E-}8$	6.33E-8 $\pm 5.77\text{E-}9$	0.344447	5.33E-8 $\pm 1.15\text{E-}8$	2.33E-8 $\pm 5.77\text{E-}9$	0.016227
	$\mu\text{mol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg Chl } a^{-1}$	P_{\max}	1.52E-4 $\pm 8.23\text{E-}6$	1.44E-4 $\pm 3.02\text{E-}5$	0.978566	2.17E-4 $\pm 3.5\text{E-}5$	1.85E-4 $\pm 1.9\text{E-}5$	0.457405
		R	4.47E-5 $\pm 3.64\text{E-}6$	3.71E-5 $\pm 2.32\text{E-}6$	0.983236	9.76647E-5 $\pm 3.74\text{E-}5$	6.10E-5 $\pm 9.74\text{E-}6$	0.176230
		α	2.00E-06 ± 0	2.00E-06 ± 0	1.000000	3.67E-6 $\pm 5.77\text{E-}7$	2E-6 ± 0	0.000659
1S	$\mu\text{mol O}_2 \text{ s}^{-1} 10^5 \text{ cel}^{-1}$	P_{\max}	4.46E-6 $\pm 2.45\text{E-}7$	2.56E-6 $\pm 2.4\text{E-}7$	0.000250	3.35E-6 $\pm 1.69\text{E-}7$	2.56E-6 $\pm 2.64\text{E-}7$	0.013649
		R	1.83E-6 $\pm 7.36\text{E-}7$	1.4E-6 $\pm 4.79\text{E-}7$	0.657404	3.72E-7 $\pm 2.4719\text{E-}8$	8.76E-7 $\pm 1.087\text{E-}7$	0.534401
		α	5.33E-8 $\pm 2.08\text{E-}8$	5.67E-8 $\pm 1.15\text{E-}8$	0.245282	3.00E-8 ± 0	3.00E-8 ± 0	1.000000
	$\mu\text{mol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg Chl } a^{-1}$	P_{\max}	4.19E-5 $\pm 8.68\text{E-}6$	3.66E-5 $\pm 4.43\text{E-}6$	0.976562	3.64E-4 $\pm 1.8\text{E-}5$	2.43E-4 $\pm 2.5\text{E-}5$	0.000279
		R	1.56E-5 $\pm 6.29\text{E-}6$	2.E-5 $\pm 6.8\text{E-}6$	0.869213	4.03E-5 $\pm 2.68\text{E-}6$	8.34E-5 $\pm 1.0\text{E-}5$	0.000515
		α	4.33E-7 $\pm 2.08\text{E-}7$	8E-7 $\pm 1.7\text{E-}7$	0.528490	3.00E-6 ± 0	2.67E-6 $\pm 5.77\text{E-}7$	0.598763

La concentración de clorofila a fue determinada en ambas cepas de *Symbiodinium* (Tabla 6). El genotipo A1 incrementó la concentración de Chl a después de una semana; la concentración de Chl a medida en condiciones control fue el doble que en condiciones de estrés ($p < 0.05$, Tabla 6); esta disminución en la concentración de Chl a en estrés sugiere que hubo a una foto-aclimatación (Fig. 7B). Mientras que en el genotipo B17 no se

encontraron cambios significativos entre las concentraciones de Chl *a* del control y el estrés de una semana ($p > 0.05$, Tabla 6).

Tabla 6. Concentración de clorofila *a* en los tratamientos. N = 3. Datos analizados por ANOVA de 1-vía. $\alpha = 0.05$. Se muestra la media \pm DE.

	A1			B17		
	CONTROL	ESTRÉS		CONTROL	ESTRÉS	
1 hora	2.48 \pm 0.21	2.48 \pm 0.21	1.000	0.91 \pm 0.62	0.91 \pm 0.62	1.000
1 semana	8.18 \pm 0.60	4.90 \pm 1.65	0.008	0.65 \pm 0.11	0.74 \pm 0.05	0.994
	0.000	0.032		0.506	0.651	

Los genotipos A1 y B17 en ambas condiciones experimentales presentaron cinéticas similares de recuperación en la eficiencia cuántica del PSII (Φ_{PSII}). Al inicio del experimento, Φ_{PSII} disminuyó dramáticamente al momento de encenderse la luz, y se recuperó después de varios minutos hasta alcanzar su estabilización (Fig. 7). Sin embargo, la recuperación de la eficiencia cuántica efectiva (Φ_{PSII} en condiciones de luz) en ambas cepas bajo estrés osmótico se redujo cerca de un 10 % con respecto a sus controles (Fig. 7A y 7C).

Después de una semana en condiciones de estrés, ambos genotipos incrementaron su eficiencia cuántica máxima (Φ_{PSII} después de una aclimatación en oscuridad) con respecto al control (Fig. 7B y 7D). El genotipo A1 presentó una mejor cinética de recuperación de Φ_{PSII} efectiva en condiciones de estrés (Fig. 7B), contrariamente, a lo observado en el genotipo B17 (Fig. 7D). Sin embargo, la recuperación final de Φ_{PSII} efectiva para ambas cepas después de una semana de estrés fue similar a la observada en el estrés inicial (Fig. 7A, 7B, 7C y 7D).

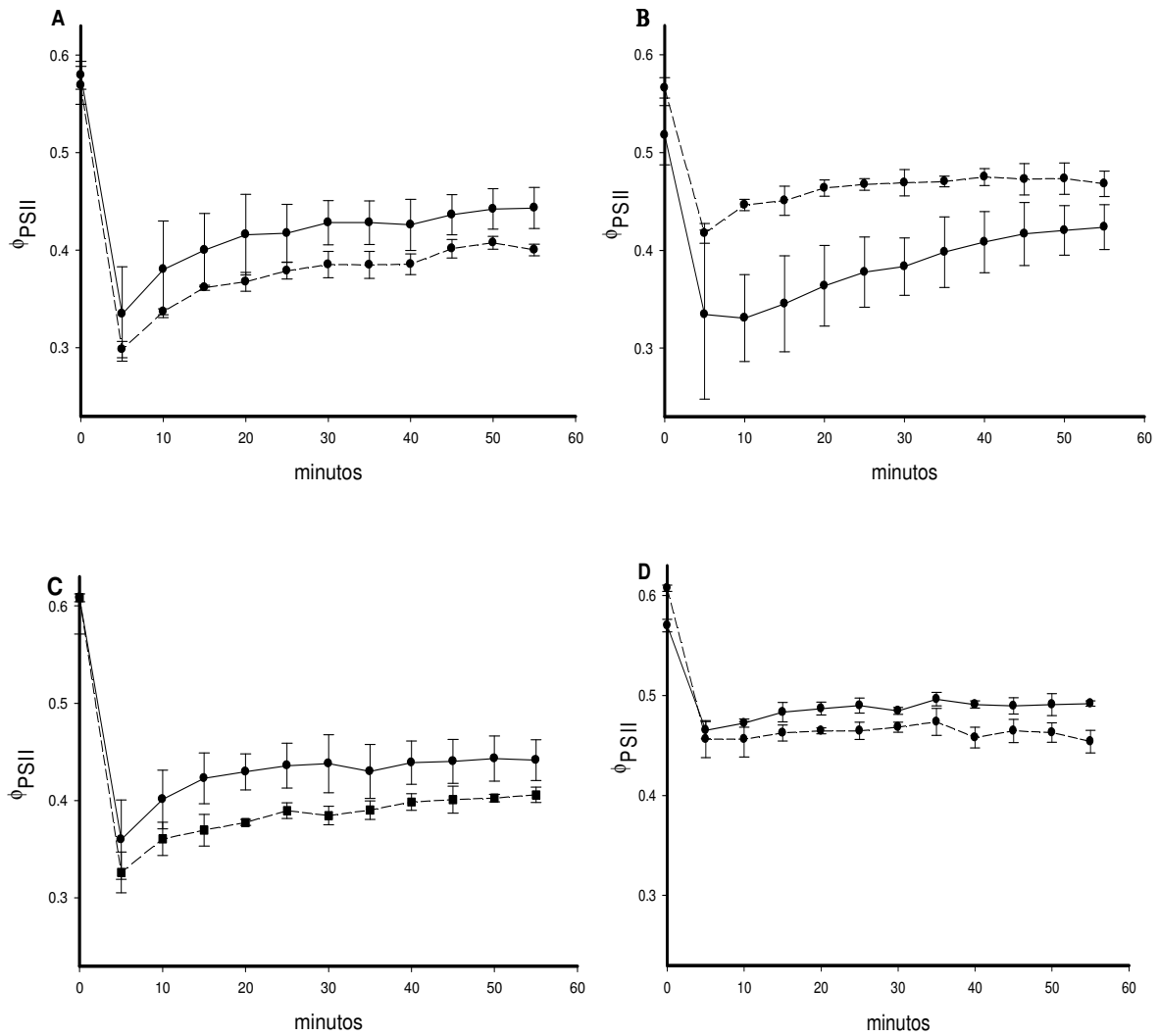


Figura 7. Eficiencia fotoquímica del PSII (Φ_{PSII}) en *Symbiodinium* bajo estrés osmótico (1075 mOsM kg⁻¹, PEG 9 %, línea puntuada) contra condiciones control (línea sólida) después de incubar una hora (A, A1 y C, B17) y una semana (B, A1 y D, B17). N=3. Se muestra la media \pm DE.

3. Expresión de genes relacionados con la síntesis de glicerol vía ciclo de Calvin-Benson en *Symbiodinium*

Mediante RT-PCR semi-cuantitativo se evaluó la expresión de los genes que codifican para las enzimas, Rubisco (*rcb*), gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa (*gapdh*), glicerol 3-fosfato dehidrogenasa (*gpd*) o *dhap-reductasa* y la 6-fosfogluconato dehidrogenasa (*6pg*) después de estresar osmóticamente (1075 mOsM kg⁻¹) a *Symbiodinium* durante 1 h (Fig. 8).

El análisis semi-cuantitativo de RT-PCR sugiere que los genes de *rcb* y *dhapr* se sobre-expresan en condiciones de estrés osmótico (Fig. 8). En el genotipo A1 en condiciones de estrés, se observó que los genes *rcb* y *dhapr* se expresaron 1.6 y 2.0 veces más con respecto al gen control *gapdh* (Fig. 8A), mientras que *6pg* mantiene su expresión relativa similar en ambas condiciones (Fig. 8A y 8B). Por otro lado, el cálculo de la actividad específica de la enzima DHAP-reductasa de este genotipo en condiciones de estrés, fue 2.4 veces mayor que su control (Tabla 7).

Sólo se muestran los resultados de los genes *rcb* y *dhapr* para el genotipo B17, ya que los demás genes no amplificaron con las condiciones de PCR establecidas. En este genotipo únicamente el gen *dhapr* incrementó su expresión en condiciones de estrés con respecto a su control, siendo un resultado no concluyente debido a que no se amplificó el gen control.

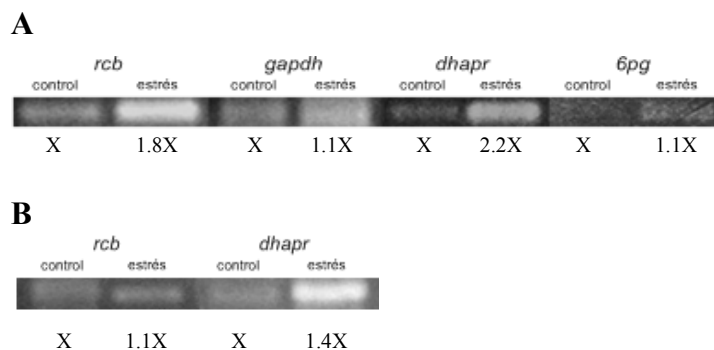


Figura 8. Expresión de genes asociados con la fijación de carbono y síntesis de glicerol en *Symbiodinium* bajo choque osmótico. RT-PCR de ARN extraído de cultivos expuestos a condiciones control y estrés osmótico durante una hora para los genotipos A1 (A) y B17 (B). Solo se muestran los resultados de los genes *rcb* y *dhapr* para el genotipo B17. Geles de agarosa al 1.5 % fueron escaneados y se cuantificó la intensidad relativa (X) de bandas con el programa ImageJ.

Tabla 7. Actividad catalítica específica de DHAPR (Z_c/m_s) de *Symbiodinium*. Las mediciones se realizaron en extracto crudo del genotipo A1 en condiciones de estrés hiper-osmótico y control después de una hora en condiciones de luz. N=3.

	Control	Alta osmolaridad*
Z_c/m_s	307.45 u g ⁻¹ ±123.5	725.4 u g ⁻¹ ±35.4

*9 % de PEG, 3350.

4. Crecimiento en *Symbiodinium*.

Para determinar el efecto de alta osmolaridad en la tasa de crecimiento (μ) de *Symbiodinium*, se realizaron curvas de crecimiento de los genotipos A1 y B17 en condiciones normales y bajo estrés osmótico durante 30 días (Fig. 9).

La tasa máxima de crecimiento en *Symbiodinium* disminuyó fuertemente en condiciones de alta osmolaridad. En el genotipo B17 se redujo 3 veces con respecto a su control, pasando de una $\mu = 0.435 \pm 0.041$ a una $\mu = 0.141 \pm 0.026$; mientras que en el genotipo A1 esta se redujo a la mitad, pasando de una $\mu = 0.498 \pm 0.029$ a una $\mu = 0.236 \pm 0.043$.

Ambos cultivos de *Symbiodinium* en condiciones control, llegaron a la fase estacionaria después del día 22 (Fig. 9A y 9B). Sin embargo, en condiciones de alta osmolaridad la población del genotipo A1 decrece con el tiempo, aparentemente sin alcanzar la fase estacionaria (Fig. 9A), contrario a lo observado en el genotipo B17 (Fig. 9B).

El genotipo B17 en condiciones de alta osmolaridad, triplicó el tiempo de división celular ($6.84 \text{ días}^{-1} \pm 1.3$) con respecto a las condiciones control ($2.26 \text{ días} \pm 0.62$). Del mismo modo, el genotipo A1 duplicó este tiempo ($2.98 \text{ días}^{-1} \pm 0.54$) en comparación a su control (1.39 ± 0.078).

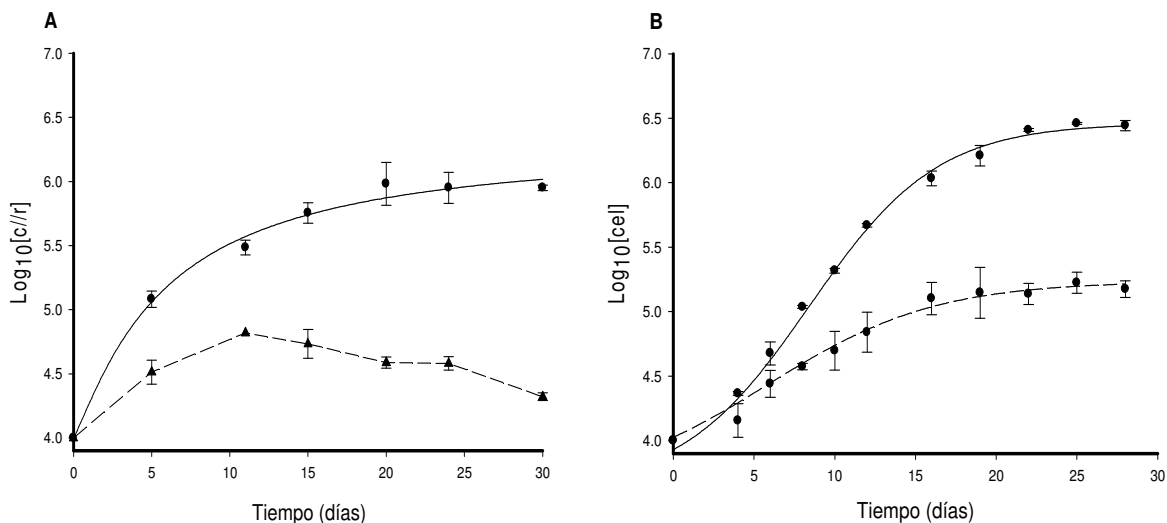


Figura 9. Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de *Symbiodinium*. Genotipos A1 (A) y B17 (B), crecidos en medio ASP-8A en condiciones normales de presión osmótica (852 mOsM kg⁻¹, línea sólida) y de estrés osmótico (1075 mOsM kg⁻¹, PEG 9 %, línea punteada). N = 3. Se muestra la media ± DE.

Ambos genotipos en estrés osmótico, disminuyeron la producción de glicerol a lo largo de los días de crecimiento (Fig. 10). La producción de glicerol después del décimo día en condiciones de estrés se mantuvo estable y sostenida, mostrando posiblemente una adaptación osmótica (Fig. 10). Los porcentajes de fotosíntesis invertidos en la producción de glicerol en el primer día de estrés para ambos genotipos, sugieren que están utilizando reservas energéticas como almidón, las cuales eventualmente disminuyen y la fotosíntesis empieza a sostener tal producción (Fig. 10).

Symbiodinium en pleno crecimiento redujo 3.6 veces su tasa máxima de crecimiento (μ) al ser expuesto a un choque osmótico de alta osmolaridad; μ pasó de 0.274 ± 0.030 antes del estrés a 0.076 ± 0.010 después del estrés. En estas condiciones de estrés, *Symbiodinium* tarda 9 ± 1.18 días en dividirse en vez de 0.5 ± 0.003 días que tardaría en condiciones control. Sin embargo esta reducción no fue letal, ya que al parecer *Symbiodinium* se mantiene en su última división celular (Fig. 11).

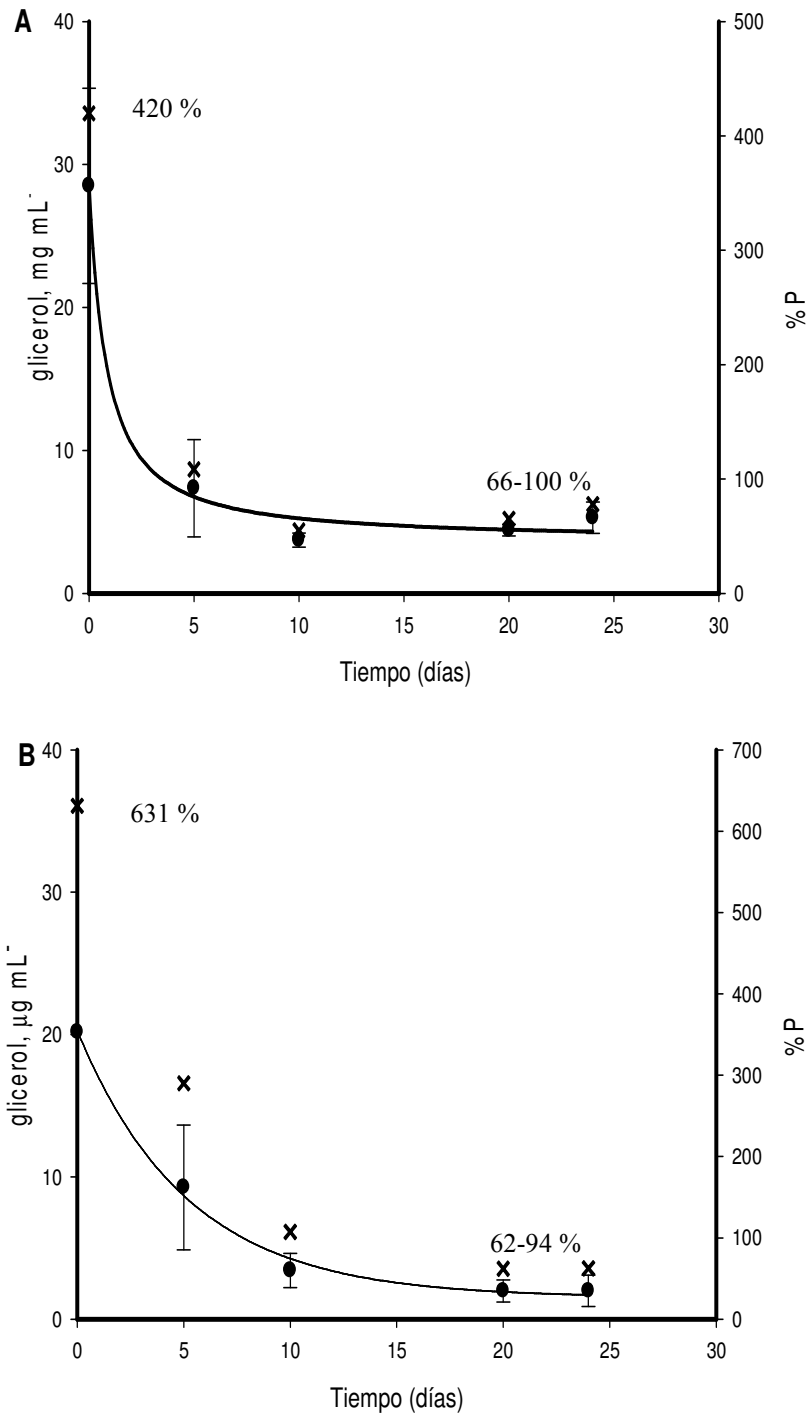


Figura 10. Efecto del estrés osmótico sobre la producción de glicerol durante el crecimiento de *Symbiodinium*. Genotipos A1 (A) y B17 (B), crecidos en medio ASP-8A en condiciones normales de presión osmótica (876 mOsM kg⁻¹, no detectable) y en estrés osmótico (~1075 mOsM kg⁻¹, PEG 9 %, línea sobre círculos negros). % P, porcentaje inferior de fotosíntesis utilizada en la producción de glicerol (X). % inferior calculado con estequiometría 1 O₂:1 Carbono fijado y % superior con estequiometría 1.66 O₂:1C. Normalizada a 1X10⁵ cel mL⁻¹. N = 3. Se muestra la media ± DE.

Las mediciones del diámetro celular promedio de ambas cepas de *Symbiodinium* después de 1 h del choque osmótico no cambiaron significativamente (A1, $t = 0.978$; $df = 100$; $p = 0.330$; B17, $t = 0.350$; $df = 100$; $p = 0.727$, Fig. 12 A). Este cambio se volvió significativo hasta la séptima semana bajo condiciones de estrés ($t = 6.201$; $df = 58$; $p < 0.001$, Fig. 12).

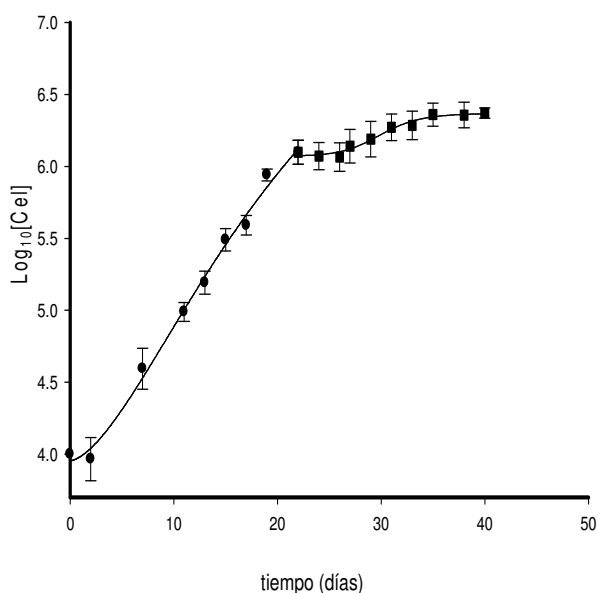


Figura 11. Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de *Symbiodinium* (genotipo B17) antes de haber alcanzado la fase estacionaria. Crecimiento en medio ASP-8A a condiciones normales de presión osmótica (852 mOsM kg^{-1}) y después del día 20 en condiciones de estrés osmótico ($1075 \text{ mOsM kg}^{-1}$, PEG 9 %). $N = 3$. Se muestra la media \pm DE

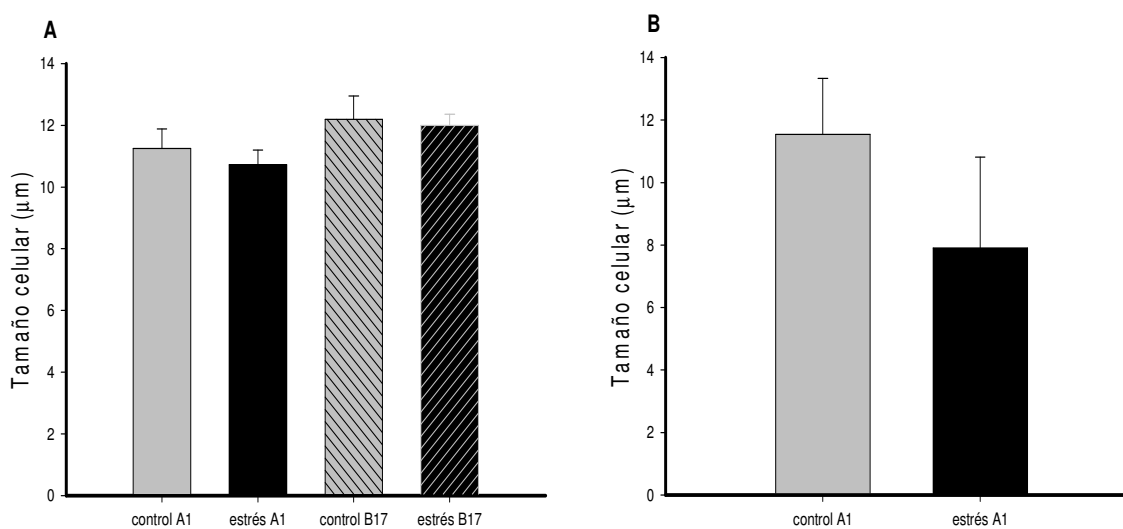


Figura 12. Cambio del tamaño celular de *Symbiodinium* (A) bajo 1 h ($N = 31 \pm \text{DE}$) y (B) 7 semanas ($N = 45 \pm \text{DE}$) de estrés osmótico ($1075 \text{ mOsM kg}^{-1}$, PEG 9 %). $N = 3$. Se muestra la media \pm DE

DISCUSIÓN

Symbiodinium puede encontrarse como un organismo de vida libre o establecer simbiosis con algunos invertebrados marinos (Venn *et al.*, 2008). Su crecimiento poblacional en vida libre y en cultivo depende principalmente de la disposición de nutrientes y de la luz. En cultivo este dinoflagelado crece exponencialmente y sigue un único ciclo celular, con condiciones de luz y oscuridad de 12 h:12 h, estando en fase G1/S en luz y en fase G2/M en oscuridad (Fig. 4, Stambler, 2011), mientras que en simbiosis su tasa de duplicación disminuye, similar a lo observado en condiciones de alta osmolaridad (Fig. 9, 11), permaneciendo virtualmente en G1 (Stambler, 2011), efecto inducido por el hospedero mediante una posible limitación de nutrientes (Rees, 1991; Falkowski *et al.*, 1993).

La tasa de crecimiento de *Symbiodinium* en condiciones *in vitro* disminuyó por efecto del estrés osmótico (Fig. 9 y 11); además, este estrés produjo que *Symbiodinium* tardara 9 días para dar paso a una nueva generación (Fig. 9) tal como sucede *in hospite* (Stambler, 2011). Es tal el control de la división celular del simbiote, que sólo se establece un dinoflagelado por simbiosoma (Trench, 1993), lo cual permite que esta relación simbiótica sea mutualista en vez de parásita (Trench, 1987; Baghdasarian y Muscatine, 2000). Estos resultados simulan el posible control de la división celular del dinoflagelado en simbiosis (Rees, 1991), el modulador en este caso, una limitación por carbono, pues aparentemente todo el carbono fijado y las reservas fueron empleados para producir glicerol (Fig. 10), el cual fue exportado hacia el exterior celular (Tabla 3).

La producción de glicerol fue estimulada por el aumento de la presión osmótica exterior, además, esta producción se mantuvo en el tiempo y durante el crecimiento del simbiote. Estos resultados son similares a los encontrados por Muscatine (1967), Muscatine *et al* (1972) y Trench (1971 a,b,c), de tal modo que la producción y transferencia de alimento desde el simbiote al hospedero podría ser continua y sostenida.

A pesar de que la alta osmolaridad estimula la producción de glicerol en *Symbiodinium*, se observó que el Na⁺ tuvo un efecto contrario (Fig. 5), lo que concuerda con los resultados de Seibt y Schlichter (2001), quienes demostraron que el aumento del sodio afecta

negativamente la fijación de carbono en *Symbiodinium*. De igual manera Goiran y colaboradores (1997) demostraron que el Na^+ se transporta activamente a través de la membrana de *Symbiodinium* al cambiar el ambiente iónico (Na^+ y K^+) hasta establecer su homeostasis. En este contexto, los resultados obtenidos llevan a suponer que en términos de la producción de glicerol, el efecto tóxico del sodio resulta más importante que su efecto osmótico.

El glicerol es un osmolito que se emplea para regular cambios de osmolaridad en algas como *Chlorella autotrophica* (Ahmad y Hellebust, 1984) y algas verdes del género *Dunaliella*, en la cual se ha estudiado ampliamente su inducción en el proceso de osmoregulación (Vegmann, 1971; Avron, 1986; Belmans y Laere, 1987; Chitlaru y Pick, 1991; Liska *et al.*, 2004). El glicerol también es empleado como osmolito en los flagelados *Chlamydomonas* (Ahmad y Hellebust, 1986; Husic y Tolbert, 1986) y en algunos alveolados patógenos (filogenéticamente cercanos a los dinoflagelados). Estos alveolados podrían estar utilizando el glicerol para resistir cambios de presión osmótica en sus diferentes estadios de infección (Promeneur *et al.*, 2006), de manera similar a los resultados obtenidos en *Symbiodinium* bajo condiciones de alta osmolaridad y a lo que podría estar pasando en simbiosis.

Si no existiera regulación de la presión osmótica, se esperaría que el volumen celular cambiara por efecto del aumento de la presión osmótica exterior; sin embargo, el diámetro de *Symbiodinium* no cambió después de 1 h en alta osmolaridad (Fig. 12A), debido a que el simbiote pudo utilizar vacuolas para ayudar a mantener su turgencia celular (Franklin *et al.*, 2004), o simplemente la rigidez de su pared celular mantuvo su forma (Blank, 1987), ocultando los cambios en el tamaño celular. Estos cambios, también dependen del tiempo de exposición al estrés y la severidad de este (Mayfield y Gates, 2007); por tal razón la disminución del diámetro de *Symbiodinium* solo se apreció después de 7 semanas bajo estrés osmótico, a pesar de que el gradiente que se estableció experimentalmente fue de 1.26 veces más que en condiciones control (Fig. 12).

La fotosíntesis en *Symbiodinium* es un proceso fundamental para mantener la simbiosis con el cnidario, por lo tanto no debe ser afectada negativamente. Las curvas de fotosíntesis-irradiancia mostraron que la fotosíntesis máxima, la respiración y la eficiencia fotosintética (α) en *Symbiodinium* permanecieron similares, tanto en condiciones de estrés como en condiciones control a pesar del aumento en la producción de glicerol. Estos resultados fueron diferentes a los hallados en el alga halotolerante *Dunaliella*, cuya fotosíntesis máxima y respiración aumentan junto con la producción de glicerol bajo condiciones de alta osmolaridad (Liska, 2004). Sin embargo, se ha observado que organismos osmoreguladores fotosintetizadores expuestos a ambientes hiper-osmóticos, disminuyen su fijación de carbono sin dejar de acumular glicerol (Husic y Tolbert, 1986; Ahmad y Hellebust, 1984 y 1986). Por otro lado, Trench (1971c) demostró que *Symbiodinium* incubado con homogenizado de cnidario puede fijar cerca de 10 veces más carbono que en agua de mar, mientras que los resultados de Grant *et al.* (2001, 2004, 2006) muestran que en simbiontes recién aislados bajo el efecto del “factor hospedero”, la fijación de carbono y la producción de glicerol permanecen igual e inclusive menores a las observadas en condiciones control.

La reducción de la eficiencia cuántica efectiva de PSII (Φ_{PSII}) en *Symbiodinium* por el choque hiper-osmótico, posiblemente se deba a que el simbiote perciba este cambio de osmolaridad como un aumento en la intensidad de luz, lo cual aparentemente sucede cuando disminuye la reducción de nitrato (Rodríguez-Román e Iglesias-Prieto, 2005). La energía no utilizada en la reducción de nitrato (cerca de 1/3 de la fotosíntesis máxima) genera presión sobre el fotosistema II, lo cual induce al simbiote a foto-aclimatarse mediante el aumento de la expresión de Rubisco, para hacer más eficiente la utilización de la energía fotoquímica en la fijación de carbono. Este cambio pudo ser remplazado por una posible modificación de la antena de PSII, como lo muestran los resultados del cambio en la concentración de Chl *a* y el aumento de la eficiencia cuántica después de una semana. Además, la alta osmolaridad indujo el aumento en la expresión relativa y la actividad específica (2.4 veces más que en condiciones control) de la enzima DHAPR.

El aumento de la expresión génica relativa de Rubisco y DHAPR, y el incremento de la actividad enzimática específica de esta última producto del estímulo de alta osmolaridad, junto con el porcentaje de fotosíntesis invertido en la producción de glicerol (hasta el 100 % y el 94 % de la fotosíntesis, en los genotipos A1 y B17 respectivamente. Fig. 10), sugieren que la fijación de carbono se dirige hacia la síntesis de glicerol, simulando de esta manera *in vitro* lo que podría estar sucediendo en simbiosis.

Las diferencias encontradas entre los dos genotipos de *Symbiodinium* bajo el tratamiento de alta osmolaridad, tanto en la producción de glicerol como en los procesos fisiológicos, fue debido a la gran diversidad genotípica y fisiológica de este género de microalgas (Coffroth y Santos 2005; Iglesias-Prieto y Trench, 1997a, 1997b; Iglesias-Prieto *et al.*, 2004).

Los resultados de exposición al estrés osmótico sugieren que posiblemente en simbiosis el cnidario “engaña” al simbiote de esta manera, activando la vía de síntesis y “translocación” de glicerol. Este estrés por alta osmolaridad puede ser provocado por tres posibles vías. Primero, que sea un cóctel de sustancias que el hospedero concentre en el espacio virtual de la membrana del simbiosoma y la pared celular del simbiote. Este caso sería muy poco probable, ya que representaría un gasto neto de energía controlar continuamente este gradiente osmótico para mantener la máxima producción de glicerol en *Symbiodinium*.

La segunda vía sería que este “estrés” proviniera de la misma osmolaridad interior de los cnidarios (osmo-conformadores, 1000 mOsm) la cual podría ser 2.5 veces mayor a la osmolaridad que pueda tener el dinoflagelado asumiendo que es osmo-regulador (400 mOsm, Yancey, 2005; Hagedorn *et al.*, 2010, Yancey *et al.*, 2010; Goiran *et al.*, 1997) generando de esta manera un gradiente de presión osmótica, al cual *Symbiodinium* debería reaccionar presumiblemente produciendo glicerol. Sin embargo, esta presión es similar a la cual el simbiote se encuentra en vida libre en agua marina (1000 mOsm, Yancey, 2005); por lo tanto se necesitaría una presión osmótica mayor para incrementar la síntesis de glicerol, como lo indican los resultados. Si se diera alguna (o ambas) de las situaciones anteriores en la simbiosis alga-cnidario, de existir dicho gradiente osmótico, tendría que ser

modificado constantemente, ya que de permanecer estable sería resuelto por el alga sintetizando osmolitos diferentes al glicerol (Hagedorn *et al.*, 2010, Yancey *et al.*, 2010).

La tercera opción es la más probable. En términos de una simbiosis mutualista, el cnidario puede estar activando una vía de transducción de señales a través de receptores de presión (Sayeed y Baenziger, 2009; Saito y Tatebayashi, 2004), induciendo al simbiote a producir glicerol, el cual sería translocado hacia el animal posiblemente mediante acuagliceroporinas (Pavlovic-Djuranovic *et al.*, 2003; Promeneur *et al.*, 2006) y de esta forma cubrir hasta el 95 % del requerimiento de energético basal del cnidario (Falkowski *et al.*, 1993).

El mecanismo de inducción de producción de glicerol en simbiosis por *Symbiodinium* podría estar mediado por receptores regulados corriente abajo. Estos receptores podrían ser del tipo de dos componentes (como los de la ruta HOG “high osmolarity glicerol”, Saito y Tatebayashi, 2004), ya que la mayor producción de glicerol se da en las primeras horas de exposición al estrés osmótico o al homogenizado de tejido de cnidario (Trench, 1971c), hasta alcanzar después de varios días un estado estacionario de producción (Fig. 10), o la aparente osmo-adaptación. Sin embargo, los resultados sugieren que de no alcanzar un nuevo equilibrio osmótico, *Symbiodinium* tendría que invertir toda la fotosíntesis en la producción de glicerol.

Este mecanismo podría explicar el efecto del controvertido factor de liberación (HRF) caracterizado y estudiado hasta ahora (Battey y Patton, 1987; Gates *et al.*, 1995; Cook y Davy, 2001; Grant *et al.*, 2003 y 2004; Goiran *et al.*, 1997; Wang y Douglas, 1997; Seibt y Schlichter, 2001), ya que se encontró que los mayores osmolitos en *Symbiodinium* y en corales no corresponden a la mezcla de aminoácidos denominada “factor hospedero” (Hagedorn *et al.*, 2010, Yancey *et al.*, 2010).

El mecanismo que podría estarse dando *in hospite* se resume en la Figura 13. El simbiote se encuentra en el simbiosoma del huésped, donde el cnidario estimula los receptores de presión del dinoflagelado en condiciones de luz, provocando que el simbiote sienta la necesidad de protegerse de un estrés hídrico. Esta situación genera un incremento en la

presión del PSII, que se traduce como una mayor intensidad lumínica posiblemente disminuyendo la reducción de nitrato, llevando al simbionte a foto-aclimatarse por la inducción de la síntesis de enzimas involucradas en la fijación de carbono y la síntesis de glicerol. Cuando los “sumideros” de energía fotoquímica se saturan, esta energía podría ser disipada no foto-químicamente (NPQ).

Ya dirigida la fijación de carbono hacia la producción de glicerol, este es translocado hacia el cnidario (Trench, 1971a, b, c) donde es consumido, estimulando de esta manera en el simbionte la necesidad de seguir produciendo glicerol (Fig.13). Esta redirección del flujo de carbono junto con otras posibles vías hacia la síntesis de glicerol y una disminución en la fijación de nitrato, hacen que el simbionte disminuya su tasa de duplicación, debido probablemente a la falta de energía química, a la acumulación excesiva de NADH (Ansell *et al.*, 1997) y a la disminución en la síntesis de proteínas y de lípidos (Berg *et al.* 2008). Sin embargo, Grant *et al.*, (1997 y 1998) demostraron que no se reduce la concentración de triglicéridos en las algas expuestas a homogeneizado de coral, sino que aparentemente se detiene su síntesis, al menos durante las 4 horas de observación posteriores a la exposición de las algas al homogeneizado. De este modo se podría sugerir que la población de *Symbiodinium* en el hospedero está limitada por carbono.

En esta investigación se demuestra por primera vez que la producción del glicerol en *Symbiodinium* se puede estimular mediante el aumento de la presión osmótica exterior, producto de la activación de un mecanismo rápido para contrarrestar la pérdida de agua intracelular y alternativamente podría estar funcionando un mecanismo molecular que induce a posibles osmosensores (Saito y Tatebayashi, 2004). En términos de la relación simbiótica *Symbiodinium*-cnidarios, esta respuesta presenta una ventaja evolutiva que el hospedero aprovecha para obtener alimento y controlar las poblaciones del simbionte sin afectar su desempeño fotosintético, dando como resultado una relación simbiótica mutualista (Trench, 1987; Stambler, 2011). Por lo tanto, se propone como hipótesis que en simbiosis el flujo de carbono es desviado hacia la síntesis de glicerol, lo cual lleva a reducir la división celular del simbionte.

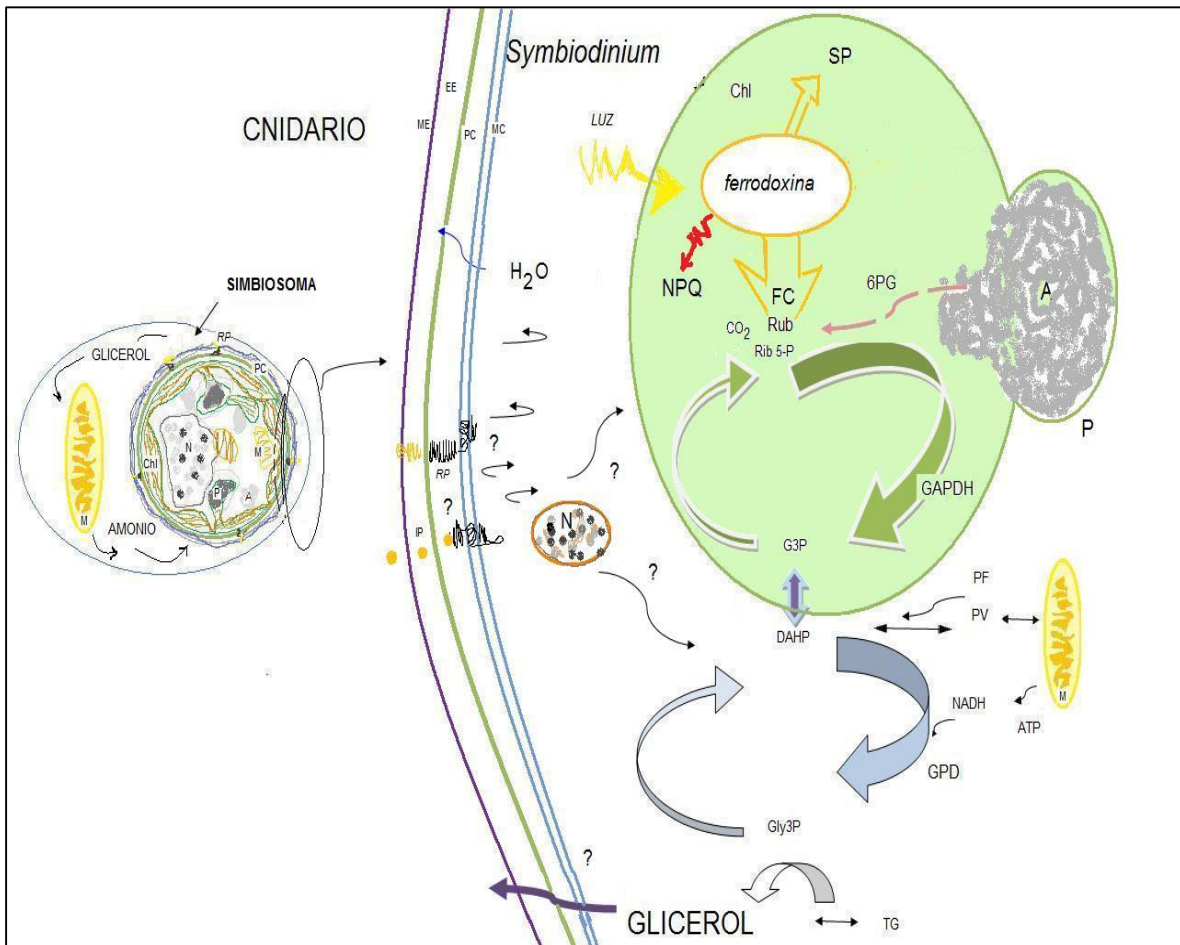


Figura 13. Hipótesis del posible mecanismo de inducción de la producción de glicerol en *Symbiodinium*. El cnidario engaña a *Symbiodinium* con un supuesto cambio de presión osmótica (hiper-osmótico) estimulando (IP, inductores de presión) receptores de presión (RP) en la membrana celular (MC) del simbiote. Esto activa una cascada de señalización que a su vez el simbiote traduce como un incremento de luz, induciendo la síntesis de enzimas para la utilización de esta energía lumínica en la fijación de carbono y la síntesis de glicerol, a fin de incrementar la presión osmótica interna. La síntesis de glicerol es constante (aumenta por la degradación de almidón (A), vía pentosas fosfatos (PF) y piruvato (PV) ya que es translocado hacia el cnidario. El desvío del carbono fijado hacia glicerol podría estar compitiendo con la síntesis de triglicéridos (TG). Chl, cloroplasto; M, mitocondria; N, núcleo; P, pirenoides; PC, pared celular; SP, síntesis de proteínas; NPQ, non-photochemical quenching; ME, membrana del simbiosoma; EE, espacio del simbiosoma; FC, fijación de carbono (incluye regulación por tiorredoxina); 6PG, 6-fosfogluconato; Rib 5-P; ribulosa 5-fosfato; GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa; G3P, gliceraldehído 3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GPD, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; Gly 3-P, glicerol 3-fosfato. Mayores detalles en el texto.

De igual modo, se propone la DAPHR como un posible marcador molecular para estudiar la activación de la producción de glicerol en la simbiosis alga-cnidario, ya que medir el glicerol en el holobionte ha sido complicado. Además, en investigaciones futuras se podría estudiar el posible mecanismo de “alta osmolaridad” que induce la síntesis de glicerol en *Symbiodinium* en simbiosis, la caracterización del posible receptor y/o vía de transducción de señales que desencadena esta respuesta, así como los posibles transportadores de glicerol en el simbionte y el cnidario, lo cual permitirá explicar parte de la dependencia metabólica que hace posible la existencia de esta relación simbiótica.

CONCLUSIONES

- La producción de glicerol en *Symbiodinium* puede ser estimulada por el aumento de la osmolaridad exterior, siendo un proceso sostenido en el tiempo.
- La alta osmolaridad reduce el crecimiento poblacional del simbiote.
- El Na⁺ afecta negativamente la producción de glicerol en *Symbiodinium*.
- La osmolaridad elevada no afecta la fotosíntesis en *Symbiodinium* sino hasta después de una semana en estrés.
- El estrés osmótico es percibido como un aumento de luz por *Symbiodinium*, generando presión sobre el PSII, provocando una aparentemente foto-adaptación al incrementar la expresión de Rubisco.
- El choque osmótico incrementa la expresión y la actividad específica de DHAP-reductasa de *Symbiodinium*.
- El glicerol producido en *Symbiodinium* puede ser medido en el medio extracelular.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I. y Hellbust, J. A. 1984. Osmoregulation in the extremely euryhaline marine micro-alga *Chlorella autotrophica*. *Plant Physiol.* **74**, 1010-1015.
- Ahmad, I. y Hellbust, J. A. 1986. Osmoregulatory responses of the euryhaline flagellate *Chlamydomonas pulsatilla* wollenweber. *Plant Physiol.* **82**, 406-410.
- Ahmadjian, V. y Paracer, S. 1986. Symbiosis: An introduction to biological associations. University Press of New England, Trustees of Clark University. Capítulo **1**, pp. 1-12.
- Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., Furla, P., Houlbrèque, F., Puvarel, S., Reynaud, S., Tambutté, E., Tambutté, S. y Zoccola, D. 2004. Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control. *C. R. PALEVOL.* **3**: 453-467.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J. M. y Adler, L. 1997. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.* **16**, 2179-2187.
- Avron, M. 1986. The osmotic components of halotolerant algae. *Trends Biochem. Sci.* **11**, 5-6.
- Baghdasarian, G. y Muscatine, L. 2000. Preferential expulsion of dividing algal cells as a mechanism for regulating algal-cnidarian symbiosis. *Biol Bull.* **199**, 278-286.
- Barnes, R. D. 1974. Invertebrate zoology. W. B. Saunders Company. 3th ed. **5**, 89-136.
- Batley, J. F. y Patton, J. S. 1987. Glycerol translocation in *Condylactis gigantea*. *Mar Biol.* **95**, 37-46.
- Begon, M., Townsend, C. R. y Harper, J. L. 2006. Ecology: from individuals to ecosystems. 4th ed. Blackwell Publishing. Capítulo **13**, pp. 395-396.
- Belmans, D. y Laere, V. 1987. Glycerol cycle enzymes and intermediates during adaption of *Dunaliella teriolecta* cells to hyperosmotic stress. *Plant Cell Environ.* **10**: 185-190
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. 2008. Bioquímica. REVERTÉ. 6ta ed. Capítulo **19-20**.
- Bergmeyer, J. y Graßl, M. 1983. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd ed. VCH. **Vol III**. 1987. Appendix.
- Bilger, W. Björkman, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* **25**:173-185
- Blank, R. J. 1987. Cell architecture of the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. inhabiting the Hawaiian stony coral *Montipora verrucosa*. *Mar Biol.* **94**, 143-155.
- Cesar, H. L., Burke, y L. Pet-Soede. 2003. The Economics of Worldwide Coral Reef Degradation. 3rd ed. Cesar Environmental Economics Consulting, Arnhem.
- Chitlaru, E. y Pick, U. 1991. Regulation of glycerol synthesis in response to osmotic changes in *Dunaliella*. *Plant physiol.* **96**, 50-60.
- Coffroth, M. A. y Santos, S. R. 2005. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist.* **156**, 19-34.
- Colombo-Pallotta, M. F., Rodríguez-Román, A. e Iglesias-Prieto, R. 2010. Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. *Coral Reefs*.

- Cook, C. B. y Davy, S. K. 2001. Are free amino acids responsible for the ‘host factor’ effects on symbiotic zooxanthellae in extracts of host tissue? *Hydrobiologia*. **461**, 71-78.
- Davy, S. K. y Cook, C. B. 2001. The relationship between nutritional status and carbon flux in the zooxanthellae sea anemone *Aiptasia pallida*. *Mar Biol.* **139**, 999-1005.
- Enríquez, S., Méndez, E. R. e Iglesias-Prieto, R. 2005. Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol. Oceanogr.* **50(4)**, 1025–1032.
- Falkowski, P. G. y Raven, J. A. 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell Science. **5**
- Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L. y McCloskey, L. 1993. Population control in symbiotic corals. Ammonium ions and organic materials maintain the density of zooxanthellae. *Bio-Science*. **43**, 606–611.
- Franklin, D. J., Hoegh-Guldberg, P., Jones, R. J. y Berges, J. A. 2004. Cell death and degeneration in the symbiotic dinoflagellates of the coral *Stylophora pistillata* during bleaching. *Mar Ecol Prog Ser.* **272**, 117–130.
- Gates, R., Hill, K. Y. y Muscatine, L. 1999. The influence of anthozoan ‘host factor’ on the physiology of a symbiotic dinoflagellate. *J Exper Mar Biol Ecol.* **232**, 241-259.
- Gates, R., Hoegh-Guldberg, O., McFall-Nga, M. J., Bil, K. Y. y Muscatine, L. 1995. Free amino acids exhibit anthozoan “host factor” activity: They induce the release of photosynthate from symbiotic dinoflagellates *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 7430-7434.
- Ghoshal, D., Mach, D., Agarwal, M., Goyal, A. y Goyal, A. 2002. Osmoregulatory isoform of dihydroxyacetone phosphate reductase from *Dunaliella tertiolecta*: Purification and Characterization. *Protein Expres Purif.* **24**, 404–411.
- Goiran, C., Allemand, D. y Galgani, I. 1997. Transient Na⁺ stress in symbiotic dinoflagellates alter isolation from coral-host cells and subsequent immersion in seawater. *Mar Biol.* **129**, 581-589.
- Grant, A. J., Rémond, M., Starke-Peterkovic, T. y Hinde, R. 2006. A cell signal from the coral *Plesiastrea versipora* reduces starch synthesis in its symbiotic alga, *Symbiodinium* sp. *Compar Biochem Physiol A.* **144**, 458-463.
- Grant, A. J., Rémond, M., Withers, K. J. T. y Hinde, R. 2001. Inhibition of algal photosynthesis by a symbiotic coral. *Hydrobiologia.* **461**, 63–69.
- Grant, A. J., Starke-Peterovic, T., Withers, K. J. T. y Hinde, R. 2004. Aposymbiotic *Plesiastrea verispora* continues to produce cell-signaling molecules that regulate the carbon metabolism of symbiotic algae. *Compar Biochem Physiol A.* **138**, 253-259.
- Grant, A. J., Trautman, D. A., Frankland, S. y Hinde, R. 2003. A symbiosome membrane is not required for the actions of two host signalling compounds regulating photosynthesis in symbiotic algae isolated from cnidarians. *CBP A.* **135**, 337–345.
- Grant, A. J., Trautman, D.A., Frankland, S., Menz, I. y Hinde, R. 2006. Separation of two cell signalling molecules from a symbiotic sponge that modify algal carbon metabolism. *BBRC.* **348**, 92–98.
- Hagedorn, M., Carter, V. L., Ly, S., Andrell R. M., Yancey, P. H., Heppenstall, M., Jo-Ann, C., Leong, J. y CKleinhans F. W. 2010. Analysis of internal osmolality in developing coral larvae, *Fungia scutaria*. *PBZ.* **83(1)**, 157–166.
- Husic, H. D., y Tolbert, N. E. 1986. Effect of osmotic stress on carbon metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* accumulation of glycerol as an osmoregulatory solute. *Plant Physiol.* **8**, 594-596.

- Iglesias-Prieto R, 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. 1997a. Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Responses of chlorophyll protein complexes to different light regimes. *Mar. Biol.* **130**, 23–33.
- Iglesias-Prieto, R. y Trench, R. K. 1997b. Photoadaptation, photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses. *In 8th. Coral Reef Sym.* **2**, 1319-1324.
- Iglesias-Prieto, R., Beltrán, V. H., LaJeunesse, T. C., Reyes-Bonilla, H. y Thomé, P. E. 2004. Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proc. R. Soc. Lond.* **271**, 1757–1763.
- Jassby, A. D. y Platt, T. 1976. Mathematical Formulation of the Relationship Between Photosynthesis and Light for Phytoplankton. *Limnol Oceanogr.* **4**, 540-547.
- Jeffrey, S. W. y Humphery, G. F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 y c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol* **167**, 191-194.
- LaJeunesse, T. C. 2001. Investigating the biodiversity, ecology and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region: in search of a “species” level marker. *J Phycol.* **37**, 866–880.
- LaJeunesse, T. C., Loh, W. K. W., van Woesik, R., Hoegh-Guldberg, O., Schmidt, G. W. y Fitt, W. K. 2003. Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those of the Caribbean. *Limnol. Oceanogr.* **48**, 2046–2054.
- Liska, A. J., Pick, A. S. U. y Katz, A. 2004. Enhanced photosynthesis and redox energy production contribute to salinity tolerance in *Dunaliella* as revealed by homology-based proteomics. *Plant Physiol.* **136**, 2806–2817.
- Lombardo Cifuentes, Luis. 2011. Mecanismos de disipación no fotoquímica en dinoflagelados simbioses de la anémona *Anthopleura elegantissima*. Tesis de Maestro. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Markell, D. A. y Wood-Charlson, E. M. 2010. Immunocytochemical evidence that symbiotic algae secrete potential recognition signal molecules *in hospite*. *Mar Biol.* **157**, 1105-1111.
- Maxwell, K. y Johnson, G. N. 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *JXB.* **345**, 659-668.
- Mayfield, A. B. y Gates, R. D. 2007. Osmoregulation in anthozoan–dinoflagellate symbiosis. *CBP, Part A.* **147**, 1–10.
- Morse, D., Salois, P., Markovic, P., J. y Hastings, W. 1995. A nuclear-encoded form II RuBisCO in dinoflagellates. *Science.* **268**, 1622-1624.
- Muller-Parker, G., Cook, C. B. y D’Elia, C. F. 1990. Feeding affects phosphate fluxes in the symbiotic anemone *Aiptasia pallida*. *MEPS.* **60**, 283-290.
- Muscantine, L. 1967. Glycerol excretion by symbiotic algae from corals and Tridacna and its control by the host. *Science.* **156**, 516-519.
- Muscantine, L. y Porter J. W. 1977. Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bio. Sci.* **27**, 454-460.
- Muscantine, L., Falkowski, P.G., Porter, J. W. y Dubinsky, Z. 1984. Fate of photosynthetic fixed carbon in light-and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **222**, 181–202.

- Muscatine, L., McCloskey, L. R. y Marian, R. E. 1981. Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol Oceanogr.* **26**, 601-611.
- Muscatine, L., Pool, R. R., Cernichiari, E. 1972. Some factors influencing selective release of soluble organic material by zooxanthellae from reef corals. *Mar Biol.* **13**, 298-308.
- Nelson, D. L. y Cox, M. M. 2004. Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman Publisher. 4th. Capítulo **1**, 56-59; **19**; **20**.
- Nybakken, J. W. 1993. Marine Biology. An ecological approach. 3rd ed. Harper Collins. Capítulo **2**, pp. 38-41.
- Pavlovic-Djuranovic, S., Schultz, J. E. y Beitz, E. 2003. A single aquaporin gene encodes a water/glycerol/urea facilitator in *Toxoplasma gondii* with similarity to plant tonoplast intrinsic proteins. *FEBS.* **555**, 500-504.
- Pawlowski, J., Holzmann, M., Fahrni, J.F., Pochon, X. y Lee, J.J. 2001. Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid Foraminifera: 2 dinoflagellates. *J. Euk. Microbiol.* **48**, 368-373.
- Pearse, V., B. y Muscatine, L. 1971. Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. *Biol. Bull.* **141**, 350-363.
- Pochon, X. y Gates, R. D. 2010. A new Symbiodinium clade (*Dinophyceae*) from soritid foraminifera in Hawai'i. *MPE.* **56**, 492-497.
- Pomeroy, L. R. y Kuenzler, E. J. 1969. Phosphorus turnover coral reef animals. In Nelson, D. J. y Evans, E. C. (Eds.) *Symposium on Radioecology*. Nat. Tech. Info. Serv., Springfield, pp. 474-482.
- Promeneur, D., Liu, Y., Maciel, J., Agre, P., King, L. S., y Kumar, N. 2006. Aquaglyceroporin PbAQP during intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *PNAS.* **7 (104)**, 2211-2216.
- Rees, T. A. V. 1991. Are symbiotic algae nutrient deficient? *Proc.R. Soc. Lond. B.* **243**, 227-233.
- Rodríguez-Román, A. e Iglesias-Prieto, R. 2005. Regulation of photochemical activity in cultured symbiotic dinoflagellates under nitrate limitation and deprivation. *Mar Biol.* **146**, 1063-1073.
- Rosic, N. N. y Hoegh-Guldber, O. 2010. A method for extracting high-quality RNA from *Symbiodinium* sp. *J Appl Phycol.* **22**, 139-146.
- Saito, H. y Tatebayashi, K. 2004. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem.* **136**, 267-272.
- Sayeed, W. M. H. y Baenziger, J. E. 2009. Structural characterization of the osmosensor ProP. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1788**, 1108-1115.
- Seibt, C. y Schlichter, D. 2001. Compatible intracellular ion composition of the host improves carbon assimilation by Zooxanthellae in mutualistic symbioses. *Naturwissenschaften.* **88**, 382-386.
- Somero, G. N. y Yancey, P. H. 1997. Osmolytes and cell volume regulation: physiological and evolutionary principles. Danzler, W. (ed). *Handbook of Physiology, Section 14, Cell Physiology*, vol. II. Oxford, New York, 1445-1477.
- Stambler, N. 2011. Zooxanthellae: The yellow symbionts inside animals . in: Coral reefs: An ecosystem in transition. Dubinsky, Z. y Stambler, N. (eds). *Springer Science.* 87-101.

- Stat, M., Carter, D. y 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.
- Takishita, K., Ishidab, K. y Maruyamaa, T. 2003. An Enigmatic GAPDH Gene in the Symbiotic Dinoflagellate Genus *Symbiodinium* and its Related Species (the Order Suessiales): Possible Lateral Gene Transfer between Two Eukaryotic Algae, Dinoflagellate and Euglenophyte. *Protist.* **154**, 443–454.
- Thrall, P. H., Hochberg, M. E., Burdon, J. J. y Bever, J. D. 2006. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *TRENDS in Ecology and Evolution* **22**, 120-126.
- Trench, R. K. 1971a. The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. I. The assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by two marine coelenterates. *Proc R Soc Lond B.* **177**, 225-236.
- Trench, R. K. 1971b. The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. II. Liberation of ¹⁴C by zooxanthellae *in vitro*. *Proc R Soc Lond B.* **177**, 237-250.
- Trench, R. K. 1971c. The physiology and biochemistry of zooxanthellae symbiotic with marine coelenterates. III. The effect of homogenates of host tissues on the excretion of photosynthetic products *in vitro* by zooxanthellae from two marine coelenterates. *Proc R Soc Lond B.* **177**, 251-264.
- Trench, R. K. 1987. Dinoflagellates in non-parasitic symbiosis. In: F.J.R. T (ed) *The Biology of Dinoflagellates*. Botanical Monographs. Vol 21, chapter 12. Blackwell Scientific, Oxford, 531–571.
- Trench, R. K. 1993. Microalgal-invertebrate symbioses – a review. *Endocytobiosis Cell. Res.* **9**:135–175.
- Trench, R., K. 1979. The cell biology of plant–animal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **30**, 485–531.
- Vegmann, K. 1971. Osmotic regulation of photosynthetic glycerol production. *Biochim. Biophys. Acta.* **234**, 317-323.
- Venn, A. A., Loram, J. E. y Douglas A. E. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *J. Exp. Bot.* **59**, 1069–1080.
- Veron, J. E. N. 2000. Corals of the World. AIMS. Structure .Vol **1**, 42-55.
- Wang, J. T. y Douglas, A. E. 1997. Nutrient, signals, and photosynthate release by symbiotic algae. *Plant Physiol.* **114**, 631-636.
- Withers, K. J. T., Grant, A. J. y Hinde, R. 1998. Effects of free amino acids on the isolated symbiotic algae of the coral *Plesiastrea versipora* (Lamarck): absence of a host release factor response. *Compar Biochem Physiol A.* **120**, 599-607.
- Yancey, P. H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. Commentary. *JXB.* **208**, 2819-2830.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. y Somero, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**, 1214-1222.
- Yancey, P. H., Heppenstall M. L. S., Andrell, R. M., Gates, R. D., Carter, V. L. y Hagedorn, M. 2010. Betaines and dimethylsulfoniopropionate as major osmolytes in cnidaria with endosymbiotic dinoflagellates. *Physiol Biochem Zool.* **83(1)**, 167–173.
- Yellowlees, D., Rees, T.A.V. y Leggat, W. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant Cell Environ.* **31**, 679-694.

Zar, J. H. 2010. Biostatistical analysis, 5th ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ.

ANEXOS

I. Composición del medio ASP-8A (Blank, 1987).

Solo se muestran las concentraciones de las sales, las cuales son las que mayor afectan a la presión osmótica.

0.43 M NaCl, 3.87 mM KCl, 36.6 mM MgSO₄*7H₂O, 7.48 mM CaCl₂*2H₂O, 0.5 mM NaNO₃, 0.07 mM KH₂PO₄, 0.15 mM ácido nitrilo-acético, 8.25 mM Tris pH 9.0. Mezcla de metales; y vitaminas: p-aminobenzoato sódico, Biotina (d-) (vitamina H), B12 (cianocobalamina), Colina di-citrato, ácido fólico cálcico, Inositol (mio-), ácido nicotínico, orotato mono sódico, D- pantoténico, piridoxuna, putrescina, riboflavina (B2), tiamina (B1).

II. Análisis de secuencias génicas y definición de cebadores.

a. dihidroxiacetona fosfato reductasa (dhapr)

Secuencias para el cebador 5' 5'- GTC CTC ATG GGC GCC AAC -3'

kb8_rep_c2613	LRKLLGHE-VVLMGANVANEVAAGEF
GPDH1_Dunaliella viridis	SRI LG ID-CSVLMGAN IAAD IGRE EL
GPDH2_Dunaliella viridis	TRVLG ID-CSVLMGAN IAGD IARE EL
Alexandrium catenella ACC07.....	RSCLGHN-VSVLMGAN IAKEVALGQF
Lingulodinium polyedrum	KLLGHN-VSVLMGANVANEVAQQQF
Xenopus (Silurana) tropicalis	REKMDID-VSVLMGAN IANEVAAEF

Secuencias para el cebador 3' 5'- TTT TCG ATT CCT GCC GCC -3'

kb8_rep_c2613	GVADLITTCFG—GRNRKCAEAFVKAKG
GPDH1_Dunaliella viridis	GVADVIASSYG--GRNRRVSEAWCKRRM
GPDH2_Dunaliella viridis	GVADLIASSYG—GRNRKVAEEWARRRN
Alexandrium catenella ACC07	-----
Lingulodinium polyedrum	-----
Xenopus (Silurana) tropicalis	GVADLITTCYG—GRNR KVSEAFVK S -

b. 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6pg).

Secuencias para el cebador 5' 5'- CAC AAT GCA GGC GAG TAT GCG-3'

kb8_c7643	GGAGSCVKMFHNAGEYAVLQIWGEVHE
kb8_c27469.....	-----
zoox2_c47370.....	-----
Microcoleus chthonoplastes PCC 7420 ..	GGAGSCVKMYHNAGEYAILQVWGEAYN
Prochlorococcus marinus str. MIT 9202 ..	GGSGHFVKTV HNGIEYIEQ I L AEAYD
Leishmania lainsoni	GGAGSCVKMYHNAGEYAILQVWGEAYN
Leishmania major	GGAGSCVKMYHNAGEYAVLQIWGEAYS
Trypanosoma cruzi strain CL Brener	GGAGSCVKMYHNAGEYAVLQVWGEAFD

Secuencias para el cebador 3'

5'- ACA TTT GCG CAT AAG AGG CAAT-3'

kb8_c7643DLFWAAAFAIIASYAQMFQCLRKMDEV
kb8_c27469DLFWAAAFAIIASYAQMFQCLRKMDEV
zoox2_c47370DLFWAAAFAIIASYAQMFQCFEE - - - K
Microcoleus chthonoplastes PCC 7420...QLYHAVSLSIIASYAQMFQCLRELDKV
Prochlorococcus marinus str. MIT 9202...PLFDAVVLAIIASYAQGM DILREASAV
Leishmania lainsoniQLYHAVSLSIIASYAQMFQCLRELDKV
Leishmania majorKLYHAVSLCIIASYAQMFQCLRELDKV
Trypanosoma cruzi strain CL Brener.....QLYHAVSI AIIACYAQMFQCLRALDKV

III. Actividad catalítica específica (Z_c/m_s) (Bergmeyer, 1983)

$$Z_c/m_s = \frac{\Delta A \times V \times 1000}{\varepsilon \times d \times v \times \Delta t \times \rho} = \frac{\Delta A \times 1000}{\varepsilon \times d \times \Delta t \times \varphi \times \rho}$$

A =absorbancia

V = volumen de ensayo en L.

ε = coeficiente de absorción, en $L \text{ mmol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$

d =longitud del paso de la luz, mm.

v = volumen de muestra.

φ = fracción del volumen de la muestra en el ensayo, v/V .

t = tiempo en segundos.

ρ = concentración, $g \text{ L}^{-1}$