



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(BIOLOGÍA MARINA)

“ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA DE CUATRO CLADOS DE DINOFLAGELADOS
SIMBIONTES DEL GÉNERO *Symbiodinium* PRESENTES EN EL CORAL
Montastraea faveolata DEL ARRECIFE DE PUERTO MORELOS, QROO.”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ELISA LÓPEZ GARCÍA

TUTOR:
Dr. ROBERTO IGLESIAS PRIETO
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(UNIDAD ACADÉMICA DE PUERTO MORELOS)

COMITÉ TUTOR:
Dr. AXAYACATL ROCHA OLIVARES
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR
Dra. ROSALBA ALONSO RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(UNIDAD ACADÉMICA DE MAZATLÁN)

Dr. HÉCTOR REYES BONILLA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR
Dr. MARCO ANTONIO VILLANUEVA
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
(UNIDAD ACADÉMICA DE PUERTO MORELOS)

MÉXICO, D.F. ENERO 2013



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



“ESTUDIO DE LA ABUNDANCIA DE CUATRO CLADOS DE
DINOFLAGELADOS SIMBIONTES DEL GÉNERO *Symbiodinium*
PRESENTES EN EL CORAL *Montastraea faveolata* DEL ARRECIFE DE
PUERTO MORELOS, QROO.”

T E S I S

que para obtener el grado académico de

MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA MARINA)

p r e s e n t a

ELISA LÓPEZ GARCÍA

Director de Tesis: Dr. Roberto Iglesias-Prieto

Comité Tutorial: Dr. Axayacatl Rocha Olivares
Dra. Rosalba Alonso Rodríguez
Dr. Héctor Reyes Bonilla
Dr. Marco Antonio Villanueva

MÉXICO, D.F. ENERO 2013

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría mostrar mi agradecimiento al Dr. Roberto Iglesias Prieto, por abrirme las puertas de su laboratorio y aceptarme como estudiante muchos años antes de llegar a Puerto Morelos; por su confianza, su apoyo y su entusiasmo. Espero algún día poder devolverte parte de todo lo que me has ayudado.

Gracias al Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología por darme la oportunidad de estudiar esta Maestría, en especial a la Dra. Gloria Vilaclara, que siempre creyó en mis posibilidades; al personal de la sede en Ciudad Universitaria por tantos emails, llamadas, valijas y documentos; así como al personal administrativo de la Unidad Académica de Puerto Morelos, siempre dispuestos a ayudar.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca con número de registro 391636 para realizar mis estudios de Maestría.

A los integrantes de mi Comité Tutorial: Dr. Axayacatl Rocha Olivares, Dra. Rosalba Alonso Rodríguez, Dr. Héctor Reyes Bonilla y Dr. Marco Antonio Villanueva, por estar presentes en mis exámenes y tener la paciencia de leer una y otra vez mis manuscritos. Por ayudarme a aceptar mis faltas y luchar por mis aciertos.

Al Profesor Todd LaJeunesse por aceptarme en su laboratorio durante mi estancia de dos meses en la Pennsylvania State University, por su generosidad, por compartir su “buena ciencia” conmigo y hacerme sentir como en casa; y a sus estudiantes, los Candidatos a Doctor Allison Lewis y Francis Wham (Drew), por compartir su espacio de trabajo y ayudarme siempre que pudieron; gracias por su amistad, sin ustedes nunca hubiera terminado esta tesis. A la Profesora Deborah Grove, directora de Análisis Genéticos en las Instalaciones de Genómica de University Park, por escuchar mis desvaríos sobre genética y ayudarme a resolver el último clado. A la Dra. Patricia Thomé, por el apoyo en el contexto molecular de esta tesis, por estar horas y horas escuchándome, por su guía, su paciencia y sus sonrisas. A la Dra. Michele Weber por sus estupendos consejos.

Me gustaría también agradecer al resto de estudiantes y en especial a Luis, Tati e Inti por su paciencia conmigo y tantas horas compartidas. A Tim por ser mi ángel de la guarda y amigo, a Sergio por molestarme todas las mañanas con una sonrisa, a Mac y Parmenio por estar siempre ahí, a mi queridísimo Rumi por quejarse conmigo y por cada café de buenos días, y a Mélina, siempre tan empática con mis problemas. En general, a los que se fueron porque nunca les olvidaré y a los que se quedan porque nunca me olviden.

Por último, hay tres personas sin las que esta tesis no hubiera sido más que un bonito sueño. Mis padres, por ser los mejores y más eficientes secretarios que se puede pedir, por todo el drama y frustración, por la distancia, por las lágrimas de alegría compartida, por su apoyo incondicional y sus recientemente adquiridas nociones sobre genética molecular, fotosíntesis y simbiosis; esta tesis es también vuestra, no lo olvidéis. Y a Román, por levantarme cuando me caía y por acostarse conmigo cuando no me podía levantar.

¡A por la siguiente!

Lista de figuras

FIGURA 1. CICLO DE VIDA DE <i>SYMBIODINIUM</i> . A, QUISTE VEGETATIVO. B, QUISTE VEGETATIVO EN DIVISIÓN. C, ZOOSPORA EN DESARROLLO. D, ZOOSPORA (MASTIGOTE). CL, CLOROPLASTO. N, NÚCLEO. PA, PRODUCTOS DE ACUMULACIÓN. FL, FLAGELO LONGITUDINAL. FT, FLAGELO TRANSVERSAL (STAT ET AL. 2006).....	9
FIGURA 2. ORGANIZACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS GENOMAS NUCLEAR Y ORGANELAR PRESENTES EN EL DINOFLAGELADO SIMBIÓTICO DEL GÉNERO <i>SYMBIODINIUM</i> , ASÍ COMO LAS TÉCNICAS EMPLEADAS PARA SU ANÁLISIS (MODIFICADO POR T.C. LAJEUNESSE DE SAMPAYO ET AL. 2007).	11
FIGURA 3. RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LOS CLADOS DOMINANTES DEL GÉNERO <i>SYMBIODINIUM</i> . LAS POSICIONES DE LOS CLADOS B, C, F Y H VARIAN DEPENDIENDO DEL MÉTODO Y REGIONES ANALIZADAS (NR28S-rDNA Y CP23S-rDNA) (POCHON Y GATES 2010).	12
FIGURA 4. OCURRENCIAS RELATIVAS DE DISTINTOS FILOTIPOS DE "ZOOXANTELA" EXTRAÍDAS DE MUESTRAS INDIVIDUALES DE <i>M. ANNULARIS</i> Y <i>M. FAVEOLATA</i> A LO LARGO DE UN GRADIENTE DE PROFUNDIDAD (ROWAN Y KNOWLTON 1995).....	14
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE UN HAZ DE LUZ DIRECTA Y SU ÁREA PROYECTADA A LO LARGO DE UNA SUPERFICIE HORIZONTAL (B) Y OTRA A A GRADOS DE INCLINACIÓN (A). LA ECUACIÓN $E(A) = E(B)$ COSA DESCRIBE LA IRRADIANCIA EN AMBAS SUPERFICIES DE ACUERDO CON LA LEY DEL COSENO DE LAMBERT.	16
FIGURA 6. RELACIÓN DE LAS IRRADIANCIAS CALCULADAS PARA SEIS PROFUNDIDADES A LO LARGO DE UN GRADIENTE DE INCLINACIÓN. LAS ÁREAS SOMBRADAS REPRESENTAN LOS NICHOS OCUPADOS POR LOS CLADOS A, B Y C EN <i>M. ANNULARIS</i> A LO LARGO DE UN GRADIENTE DE IRRADIANCIAS (MODIFICADO DE ROWAN ET AL. [1997]).	17
FIGURA 7. PATRÓN DE ZONACIÓN DE TRES TIPOS DE <i>SYMBIODINIUM</i> EN UNA COLONIA DE <i>M. FAVEOLATA</i> DEL ARRECIFE DE PUERTO MORELOS, A LO LARGO DE TRES TRANSECTOS VERTICALES CON ORIENTACIONES NORTE, NORESTE, NOROESTE Y ESTE. (KEMP ET AL. 2008).	18
FIGURA 8. SEPARACIÓN DE FASES DURANTE LA EXTRACCIÓN POR FENOL:CLOROFORMO Y SUBSECUENTE PRECIPITACIÓN CON ISOPROPANOL.	20
FIGURA 9. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MOLDE POR UN PAR DE CEBADORES CON LA SONDA TAQMAN CORRESPONDIENTE. A) FASE DE ALINEAMIENTO: LA SONDA SE UNE A LA HEBRA, B) FASE DE ALINEAMIENTO: LOS CEBADORES SE UNEN A LA HEBRA, C) FASE DE ELONGACIÓN: LA ENZIMA COMIENZA A POLIMERIZAR EN SENTIDO 5'-3', D) HIBRIDACIÓN DE LA SONDA DEBIDO A LA ACCIÓN EXONUCLEASA DE LA ENZIMA Y EMISIÓN DE FLUORESCENCIA POR LA DISOCIACIÓN FLUORÓFORO (F)-QUENCHER(Q).	23
FIGURA 10. CURVA DE AMPLIFICACIÓN TÍPICA DE PCR EN TIEMPO REAL CON LAS TRES FASES: EXPONENCIAL, LINEAL Y PLATEAU, LOS PARÁMETROS LÍNEA UMBRAL, LÍNEA DE BASE Y CICLO UMBRAL, Y LA CURVA DEL CONTROL NEGATIVO.	25
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DELTA Rn VS. CICLO DE CUATRO CURVAS DE AMPLIFICACIÓN EN qPCR DE DILUCIONES SERIADAS CON EL UMBRAL CONSTANTE A 0.1. EN EL CUADRO SUPERIOR APARECE LA RECTA DE CALIBRACIÓN QUE ENFRENTA CADA CICLO UMBRAL CON EL LOGARITMO DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN INICIAL EN CADA DILUCIÓN.	26
FIGURA 12. PERFILES DE PCR-DGGE O HUELLA GENÉTICA. EN EL MARGEN SUPERIOR APARECE EL NOMBRE DE LA MUESTRA (CUADRO 2) CORRESPONDIENTE A CADA CARRIL, MIENTRAS QUE EN EL MARGEN INFERIOR SE IDENTIFICA SU GENOTIPO. LOS RECUADROS EN BLANCO SIN BORDE IDENTIFICAN LOS CINCO POSIBLES GENOTIPOS ENCONTRADOS, LOS RECUADROS CON BORDE NEGRO CORRESPONDEN AL MARCADOR (MKR) DE GENOTIPO CONOCIDO Y QUE ACTÚAN COMO ESTÁNDARES PARA LA IDENTIFICACIÓN.....	28
FIGURA 13. EJEMPLO DE HUELLAS GENÉTICAS Y SU INTERPRETACIÓN. EN LA PARTE SUPERIOR APARECE EL NOMBRE DE LAS MUESTRAS CORRESPONDIENTES A CADA CARRIL (1-4), EN LA PARTE INFERIOR SU GENOTIPO, Y LAS FLECHAS IDENTIFICAN EL GENOTIPO DE CADA BANDA. TAMBIÉN APARECEN INDICADOS LOS HETERODUPLEXES (HET), SIEMPRE DE MENOR INTENSIDAD QUE LAS BANDAS MAYORITARIAS (LAJEUNESSE 2002).	30
FIGURA 14. CURVAS DE CALIBRACIÓN CON SUS RESPECTIVOS ANÁLISIS DE REGRESIÓN PARA CADA UNO DE LOS CLADOS AMPLIFICADOS (A, B, C, D).	33
FIGURA 15. GRÁFICAS DE AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA (FLUORESCENCIA A LO LARGO DE LOS CUARENTA CICLOS DE LA qPCR) DEL JUEGO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDA PARA A EN LA PRIMERA FILA, PARA	

B EN LA SEGUNDA, PARA C EN LA TERCERA Y PARA D EN LA CUARTA, ENFRENTADOS CON LOS ESTÁNDARES DE A, B, C Y D EN ESTE ORDEN.	34
FIGURA 16. CONCENTRACIONES CALCULADAS DE CADA UNO DE LOS DOS CLADOS EN LAS MEZCLAS AB (1-5), COMPARADAS CON LAS CONCENTRACIONES TEÓRICAS.	35
FIGURA 17. PORCENTAJE DE CADA UNO DE LOS CLADOS CON RESPECTO AL TOTAL DE ADN CALCULADO EN LAS CUATRO MEZCLAS CD.	36
FIGURA 18. GRÁFICAS DE AMPLIFICACIÓN (FLUORESCENCIA A LO LARGO DE LOS CUARENTA CICLOS DE LA QPCR) DEL JUEGO DE OLIGONUCLEÓTIDOS Y SONDA PARA A EN LA PRIMERA FILA, B EN LA SEGUNDA, C EN LA TERCERA Y D EN LA CUARTA, CONFRONTADOS CON LAS MUESTRAS 197 (A) Y 196 (B) Y LOS TRATAMIENTOS PRE-BLANQUEAMIENTO (T ₀) Y POST-BLANQUEAMIENTO (T ₅).	38-39
FIGURA 19. PORCENTAJE DEL TOTAL CUANTIFICADO DE CADA UNO DE LOS CUATRO CLADOS EN LOS DOS TRATAMIENTOS (T ₀ PRE-BLANQUEAMIENTO Y T ₅ POST-BLANQUEAMIENTO) EN LAS DOS MUESTRAS ESTUDIADAS (A. 197 Y B. 196).	40
FIGURA 20. CURVAS DE REFLECTANCIA A 675 NM PARA LAS DOS MUESTRAS (197 Y 196) Y SUS CONTROLES A LO LARGO DE LOS 40 DÍAS DE EXPERIMENTO. EL ESTRÉS SE INCORPORÓ EL DÍA 9 DE MARZO (T ₀) Y SE PARÓ EL 19 DE MARZO. EL PUNTO T ₅ CORRESPONDE CON EL DÍA 26 DE ABRIL, Y EL EXPERIMENTO ABARCÓ HASTA EL 29 DE ABRIL. MODIFICADO DESDE WEBER ET AL. (2013, EN PREPARACIÓN).	48

Lista de Cuadros

CUADRO 1 DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS DE ADN DE <i>SYMBIODINIUM</i> USADOS COMO CONTROLES POSITIVOS DE CADA CLADO. INCLUYE NÚMERO DE CLON, HOSPEDERO CON ORDEN ENTRE PARÉNTESIS, LUGAR DE COLECTA Y TIPO ITS2.	26
CUADRO 2 CONCENTRACIÓN PARCIAL Y TOTAL DE CADA UNA DE LAS MEZCLAS AB.	27
CUADRO 3 LISTA DE MUESTRAS EXTRAÍDAS, LOCALIZACIÓN, PROFUNDIDAD DE MUESTREO (M), ESPECIE DE HOSPEDERO EXTRAÍDO, CONCENTRACIÓN DE ADN TOTAL (NG ML ⁻¹), PUREZA (RAZÓN DE ABSORBANCIA A 260/280 NM) E IDENTIDAD GENÉTICA (PCR-DGGE).	29
CUADRO 4 LOCI ESPECÍFICOS ELEGIDOS PARA CADA CLADO (A, B, C Y D), MICROSECUENCIA REPETIDA DENTRO DE LA SECUENCIA, SECUENCIAS HACIA ADELANTE (F) Y REVERSA (R) DE CADA PAR DE CEBADORES, TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO (°C), NÚMERO DE ACCESO DEL GENBANK Y REFERENCIA (EN CASO DE ESTAR PUBLICADOS).	30
CUADRO 5 SECUENCIAS DISEÑADAS A PARTIR DE LAS REGIONES FLANQUEANTES DE MICROSATÉLITES PARA CADA CLADO, SECUENCIAS 5'-3' HACIA ADELANTE (F) Y REVERSA (R) DE CADA PAR DE CEBADORES, TEMPERATURA DE FUSIÓN (°C) DE LOS CEBADORES, LONGITUD DEL AMPLICÓN (BP) Y SECUENCIA EN SENTIDO 5'-3' DE LA SONDA.	31
CUADRO 6 CONTROLES POSITIVOS DE CADA CLADO, NÚMERO DE CULTIVO, CICLOS UMBRALES PROMEDIO PARA CADA CONCENTRACIÓN DE ADN (NG ML ⁻¹), DESVIACIÓN ESTÁNDAR DEL PROMEDIO, PENDIENTE Y COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R ²) DE CADA RECTA DE CALIBRACIÓN, Y EFICIENCIA DE AMPLIFICACIÓN (%).	32
CUADRO 7 CONCENTRACIONES NOMINALES Y CALCULADAS (NG ML ⁻¹) PROMEDIAS PARA CADA UNA DE LAS CINCO MEZCLAS AB Y SU RAZÓN.	36
CUADRO 8 TABLA DE CONVERSIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN EN CONCENTRACIONES CELULARES PARA CADA UNO DE LOS TIPOS DE ITS2. EL PESO DE CADA CÉLULA VIENE DADO EN PICOGRAMOS (LAJEUNESSE ET AL. 2005) Y LA CONCENTRACIÓN DE LOS LÍMITES EN NANOGRAMO POR MILILITRO.	45

Abreviaturas

- ADN** Ácido desoxirribonucleico (del inglés *Deoxyribonucleic Acid*)
- Bp** Par de bases (del inglés *Base Pair*)
- BSA** Albúmina de suero bovino (del inglés *Bovine Serum Albumin*)
- Ct** Ciclo umbral
- DGGE** Electroforesis en gel por gradiente de desnaturalización (del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)
- DMSO** Dimetil Sulfóxido (del inglés *Dimethyl sulfoxide*)
- dNTP** Desoxirribonucleótido trifosfato (del inglés *Deoxyribonucleotide triphosphate*)
- EDTA** Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*)
- ETS** Espaciador transcrito externo (del inglés *External Transcribed Spacer*)
- FAM** 5 ó 6-carboxifluoresceína
- ITS** Espaciador transcrito interno (del inglés *Internal Transcribed Spacer*)
- LSU** Subunidad grande del ARN ribosómico (del inglés *Large Subunit*)
- MFR** Región flanqueante del microsatélite (del inglés *Microsatellite Flanking Region*)
- NTS** Espaciador no transcrito (del inglés *Non Transcribed Spacer*)
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)
- qPCR** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
- RFLP** Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
- RFU** unidades relativas de fluorescencia (del inglés *Relative Fluorescence Units*)
- Rn** Fluorescencia normalizada con el tinte de referencia
- ROX** 5-carboxi-X-rodamina
- SNP** Polimorfismo de nucleótido único (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*)
- STR** Repetición corta en tándem (del inglés *Short Tandem Repeats*)
- SSU** Subunidad pequeña del ARN ribosómico (del inglés *Small Subunit*)
- VNTR** Repetición en tándem de número variable (del inglés *Variable Number of Tandem Repeats*)
- ΔRn** Fluorescencia normalizada con la línea de base

Glosario

Quencher: Facilitador del decaimiento de la emisión de fluorescencia (*quenching*) de un fluoróforo.

Fluoróforo: Compuesto químico capaz de excitarse bajo luz a una determinada longitud de onda y re-emitirla en forma de fluorescencia a una longitud de onda mayor.

Introducción

Los arrecifes coralinos son de los ecosistemas más biodiversos del planeta, caracterizados por una altísima productividad en mares tan oligotróficos como el Caribe. Su importancia reside además, en su papel como elemento crucial para el desarrollo humano de los 500 millones de personas (el 15% de la población mundial) (Pomerance 1999) que viven a menos de 100 kilómetros de un arrecife de coral. Sólo el turismo asociado al mismo genera 30,000 millones de dólares en países costeros que dependen en gran o total medida de este negocio; por sustentar pesquerías de supervivencia, industrial o destinadas al comercio de especies para acuario; y como barreras de protección contra huracanes y tormentas ante los que, tanto comunidades humanas como ecosistemas asociados tales como praderas submarinas o manglares, quedarían totalmente expuestos a su acción destructiva.

Estos arrecifes de coral tienen como constructor principal a los corales escleractínidos, y su alta productividad se explica por el mutualismo existente con dinoflagelados endosimbiontes del género *Symbiodinium*, permitiendo la supervivencia de la colonia hospedera en aguas tan oligotróficas como las tropicales. De esta unión llamada *holosimbionte* (Iglesias-Prieto 1997) depende la formación biogénica de los arrecifes.

Estudios recientes presentan al género *Symbiodinium* Freudenthal (1962) como un grupo genéticamente muy diverso, diversidad que si además se le sumara la diversidad de filos capaces de hospedar a *Symbiodinium*, potencialmente tendríamos un número casi infinito de asociaciones posibles en una de las relaciones más diversas de la naturaleza (Hallock 2001). Sin embargo, se han descrito estas relaciones como altamente específicas y conservadas a lo largo de amplias regiones geográficas (LaJeunesse 2002), de modo que en este caso no se debe confundir diversidad con promiscuidad.

Intracoloniales la mayoría de los cnidarios se inclinan por establecer y mantener relaciones constantes con un único tipo de *Symbiodinium* (LaJeunesse 2002; Goulet y Coffroth 2003; Iglesias-Prieto et al. 2004; Goulet 2006), o con un grupo constante de diferentes simbioses, (Buddemeier y Fautin 1993; Rowan y Knowlton 1995; Ulstrup y van Oppen 2003; Toller y Rowan 2001; Frade et al. 2008). En este último caso, existe una especie dominante ocupando más del 95% del total de células simbioses de la colonia, junto con distintos porcentajes de tipos secundarios (Mieog et al. 2007). Existen hospederos que pueden cambiar o mezclar (*shuffle*) su contenido cladal de *Symbiodinium* tras eventos de blanqueamiento o bien presentar patrones de diversidad geográfica (Toller y Rowan 2001; Berkelmans y Van Oppen 2006; Rodríguez-Roman et al. 2006; Thornhill et al. 2006b; Jones et al. 2008). Dentro de esta especificidad hospedero-simbionte, una de las más flexibles es la creada entre el escleractínido *Montastraea faveolata* (Ellis y Solander 1786) y poblaciones particulares pertenecientes a los cuatro clados de *Symbiodinium* que hospeda natural y simultáneamente (A, B, C y D, [Rowan y Knowlton 1995]; y en el caso particular de Puerto Morelos los subclados A3, B1, B17, C3 y D1a, *sensu* Franklin et al. [2012]).

La distribución de las poblaciones simbioses a lo largo del arrecife está definida por el gradiente lumínico vertical dando lugar a patrones de zonación predecibles (Iglesias-Prieto y

Trench 1997; Sampayo et al. 2007). Sin embargo, limitando la escala de estudio a una única colonia masiva, en este caso *M. faveolata*, el campo lumínico se vuelve más complejo y pese a que ha habido intentos, nunca se ha logrado un método con resolución tal que permita la cuantificación de cada una de estas poblaciones.

El desarrollo de técnicas moleculares aporta un nuevo nivel de entendimiento, y en ellas se basan los primeros intentos de explicar la zonación de cada tipo de simbionte dentro de una misma colonia. Sin embargo, las técnicas empleadas hasta ahora (RFLP y DGGE más adelante) sólo son capaces de descifrar ausencia o presencia de dominancias (sólo detectan poblaciones por encima del 5-10% del total de la población simbionte), siendo por tanto incapaces de detectar (y mucho menos cuantificar) poblaciones simultáneas en menor concentración (poblaciones “crípticas” *sensu* LaJeunesse (2002), que potencialmente y bajo condiciones extremas, podrían convertirse en competidores de las poblaciones mayoritarias ganando importancia ecológica (Santos et al. 2001).

La PCR en tiempo real (rtPCR, por sus siglas en inglés) está basada en la detección y cuantificación de una molécula reportero de tal forma que un incremento en la emisión de fluorescencia se relaciona directamente con la cantidad de producto de PCR en cada ciclo. La aplicación de la rtPCR permite investigar el potencial de las poblaciones simbioses presentes a muy bajas concentraciones incluso dentro del hospedero con una mayor precisión, fiabilidad y velocidad que los métodos hasta la fecha convencionales. Sin embargo hasta la fecha muy pocos estudios han utilizado PCR en tiempo real (rtPCR) para investigar poblaciones de *Symbiodinium* en corales (Ulstrup y van Oppen 2003; Loram et al. 2007; Mieog et al. 2007; Pettay y LaJeunesse 2009; Correa y McDonald 2009; Yamashita et al. 2010; LaJeunesse y Smith 2010). En ninguno de ellos se han empleado genes monocopia y sólo en unos pocos se ha empleado esta técnica para cuantificar poblaciones relativas en simbiosis multiespecíficas como sucede en *Montastraea faveolata*. El estudio de las dinámicas poblacionales a través de la determinación cuantitativa de alta resolución nos ofrecerá una visión integral de las dinámicas poblacionales de los endosimbioses y sus repercusiones ecológicas en el hospedero a una escala y precisión sin precedentes.

Antecedentes

El género Symbiodinium

Los dinoflagelados son protistas alveolados que comprenden alrededor de 2000 especies, con un origen monofilético cercano relacionado con los apicomplexa y ciliados (p.e. Lenaers et al. 1989). Los dinoflagelados simbióticos son protistas fototrópicos unicelulares que desarrollan íntimas relaciones con un amplio rango de hospederos invertebrados y protistas marinos, tanto en aguas tropicales como templadas (Trench 1997).

La mayoría de dinoflagelados simbióticos fueron denominados inicialmente “zooxantelas”, término vernáculo que describe endosimbioses amarillo-marrón ya sean dinoflagelados o

diatomeas (Trench 1997; Blank y Trench 1986; Trench y Blank 1987). Entre ellos, *Symbiodinium* (familia Symbiodiniaceae, Orden Suessiales, clase Dinophyceae, [Stat et al. 2006]) es el más común. Pueden establecer simbiosis mutualista con cnidarios (escleractínidos, anémonas, octocorales, zoántidos, hidrocorales) (Glynn 1996) y otros filos de invertebrados marinos como Mollusca (caracoles y almejas), Platelminfos (gusanos planos) y Porífera (esponjas), así como con otros protistas unicelulares como Foraminíferos (Trench 1979; Pawlowski et al. 2001) y Ciliados (Lobban et al. 2002).

Kawaguti (1944) fue el primero en observar que aquellas algas cocoides aisladas del coral *Acropora corymbosa* producían zoosporas móviles en cultivo (Figura 1), incluyéndolas dentro del género *Gymnodinium*. Luego Freudenthal (1962) describió el ciclo de vida del alga extraída de *Cassiopeia* y *Condylactis* en cultivo, y la describió dentro del género *Symbiodinium* (*S. microadriaticum*) incluyéndola dentro de la familia de dinoflagelados parásitos Blastodiniaceae. Hasta los años ochenta, todos los dinoflagelados simbioses se consideraban miembros de la única especie pandémica, *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal (Taylor 1974).

Sistemática del género Symbiodinium: morfología y marcadores moleculares

Inicialmente la sistemática de dinoflagelados se basó en el análisis de la morfología del mastigote (la célula libre nadadora con doble flagelo, Figura 1d) (Loeblich y Sherley 1979; Taylor 1974; Fensome et al. 1993). Sin embargo, con dinoflagelados simbióticos el método clásico presenta complicaciones, pues durante la simbiosis (*in hospite*) toda las células se presentan en forma cocoide (Figura 1a) con un fenotipo común característico del género, mientras que en vida libre, pueden intercambiar ambos fenotipos, mastigote y cocoide.

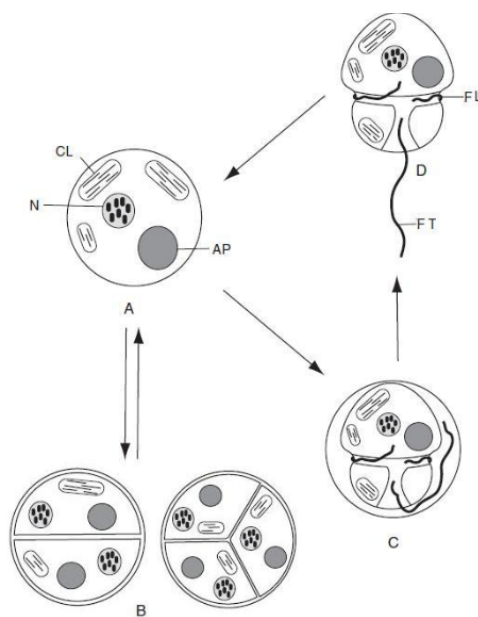


Figura 1. Ciclo de vida de *Symbiodinium*. A, quiste vegetativo. B, quiste vegetativo en división. C, zoospora en desarrollo. D, zoospora (mastigote). CL, cloroplasto. N, Núcleo. PA, productos de acumulación. FL, flagelo longitudinal. FT, flagelo transversal (Stat et al. 2006).

Llegó un punto por tanto en el que la taxonomía clásica, basada en la morfología, presentó limitado uso como marcador ecológico (Rowan y Powers 1991; Baker et al. 1997; Savage et al. 2002). Además se encontraron evidencias experimentales, estudiando la composición y ultraestructura de las células de *Symbiodinium* (número de cromosomas [Blank y Trench 1985a; Trench y Blank 1987; Blank y Huss 1989], tamaño de la célula en el estado vegetativo [LaJeunesse 2001], número, tamaño y disposición de cloroplastos [Blank y Trench 1985b; LaJeunesse 2001], producción de aminoácidos del tipo micosporina [MAAs, [Banaszak et al. 2000], perfiles isoenzimáticos [Schoenberg y Trench 1980], composición de ácidos grasos y esteroides [Blank y Trench 1985], fisiología fotoadaptativa [Blank y Trench 1985; Iglesias-Prieto y Trench 1994] e infectividad hacia el hospedero [LaJeunesse 2001]), que revelaron diferencias entre cultivos de *Symbiodinium* capaces de contradecir al concepto pandémico de Freudenthal. Se aceptó así la existencia de varias especies dentro del género *Symbiodinium* (Trench 1993; Rowan 1998, Baker 1999).

La capacidad de distinguir organismos en todo el rango taxonómico y en particular el entendimiento de la complejidad de la simbiosis coral-dinoflagelado impulsaron el desarrollo de técnicas moleculares para la sistemática del género *Symbiodinium* (Baker 2003; Coffroth y Santos 2005; Pochon et al. 2006). El ADN nuclear acumula muchas mutaciones y posee comunmente polimorfismos suficientes que le confieren un mayor uso como fuente de marcadores moleculares para análisis filogenéticos. Dentro del ADN nuclear, probablemente el primero y más utilizado es el ADN ribosomal (rADN), capaz de cubrir el rango de aplicaciones en la sistemática que va desde el origen de la vida hasta eventos relativamente recientes (Hillis y Dixon 1991). En todos los organismos eucariotas, el ADN ribosomal está organizado de un modo semejante (Figura 2). Cada unidad de transcripción consiste en los genes 18S, 5.8S y 28S, dos espaciadores transcritos internos (ITS 1 y 2) y un espaciador transcrito externo (ETS). La subunidad que codifica el 5.8S está separada de la subunidad 18S por la primera de las dos regiones espaciadoras transcritas existentes (ITS1); la subunidad que codifica el gen 28S, y la que codifica el 5.8S están separadas por la segunda de estas regiones (ITS2). Cada repetición está separada de la siguiente por espaciadores no transcritos (NTS). El número de repeticiones por célula es variable intra e intertaxa, yendo desde una a varios millones (Long y Dawid 1980; Rogers y Bendich 1987; Loram et al. 2007).

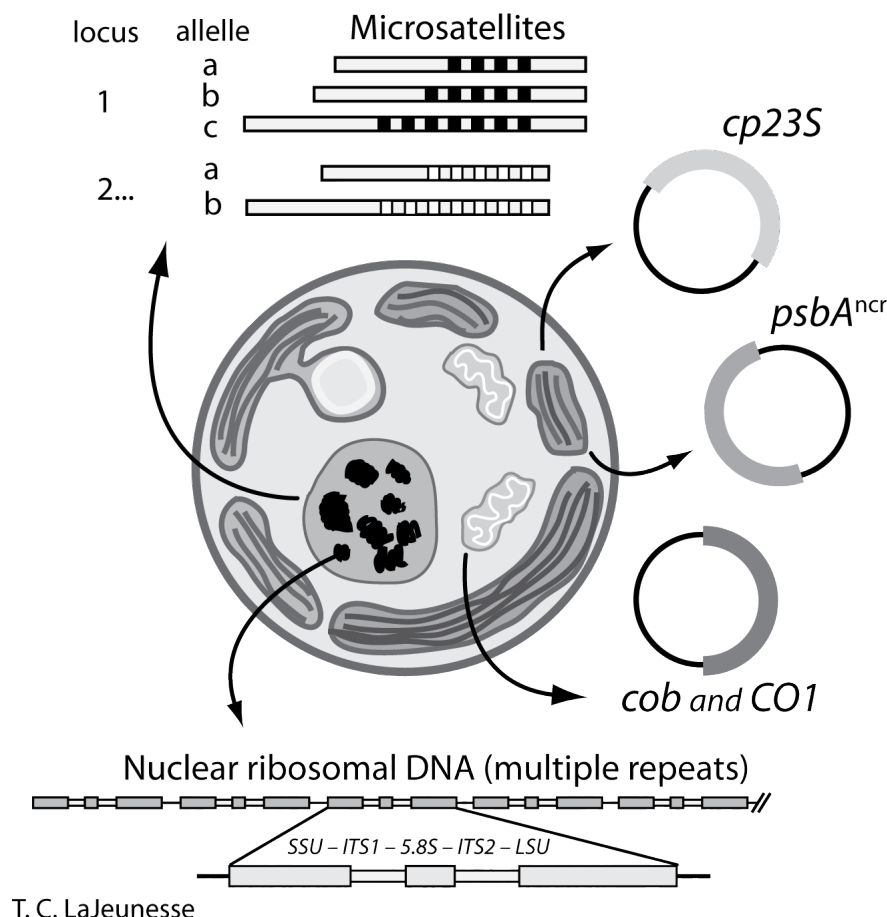


Figura 2. Organización esquemática de los genomas nuclear y organelar presentes en el dinoflagelado simbiótico del género *Symbiodinium*, así como las técnicas empleadas para su análisis (modificado por T.C. LaJeunesse de Sampayo et al. 2007).

Rowan y Powers (1991) fueron los primeros en estudiar polimorfismos de sustitución en un único nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) al amplificar por medio de enzimas de restricción (RFLP por sus siglas en inglés) la subunidad ribosomal pequeña del ADN ribosomal nuclear (SSU rADN, Figura 2) de *Symbiodinium*, siendo por primera vez capaces de distinguir entre líneas evolutivas divergentes (hoy en día definidos en la literatura como *clados*, tipos, filotipos o grupos) dentro del género, e inferir relaciones filogenéticas entre ellas (Muscatine y Porter 1977; Rowan y Knowlton 1995; Rowan et al. 1997). En base a estos estudios hoy en día el género se divide en nueve clados: A, B, C (Rowan y Powers 1991; LaJeunesse 2002), D (Carlos et al. 1999), E (*S. Californium*, [LaJeunesse y Trench 2000; Mieog et al. 2007]), F (Toller y Rowan 2001; LaJeunesse 2001; Berkelmans y Van Oppen 2006; Rodríguez-Roman et al. 2006; Thornhill et al. 2006b; Jones et al. 2008), G (Pochon et al. 2001), H (Pochon et al. 2004) y el recientemente descubierto I (Pochon y Gates 2010) (Figura 3). Todos ellos con excepción de E, G, H e I han sido identificados en corales escleractínios, siendo A, B, C y D los simbiotes predominantes. El clado A se considera el más antiguo y divergente del resto de los clados (Santos et al. 2001; Coffroth y Santos 2005). Pochon et al. (2006) datan la primera radiación del género *Symbiodinium* hace 50 m.a. (es decir, al principio del Eoceno). Esto coincide con la aparición de la mayoría de las familias modernas de corales escleractínidos durante dicha época (Wood 1998); a pesar de que algunos

autores sitúan la aparición del primer ancestro del género antes, durante el límite Cretácico-Terciario (hace 65 m.a. [Tchernov et al. 2004]). Posteriormente los otros clados fueron apareciendo y divergiendo sobre sí mismos a lo largo del Eoceno hasta mediados del Mioceno (hace 15 m.a.) (Stat et al. 2006; Pochon et al. 2006; LaJeunesse 2001; Tchernov et al. 2004).

LaJeunesse (2001) continuó con el estudio de los polimorfismos de nucleótido único amplificando un nuevo marcador molecular en PCR, el ITS2 (Figura 2), en el que a través de electroforesis (DGGE por sus siglas en inglés) se distinguían los polimorfismos poblacionales. Este nuevo marcador continúa aumentando la resolución de las técnicas genéticas en la ecología de poblaciones fisiológicamente distintas y aporta un nuevo nivel taxonómico por debajo del clado, el *subclado*. El ITS2 secuenciado en protistas, animales, plantas, hongos y algas macrofitas ofrece una resolución filogenética igual o mayor al nivel de especie en todos estos grupos y potencialmente relacionable con rasgos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos comunes, aportando grandes avances en la compleja clasificación de *Symbiodinium*. Por ejemplo, la mayoría de los invertebrados simbióticos (aproximadamente el 95% de los géneros estudiados hasta la fecha) están asociados con el clado C de *Symbiodinium* en el Indo-Pacífico (Baker 2003; LaJeunesse et al. 2004b; Coffroth y Santos 2005; Pochon et al. 2006; Stat et al. 2006). Esta clasificación a nivel de clado al ser muy conservativa ofrece poca información desde un punto de vista ecológico (Rowan et al. 1997; LaJeunesse 2001).

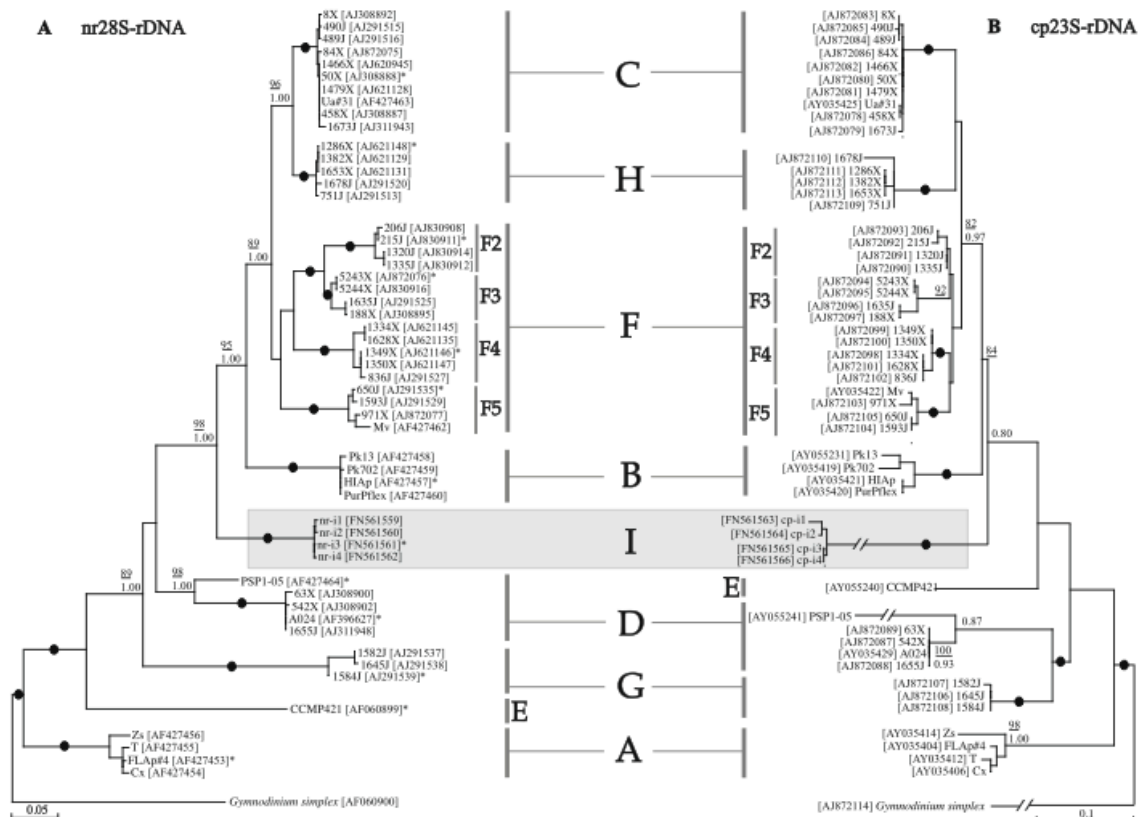


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre los clados dominantes del género *Symbiodinium*. Las posiciones de los clados B, C, F y H varían dependiendo del método y regiones analizadas (nr28S-rDNA y cp23S-rDNA) (Pochon y Gates 2010).

Actualmente un segundo tipo de polimorfismo, el polimorfismo de repetición (VNTR por sus siglas en inglés), está ganando más peso en el diagnóstico genético, en la determinación de la paternidad y en usos forenses. Los microsatélites (STRs por sus siglas en inglés) son repeticiones cortas (entre 2 y 5 nucleótidos) en tándem y se han convertido en los polimorfismos utilizados en el diagnóstico genético por excelencia por su elevado número de variantes alélicas debidos por lo general a errores en la actividad de la polimerasa durante la replicación del ADN y que pueden ser fácilmente amplificados en PCR y detectados por electroforesis. Se sabe además que sus regiones flanqueantes (MFRs por sus siglas en inglés) son constantes en escalas evolutivas, y de hecho han sido probadas como muy útiles para inferir relaciones entre poblaciones de alelos y especies estableciendo relaciones filogenéticas a escalas temporales que rebasen sus tasas de mutación (Streelman et al. 1998, Zardoya et al. 1996).

Elección de un marcador molecular para el objeto de estudio

En general, los marcadores moleculares existentes actualmente en la sistemática de *Symbiodinium* son genes que, o bien están demasiado conservados para discriminar entre especies (por ejemplo 18S ó 28S), o bien son genes como ITS2 o actina (Pochon et al. 2012), multicopia y potencialmente variables intragenómicamente, lo cual complica su uso e interpretación. Se necesita por tanto desarrollar marcadores capaces de discernir la diversidad intracladal al mismo tiempo de presentar una única secuencia por célula (monocopia), lo cual permite la cuantificación y la delimitación de estructuras poblacionales.

El hecho de emplear un marcador monocopia es fundamental para hacer estudios poblacionales por cuantificación absoluta. Las unidades de transcripción ribosomales y sus espaciadores asociados están dispuestos en tándems compuestos por cientos o miles de copias. Variaciones en el número de copias repetidas han sido observadas de hasta varios órdenes de magnitud entre especies, y en *Symbiodinium* han sido reportadas variaciones entre clados entre 1 y >1000, e incluso entre individuos pertenecientes al mismo tipo (Mieog et al. 2007). Otro potencial problema de trabajar con, por ejemplo, la región del ITS como marcador filogenético es que las secuencias pueden ser hipervariables, y dar lugar a potenciales inserciones o deleciones que resultarán en ambigüedades en el alineamiento. Por otra parte, Mieog et al. (2009) al emplear el gen actina, reportaron que C tiene 7 veces más copias que D, pero sólo aportan la abundancia relativa en relación con el número de células hospederas (relación S/H), relación reportada como variable estacionalmente (Fitt et al. 2000). Además, Pochon et al. (2012) reportaron que los oligonucleótidos usados en este trabajo para el clado C sólo reconocen C1 pero no C15 ó C91. Por otro lado, Pochon et al. (2012) no consiguieron amplificar ninguna de las secuencias del clado D, asumiendo que estaban apuntando hacia poblaciones distintas (variación alélica) dentro de ese mismo clado. De modo que estos oligonucleótidos no son específicos a nivel de clado tal y como reportaron sus autores.

Zardoya et al. (1996) proponen a las MFRs como marcadores genéticos en un estudio filogenético con peces cíclidos (Cichlidae). Enuncian a estos marcadores no sólo como válidos

para estudios de poblaciones de forma rápida y poco costosa, si no que además como capaces de aportar información filogenética entre poblaciones distantes, precisa y absoluta por ser monocopia.

Relevancia ecológica y aplicaciones futuras

M. faveolata (Ellis y Solander 1786) es uno de los constructores arrecifales más importantes en el Caribe y Atlántico occidental, y uno de los hospederos más flexibles conocidos hasta la fecha. Rowan y Knowlton (1995) estudiaron la diversidad de simbioses dentro de una misma especie de hospedero y su relevancia ecológica, mostrando a través de estudios de polimorfismo de restricción por primera vez la zonación de los simbioses a lo largo de un gradiente de profundidad (intra e intercolonial) en las dos especies del género *Montastraea* mayoritarias en el Caribe (*M. annularis* y *M. faveolata*). Encontraron en ambos casos una simbiosis polimórfica con tres clados de *Symbiodinium* (A-C) distribuidas según un patrón constante correlativo a la profundidad (Figura 4), donde el filotipo A domina las zonas someras (0-3 m) de *M. faveolata*, B en *M. annularis*, y a mayores profundidades en ambos casos domina el filotipo C.

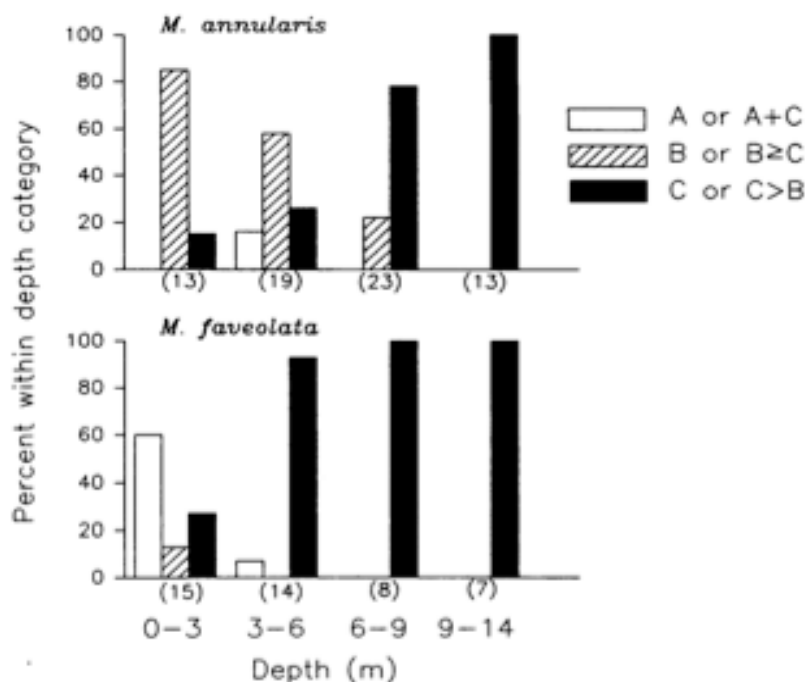


Figura 4. Ocurrencias relativas de distintos filotipos de “zooxantela” extraídas de muestras individuales de *M. annularis* y *M. faveolata* a lo largo de un gradiente de profundidad (Rowan y Knowlton 1995).

En 1997, Iglesias-Prieto y Trench ratificaron la zonación vertical predecible de la simbiosis *Symbiodinium* spp.-coral correlacionándola con las distintas capacidades fotoaclimatorias de cada especie de *Symbiodinium* estudiada, y determinando el gradiente de fotones como la fuerza motriz para la diversificación de nichos que conlleva la distribución natural de la simbiosis. Así, y según ellos, sería razonable esperar variaciones en la abundancia de cada tipo de simbiote en

correlación con el ambiente lumínico, como respuesta adaptativa hacia el fenotipo que mejor optimice los beneficios para el holosimbionte dadas unas condiciones ambientales concretas.

Cada simbiote aporta un compromiso beneficio-riesgo al holosimbionte, definiendo el beneficio o rendimiento como desempeño esperado, sea velocidad reproductiva o tasa de producción de biomasa. Kitano (2007) propone una equivalencia entre riesgo y fragilidad, y lo define como el grado bajo el cual la tasa de crecimiento o producción de biomasa queda afectada por una perturbación. El inverso de fragilidad es robustez, definida como la capacidad de dicho sistema para mantener sus funciones ante perturbaciones tanto internas como externas, y entendida a través de la introducción de sucesivos eventos retroalimentativos que regulan y hacen el sistema biológico más complejo y por tanto más estable ante las perturbaciones a las que se enfrenta cotidianamente. Kitano explica que un sistema evolutivamente robusto, el hospedero, es capaz de incrementar su flexibilidad ante posibles perturbaciones ambientales asociándose con uno o más organismos, los simbioses, sin renunciar por ello a su robustez. Según este razonamiento, sería lógico pensar que cuantos más tipos distintos de simbioses pueda un hospedero albergar, mayor será el rango ambiental que el conjunto u holosimbionte podrá ocupar y más robusto será capaz de ser en todo el espectro de perturbaciones posibles.

A lo largo de la superficie de una colonia madura de un coral de crecimiento masivo como es *M. faveolata*, con varios metros de largo, existe un gradiente lumínico vertical que hace que las condiciones lumínicas en la parte apical de la colonia sean distintas a las de la zona basal. Como resultado de la absorción y el esparcimiento de la luz solar en el agua, la irradiancia (E) disminuye con la profundidad siguiendo un patrón exponencial explicado por la Ecuación 1 donde E(z) y E(0) son los valores de irradiancia a la profundidad z y justo debajo de la superficie respectivamente, y Kd es el coeficiente de extinción vertical.

$$E(z) = E(0)e^{-K_d z}$$

Ecuación 1 (Kirk 1994)

Sin embargo, existe otro gradiente más sutil pero aún más relevante a esta escala que depende de la posición tridimensional de los pólipos en la colonia. Según la Ley del Coseno de Lambert, a medida que el ángulo del flujo radiante cambia, el área de luz proyectada sobre una superficie también lo hace consecuentemente, y por tanto la proporción de flujo inicial que alcanza la superficie (Figura 5). Así, la irradiancia sobre una superficie será proporcional al coseno del ángulo formado entre la superficie y la dirección del flujo.

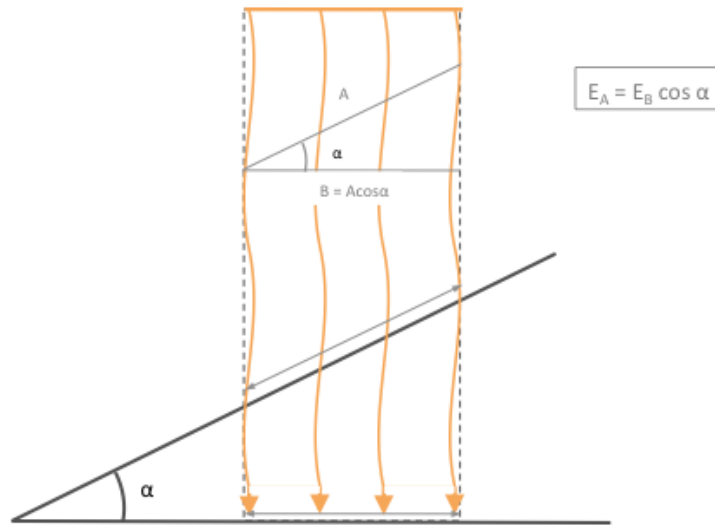


Figura 5. Representación gráfica de un haz de luz directa y su área proyectada a lo largo de una superficie horizontal (B) y otra a α grados de inclinación (A). La ecuación $E(A) = E(B) \cos \alpha$ describe la irradiancia en ambas superficies de acuerdo con la Ley del coseno de Lambert.

En una colonia, la superficie del coral actúa como un sensor de irradiancia corregido por coseno. Así, la inclinación de la superficie con respecto a la inclinación de la luz directa, la hora del día y la estación del año, así como su orientación con respecto al sol, son factores que modificarán, aún por encima de la profundidad, la densidad de fotones que un pólipo estará recibiendo, y por tanto el nicho que las poblaciones de simbiotes habrán de ocupar. Poniendo como ejemplo comparativo un punto de la laguna de Puerto Morelos, donde a la hora del zenit de cierto día del año existe una irradiancia subsuperficial (E_0) de $2000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y un coeficiente de extinción (K_d) de 0.16, se aplicó la Ecuación 1 para estudiar las irradiancias en a) un rango de profundidad y b) un rango de inclinaciones con respecto a la normal de la luz incidente (0°). Los cambios de irradiancia son más marcados a lo largo del gradiente de inclinaciones dada una misma profundidad, que con la misma inclinación en un gradiente de profundidad (Figura 6). Por ejemplo, una superficie de coral normal a la luz incidente (0°) a una profundidad de cinco metros, dispondrá de la misma densidad de fotones por unidad de tiempo que la misma superficie, inclinada 50° a 2 metros, o inclinada 60° en superficie. Por lo tanto, potencialmente podremos encontrar la misma comunidad simbiote en estos tres casos (Figura 6).

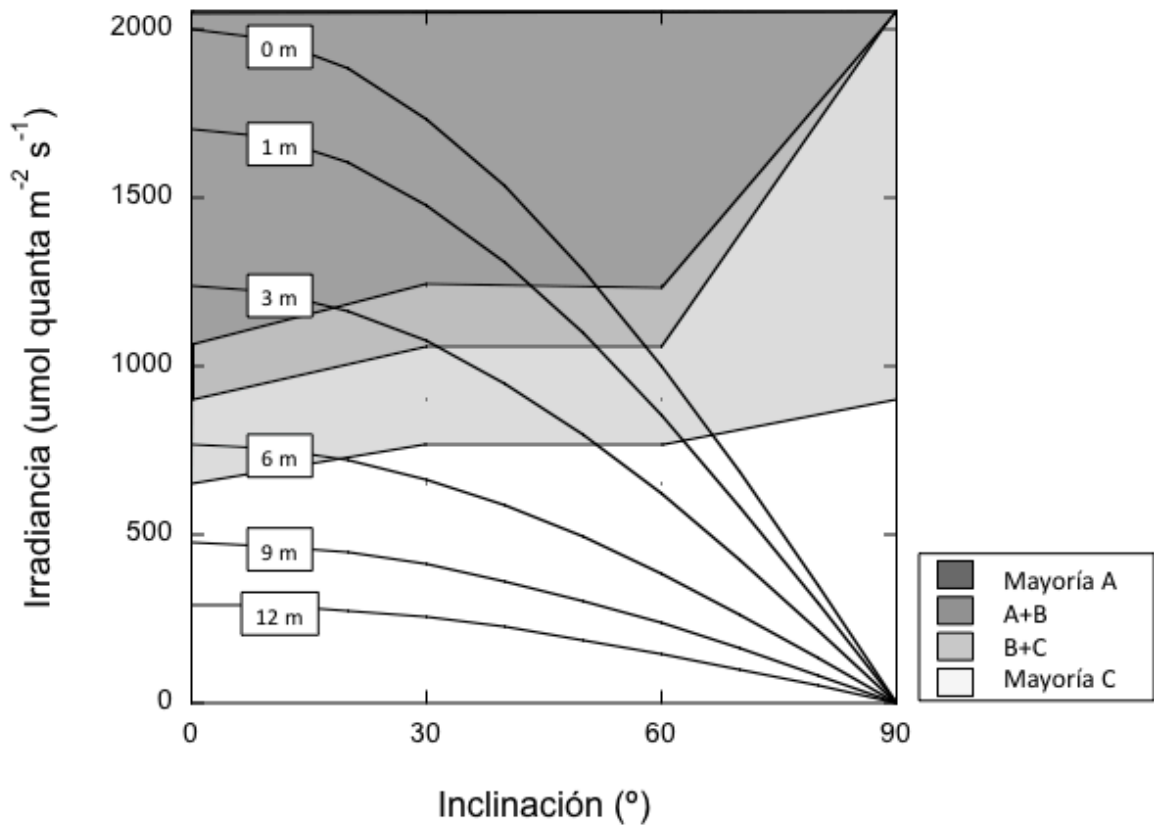


Figura 6. Relación de las irradiancias calculadas para seis profundidades a lo largo de un gradiente de inclinación. Las áreas sombreadas representan los nichos ocupados por los clados A, B y C en *M. annularis* a lo largo de un gradiente de irradiancias (Modificado de Rowan et al. [1997]).

Kemp et al. (sometido, 2012) documentaron por gradiente de desnaturalización cinco tipos ITS2 distintos (A3, B1, B17, C7 y D1a) de *Symbiodinium* en simbiosis simultánea con una única colonia de *M. faveolata* en el arrecife de Puerto Morelos, colonia monitoreada a lo largo de cinco años. Los autores verificaron un patrón de zonación constante salvo en eventos de blanqueamiento (Figura 7) patrón que no sólo se correlacionaba verticalmente con el coeficiente de extinción, sino que también en función de la orientación y la inclinación de las superficies. Sin embargo, las técnicas moleculares empleadas sólo fueron capaces de dar información de las dominancias y no de su abundancia relativa o de la existencia de poblaciones crípticas.

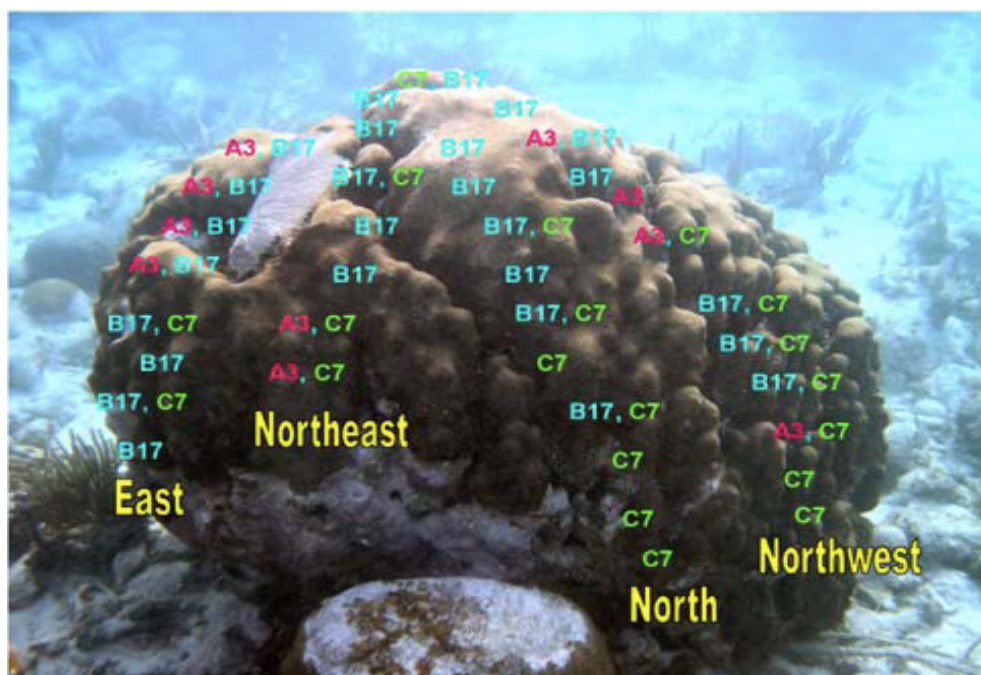


Figura 7 Patrón de zonación de tres tipos de *Symbiodinium* identificados por PCR-DGGE en una colonia de *M. faveolata* del arrecife de Puerto Morelos, a lo largo de tres transectos verticales con orientaciones norte, noreste, noroeste y este (Kemp et al. 2008).

Dada la firme intención de continuar trabajando en el entendimiento de la dinámica de cada uno de los cuatro clados de *Symbiodinium* en simbiosis con el coral caribeño *M. faveolata* como resultado directo del gradiente lumínico a pequeña escala, y dada la ineficacia hasta la fecha en la detección de estas poblaciones con la precisión necesaria para determinar dichos cambios, se propuso diseñar una técnica molecular capaz de completar los estudios de Rowan et al. (1997), Kemp et al. (2012, sometido), y de verificar las teorías de Trench e Iglesias-Prieto (1997).

Preguntas

¿Es posible diseñar oligonucleótidos y sondas TaqMan suficientemente específicos para amplificar diferencialmente clados genéticos de una muestra de *Symbiodinium*?

¿Es posible cuantificar el porcentaje de cada uno de los cuatro clados de *Symbiodinium* amplificados simultáneamente en una muestra de *M. faveolata*?

¿Es posible observar los cambios en las poblaciones de *Symbiodinium* en simbiosis con una colonia de coral *M. faveolata* y poder relacionarlos con respuestas fisiológicas?

Objetivos

Objetivo general:

Detectar y cuantificar poblaciones de dinoflagelados pertenecientes a los clados A, B, C y D de *Symbiodinium* presentes en muestras naturales del coral hospedero *M. faveolata*.

Objetivos particulares:

1. Desarrollar pares de oligonucleótidos o cebadores específicos y sondas TaqMan asociadas para la amplificación diferencial de los clados A, B, C y D de *Symbiodinium* existentes en *M. faveolata* a partir de las regiones flanqueantes de microsátélites.

2. Desarrollar un protocolo de PCR en tiempo real (qPCR) para la detección cuantitativa de la abundancia relativa de cada clado y definir parámetros de resolución, rango y eficiencia para los oligonucleótidos diseñados.

3. Cuantificar la concentración de ADN perteneciente a cada clado de *Symbiodinium* presente en muestras naturales de dos colonias de *M. faveolata* que han respondido de forma distinta ante un evento de estrés inducido.

Metodología

1. Colecta y procesado de muestras naturales

Se colectaron 40 muestras naturales a partir de colonias previamente estudiadas y a lo largo de distintos puntos del arrecife de Puerto Morelos, México (Cuadro 3) con martillo y cincel y trasladadas en agua de mar a la UASA de Puerto Morelos. De cada muestra se raspó un área de aproximadamente 1 cm² que se homogeneizó con una cuchilla y transfirió junto con 500 µL de búfer (0.25 M EDTA, 20% DMSO, H₂O saturada en NaCl) (Seutin et al. 1991) a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL dispersando totalmente el tejido. Las muestras se centrifugaron 5 min a 12,000 rpm en una microcentrífuga Heraeus Biofuge Pico (DJB Labcare Ltd., Buckinghamshire, England) para precipitar fragmentos de esqueleto y otras sustancias insolubles. Las células se rompieron mecánicamente junto con una sustancia amortiguadora de lisado (0.2 M Tris, 0.2 mM EDTA, 0.7% SDS, pH 7.6, según el protocolo de preparación Wizard DNA Promega, Madison, WI, EEUU) con un disruptor celular Mini BeadBeater 16 (BioSpec Products, Inc. Bartlesville, OK, EEUU) y 300-400 µL de perlas de cristal (0.5 mm de diámetro) durante dos ciclos de 60 s cada uno y una incubación en hielo intermedia para bajar la temperatura.

2. Genotipado de las muestras

2.1 Extracción de ADN total

La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de preparación Wizard DNA (Promega, Madison, WI, EEUU) modificado por LaJeunesse et al. (2003) con un paso de purificación con fenol:cloroformo (Toonen 1997). Una vez que la muestra se homogeneizó en el disruptor, se incubó a 65 °C junto con 0.1 mg mL⁻¹ de Proteinasa K durante una hora agitándose cada 15-20 min. Una vez transcurridos, se precipitaron las proteínas 10 h en el congelador con 260-360 µL (dependiendo del color de la muestra, que se hará opaco debido a impurezas) de una solución de 9M acetato de amonio. Con cuidado de evitar la pastilla (pellet), el sobrenadante de cada muestra se cambió de tubo y mezcló con el mismo volumen de una solución 1:1 de fenol:cloroformo (Toonen 1997), que inmediatamente se agitó y centrifugó durante 10 min a máxima velocidad. La capa acuosa de fenol contiene el ADN limpio, separándolo por densidad de la inferior orgánica (cloroformo, proteínas, polímeros y carbohidratos) (Figura 8). Se extrajeron con sumo cuidado 600 µL de la fase acuosa para, en un tubo nuevo, mezclarlos con 700 µL de isopropanol (2-propanol, 100%) y 25 µL de 3M acetato de sodio para precipitar los ácidos nucleicos de la solución. Tras una incubación en hielo de 10 h y una centrifugación de 5 min a 12 500 rpm, todo el ADN se obtuvo precipitado en una pastilla incolora al fondo del tubo. Se succionó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µL de EtOH al 70% que tras centrifugarse de nuevo, fijó el ADN total. El ADN total se dejó secando durante 10 h para luego resuspenderse en 80 µL de ddH₂O. La calidad del extracto y concentración final de ácidos nucleicos se verificó con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA).

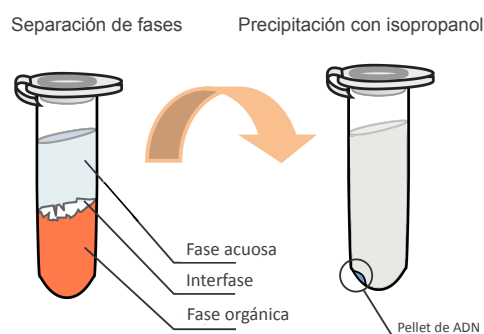


Figura 8. Separación de fases durante la extracción por fenol:cloroformo y subsecuente precipitación con isopropanol.

2.2 Amplificación de la región ITS2 y huella genética en DGGE

El ITS2 del ADN del alga presente en el ADN total extraído se amplificó por PCR (LaJeunesse 2002; LaJeunesse et al. 2003) para analizarse posteriormente por electroforesis (DGGE, [LaJeunesse y Trench 2000]) usando un cebador reverso, el *ITSRev* (Coleman et al. 1994) modificado con una pinza GC de 40 bp (subrayada) en el extremo 5' denominado "*ITS2CLAMP*" (Sheffield et al. 1989) (5' CGCCCG CCGCGC CCGCG CCGTC CCGCCG CCCCG CCCGGG ATCCAT ATGCTT AAGTTC AGCGGGT 3') y un cebador hacia adelante *ITSFor* (5' GGG ATC CGT TTC CGT AGG TGA ACC TGC 3'). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador

MultiGene Mini (Labnet International, Inc.) con un protocolo de amplificación en *touchdown* modificado de LaJeunesse et al. (2003) y basado en una desnaturalización inicial (94 °C, 4 min) seguida por 20 ciclos (94 °C, 30s; T, 45s; 72 °C, 30s) en los cuales se disminuirá 0.5 °C la temperatura en cada ciclo (T), empezando 8 °C por encima de la temperatura de alineamiento final de los cebadores (52 °C) para continuar con otros 20 ciclos manteniendo la temperatura de alineamiento (52 °C). El alargamiento final se extiende por 10 min a 72 °C para terminar a temperatura ambiente (22 °C). Este protocolo tiene como objetivo incrementar la especificidad de la pareja de cebadores y la resolución de la amplificación (Don et al. 1991). Las mejores amplificaciones se dieron bajo volúmenes de reacción de 25 µL consistentes en 10 µM oligonucleótidos, 25 mM MgCl₂, 2.5 mM dNTPs, 10X MTP Taq buffer y MTP Taq DNA Polymerase, a lo que además se le añadió 1 µL de BSA (0.5 mg ml⁻¹), todo ello de Sigma (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA). La BSA (por sus siglas en inglés, *bovine serum albumin*) previene la inactivación de la polimerasa Taq por inhibidores de distinta naturaleza, facilitando la amplificación del ADN molde (Kreader 1996). Se verificó la amplificación en un gel de 0.8% agarosa corrido a 80V por 8 min y teñido con una solución de bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹). Se consideró amplificación positiva a aquella muestra cuyo producto de PCR aparece como una línea brillante, bien perfilada y diferenciada de los dímeros de oligonucleótidos.

La electroforesis de los productos de PCR se llevó a cabo en un gel de 8% poliacrilamida con un gradiente de desnaturalización del 45% (3.15 M urea, 16% formamida des-ionizada) hasta 80% (5.6 M urea, 30% formamida des-ionizada) junto con un amortiguador de cargado (2% Ficol 400, 10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1mM EDTA, 1% azul de bromofenol), separados durante 16 h a 115 V y bajo temperatura constante de 60 °C en un equipo CBSScientific (Del Mar, CA, EEUU). El gel se dejó teñiendo con Sybr Green (Molecular Probes, Eugene, OR) durante 40 min siguiendo las especificaciones del fabricante. Para cada muestra, el perfil de DGGE y la migración de la banda dominante fueron comparados con bases de datos ya existentes, así como con controles de huella conocida (*estándares*). Cada huella queda definida con un código alfa-numérico en donde la letra mayúscula inicial designa el clado, seguido por un número que indica el tipo ITS2 y en ocasiones también una letra minúscula que indica la secuencia de una copia intragenómica de ITS. LaJeunesse et al. (2004a) detallan los protocolos empleados para interpretar y caracterizar las huellas genéticas obtenidas por PCR-DGGE.

3. Elección de loci específicos

Se comprobó la especificidad de una serie de pares de oligonucleótidos publicados o sin publicar (Cuadro 4) y se eligieron aquellos capaces de amplificar preferentemente un clado sobre los demás. Se verificaron los oligonucleótidos a través de la amplificación en muestras naturales (Cuadro 3). El protocolo de PCR para cada par de oligonucleótidos fue optimizado a partir de sus temperaturas de fusión (*T_m*) individuales. Así, las condiciones de amplificación consistieron en: un ciclo inicial de desnaturalización (94 °C, 4 min), 31 ciclos (94 °C, 30 s; temperatura de alineamiento [Cuadro 4], 30 s; 72 °C, 45 s) y una extensión final (72 °C, 5 min). Las concentraciones de los

reactivos se mantuvieron constantes con respecto al punto anterior (2.2 *Amplificación de la región ITS2 y huella genética en DGGE*) y los productos de PCR obtenidos fueron confirmados en un gel de 0.8% agarosa teñido con una solución de bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}) y corrido a 80V por 8 min. Resultado positivo y especificidad comprobada será aquel juego de oligonucleótidos capaz de amplificar la secuencia diana del clado específico pero ninguna de los otros clados.

4. PCR en tiempo real

4.1 *Diseño de oligonucleótidos y sondas TaqMan específicas para cada clado a partir de los loci seleccionados*

A partir de las regiones flanqueantes de cada microsatélite elegido (Cuadro 4), se diseñaron pares de oligonucleótidos y sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Cuadro 5). Se diseñaron nuevos juegos de oligonucleótidos debido a la necesidad de cumplir los criterios abajo especificados, además de que las regiones amplificadas por los oligonucleótidos iniciales no son suficientemente amplias para alojar una sonda y asegurar que esta sonda no comience dentro del microsatélite. Pese a que las regiones flanqueantes del microsatélite están más o menos conservadas entre especies cercanas, los microsatélites son repeticiones en general polimórficas para individuos. Por tanto, y aunque la sonda puede tocar el microsatélite, no es una buena idea que comience en él, pues carecería de la especificidad que requerimos, pudiendo amplificar a ciertos individuos pero no a toda una especie o clado. Las sondas se diseñaron con FAM (6-carboxy-fluorescein) como fluoróforo 5' y BQ-1 (Black Hole, Biosearch Technologies) como *quencher* 3'. Se usó para el diseño Primer 3 a través del software Geneious versión 5.0.3 (Drummond et al. 2009) y siguiendo los siguientes criterios:

a) *Temperatura de fusión (T_m)*. La sonda ha de tener una temperatura de fusión mayor (10 °C, 65-67 °C) que los cebadores (55-60 °C) pues para una amplificación óptima se necesita que las sondas se fijen a la secuencia molde antes que los cebadores. Una vez que la temperatura disminuye y todas las sondas están saturando la muestra en sus respectivos loci, los cebadores se unen a las hebras y la elongación comienza en dirección 5' - 3'. Gracias a la acción exonucleasa de la polimerasa cuando se encuentra con la sonda, ésta se hibrida y se desprende, separando el *quencher* o facilitador del decaimiento de la emisión de fluorescencia (*quenching*) del fluoróforo incrementando la cosecha cuántica de la fluorescencia, que será registrada por los fluorímetros de alta sensibilidad asociados al equipo (Figura 9). Además, las temperaturas de fusión de los cebadores han de ser cuanto más similares mejor para optimizar todo el proceso, y cuanto más semejantes entre sí las distintas temperaturas de los cuatro juegos de cebadores mejor, lo que incrementará la eficiencia del experimento completo.

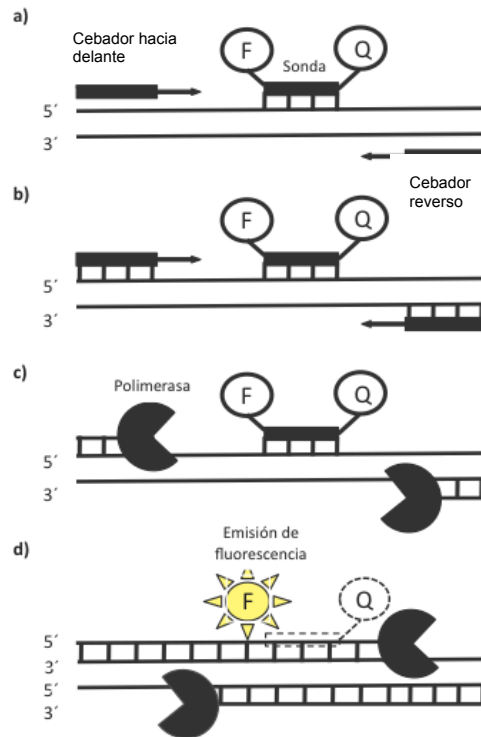


Figura 9. Amplificación del ADN molde por un par de cebadores con la sonda TaqMan correspondiente. a) Fase de alineamiento: la sonda se une a la hebra, b) Fase de alineamiento: los cebadores se unen a la hebra, c) Fase de elongación: la enzima comienza a polimerizar en sentido 5'-3', d) Hibridación de la sonda debido a la acción exonucleasa de la enzima y emisión de fluorescencia por la disociación fluoróforo(F)-quencher(Q).

b) *Amplicón.* El tamaño de los amplicones o productos de PCR se define por la distancia en pares de bases entre los extremos 5' de cada uno de los dos cebadores. Secuencias cortas serán mejor y más fácilmente amplificables (<300 bp con un óptimo ~100 bp) implementando la eficiencia del experimento. Si los amplicones son cortos, los materiales de la PCR tendrán tiempo suficiente para llevar a cabo la reacción, creando producto de PCR siguiendo la curva exponencial deseada y sin llegar a ser en ningún momento factor limitante en la reacción. Además, cuanto más cerca estén los cebadores de la sonda sin traslaparla, mejor.

c) *Sonda interna de hibridación.* Han de tener entre 20 y 30 bp de longitud, evitando largas secuencias de nucleótidos repetidos. Es muy importante que en el extremo 5' no haya una base de guanósina pues actuaría como *quencher* debido a su conformación en forma de anillo, semejante a la del fluoróforo

d) *Cebadores.* Los cebadores han de tener una longitud entre 20 y 24 bp, evitando en lo posible secuencias largas de nucleótidos idénticos y con un porcentaje GC de 20-80% (óptimo 40-60%).

4.2 Protocolo de qPCR

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un equipo ABI StepOne Plus rtPCR System (Applied Biosystems) siguiendo los parámetros universales para la cuantificación con TaqMan (Applied Biosystems) modificados para los oligonucleótidos diseñados: 10 min, 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 58 °C. Cada reacción consiste en 12.5 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL (400 nM) de cada oligonucleótido (reverso y hacia adelante), 2.5 µL (100 nM) de la sonda TaqMan y 5 µL de ADN molde (1 ng µL⁻¹), haciendo un volumen final de 25 µL. La concentración de ADN se obtuvo midiendo espectrofotométricamente su absorbancia a 260 nm con un equipo Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

4.3 Parámetros de la qPCR: línea de base, línea umbral y ciclo umbral de fluorescencia

La *línea de base* (Figura 10) alude al promedio de la amplificación inespecífica inicial. El software SDS StepOne 2.2.1 (Applied Biosystems) la calcula automáticamente de acuerdo con el nivel de ruido en los ciclos tempranos, aquellos en los que no se detecta un aumento en la amplificación debido a la existencia de producto de PCR. La *línea umbral de fluorescencia* (Figura 10), por encima de la línea de base, se define como el nivel de fluorescencia a partir del cual la señal puede dejar de considerarse inespecífica. Pese a ser arbitraria se ha de situar siempre suficientemente abajo en la curva para alcanzar la fase exponencial de la amplificación. El lugar preciso no es crítico, aunque de ello dependerá en parte la calidad de la curva estándar y la reproducibilidad del método. El *ciclo umbral* (Ct, Figura 10) es aquel ciclo en el cual existe un incremento significativo de la señal del fluoróforo, es decir, el ciclo en el cual la curva de crecimiento cruza la línea umbral. Los valores Ct son por tanto inversamente proporcionales a la cantidad inicial de copias del gen amplificado. Valores bajos de Ct significan que la curva de fluorescencia corta el nivel umbral antes, por lo que la cantidad de secuencias molde en la muestra inicial es alta. El software SDS calcula la línea umbral y los valores de ciclo umbral en cada amplificación asumiendo que los datos muestran una curva “típica” de amplificación, visualizando todas las curvas en una escala logarítmica (logaritmo de la fluorescencia contra número de ciclos).

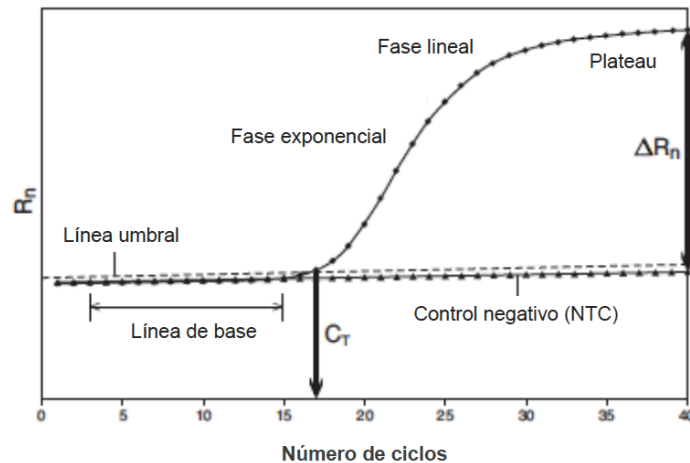


Figura 10. Curva de amplificación típica de PCR en tiempo real con las tres fases: exponencial, lineal y plateau, y los parámetros: línea umbral, línea de base y ciclo umbral. Punteada aparece la curva del control negativo (NTC).

En un análisis de qPCR, la intensidad de la emisión por fluorescencia del reportero (FAM) se mide en RFU (unidades de fluorescencia relativa por sus siglas en inglés) que se recogen tras cada ciclo de amplificación y a lo largo de los 40 ciclos de cada experimento. La primera gráfica que el software construye muestra la fluorescencia normalizada (R_n) a lo largo de los 40 ciclos, es decir, la proporción entre las RFU del reportero de la sonda y las RFU del reportero pasivo (ROX). Para encontrar manualmente la línea umbral, el SDS software calcula la delta R_n (ΔR_n , Figura 10), es decir, una vez que la línea basal es restada a los datos de fluorescencia (R_n) y tomando la línea basal como la señal de fluorescencia normalizada de los ciclos iniciales.

4.4 Eficiencia de los cebadores y sondas

La eficiencia de la amplificación es la fracción de moléculas de doble cadena de ADN que se copian en un ciclo dado. Se evaluó la eficiencia para cada juego de cebadores/sonda a través del método de cuantificación absoluta que implica la creación de una curva estándar o de calibración en la que se relaciona linealmente el logaritmo de la concentración de ADN existente en diluciones seriadas con el valor de fluorescencia (Figura 11). La concentración de ADN de los estándares se resolvió con un equipo NanoDrop ND-1000. Se evaluó la relación lineal obtenida a través de un análisis de regresión (Ecuación 2) y gracias a la pendiente de la curva se estimó la eficiencia de la amplificación (Ecuación 3). Se hicieron un total de tres curvas de calibración por cada estándar junto con tres controles negativos (sin ADN molde) para evaluar la señal de fluorescencia no específica. Se construyeron las curvas de calibración a partir de ADN extraído de cultivos o de muestras de ADN único (Cuadro 1) y normalizado a $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ a partir de las que se hicieron cinco diluciones seriadas ($10-0.001 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). A partir de la ecuación de la recta de regresión de la curva de calibración (Ecuación 2) y aplicando la Ecuación 3 (Kubista et al. 2006) se obtiene la eficiencia de la amplificación para el juego de oligonucleótidos y sonda específicos.

Además, la ecuación de la recta se utiliza para calcular la cantidad de ADN molde desconocido por interpolación en la curva de calibración (Figura 11).

Cuadro 1. Descripción de las muestras de ADN de *Symbiodinium* usados como controles positivos de cada clado. Incluye número de clon, hospedero con orden entre paréntesis, lugar de colecta y tipo ITS2.

Clado	Clon #	Hospedero	Origen	ITS2
A	174	<i>Tridacna maxima</i> (Bivalvia)	Pacífico Occidental	A3
B	351	<i>Pocillopora damicornis</i> (Scleractinia)	Pacífico Oriental	B1
C	152	<i>Discosoma</i> sp.(Corallimorpharia)	Caribe	C1
D	BAJA	<i>P.verrucosa</i> (Scleractinia)	Pacífico Oriental	D1a

Ecuación 2. Ecuación general de una recta donde m es la pendiente y b es el punto de corte con el eje Y. Y ecuación de la recta de calibración donde la Y es el ciclo umbral y X es el logaritmo de la concentración de ADN.

$$Y = -mx + b$$

$$C_t = -m * \log [\text{ADN}] + b$$

Ecuación 3. Eficiencia de la amplificación a partir de la pendiente de la curva de calibración.

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1 / \text{pendiente})} - 1$$

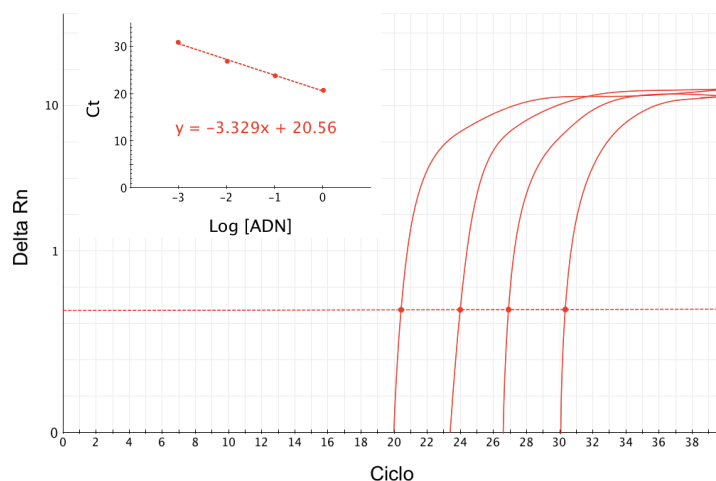


Figura 11. Representación gráfica en escala logarítmica de ΔR_n vs. Ciclo de cuatro curvas de amplificación en qPCR pertenecientes a cuatro diluciones seriadas ficticias con el umbral constante a 0.1. En el cuadro superior aparece la recta de calibración que enfrenta cada ciclo umbral con el logaritmo de la concentración de ADN inicial en cada dilución.

4.5 Especificidad de los cebadores y sondas

Se confirmó la especificidad de los cebadores a través de: a) la falta de amplificación en PCR de muestras no correspondientes al clado característico del par de cebadores, y b) la formación de un producto de PCR único en aquellas muestras pertenecientes a dicho clado (Cuadro 3); en cultivos puros usados como controles positivos (Cuadro 1). La especificidad de

cada par de cebadores también se comprobó por qPCR con los estándares como controles positivos (Cuadro 1).

Las mezclas nos definen resolución y especificidad. Se crearon dos juegos de mezclas: AB, a partir de la mezcla volumétrica de una misma dilución de los estándares A174 y B351 (Cuadro 1); y CD. Para las mezclas CD se usaron muestras de *Symbiodinium* tipos D1 y C1 aislados por LaJeunesse y Reyes-Bonilla (2007) del coral *Pocillopora verrucosa* procedente del Pacífico oriental. Las muestras se extrajeron de colonias individuales de *P. verrucosa* homogéneas para un único filotipo simbiote (dentro de la resolución del método PCR-DGGE [Thornhill et al. 2006a]), dominancia luego confirmada por qPCR. Se generaron cinco mezclas de cada conjunto (0.1-99%). En cada análisis se amplificó por duplicado cada una de las mezclas y las concentraciones se cuantificaron tomando como referencia las ecuaciones de la curva de calibración para cada clado (Cuadro 6).

Cuadro 2. Concentración parcial y total de cada una de las mezclas AB.

Muestra	Concentración A	Concentración B	Concentración ADNt
1	0.01	0.99	1
2	0.1	0.9	1
3	0.5	0.5	1
4	0.9	0.1	1
5	0.99	0.01	1

5. Cuantificación

Se extrajo el ADN total de cuatro muestras extraídas de dos colonias de *M. faveolata* en el arrecife de Puerto Morelos. Una muestra de cada colonia fue preservada antes de inducir un evento estresante por temperatura (T_0 *preblanqueamiento*), y al cabo de 10 días de tratamiento y 30 de recuperación se preservaron otras dos (T_5 *postblanqueamiento*). Se cuantificaron los cuatro tipos de ADN de *Symbiodinium* presentes en las cuatro muestras por duplicado usando las ecuaciones obtenidas de las curvas de calibración para cada uno de los cuatro juegos oligonucleótidos-sonda.

Resultados

1 Análisis genético de la comunidad simbiote dominante presente en las muestras colectadas.

En general se desecharon aquellas muestras cuyo ADN total resultó ser inferior a 10 ng mL^{-1} . De las 40 muestras iniciales se consiguió amplificación positiva de la región ITS2 en 30 de ellas (Cuadro 3), con una concentración media de 358.2 ng mL^{-1} y una razón de absorbancias a 260/280

nm media de 1.9, relación que determina la pureza respecto al óptimo de 1.8 establecido para ADN. Todos aquellos productos de PCR que aparecieron positivos en la agarosa dieron lugar a un perfil de DGGE bien diferenciado (Figura 12). De entre el total de 30 perfiles, 16 mostraron un genotipo único (p.e. 3N3, 3N4), mientras que el resto presentaron mezclas (p.e. B4, B5).

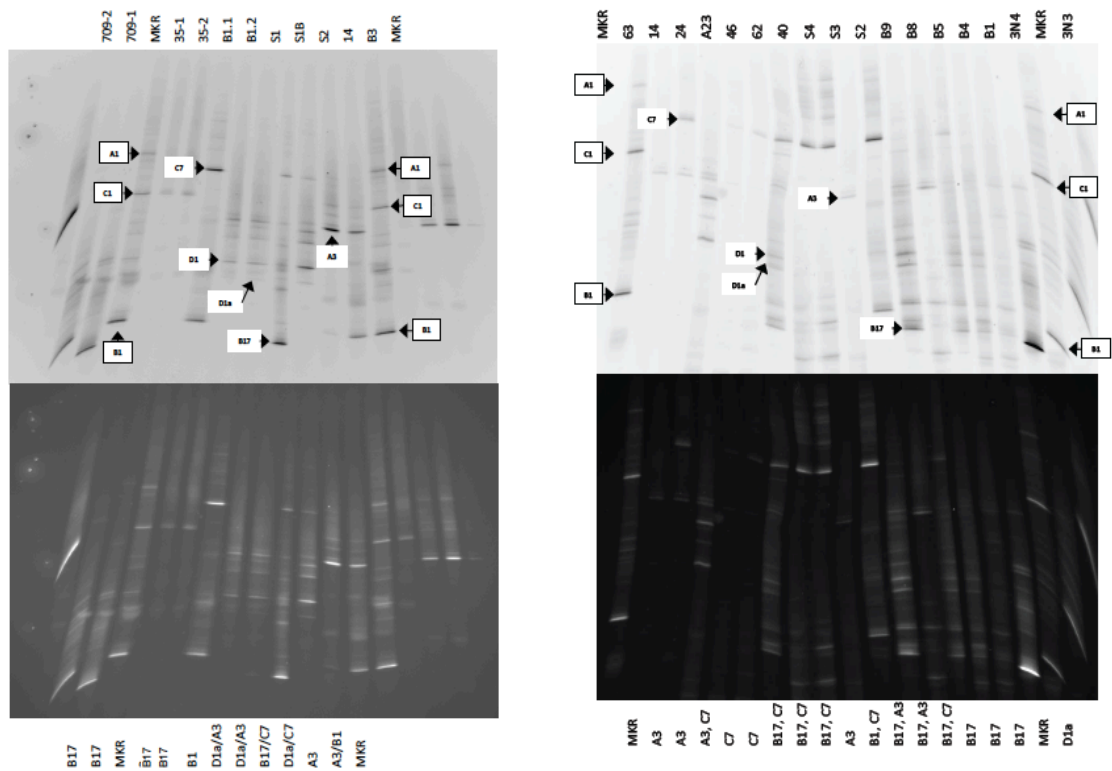


Figura 12. Perfiles de PCR-DGGE o huella genética. En el margen superior aparece el nombre de la muestra (Cuadro 2) correspondiente a cada carril, mientras que en el margen inferior se identifica su genotipo. Los recuadros en blanco sin borde identifican los cinco posibles genotipos encontrados, los recuadros con borde negro corresponden al marcador (MKR) de genotipo conocido y que actúan como estándares para la identificación.

Cuadro 3. Lista de muestras extraídas, localización, profundidad de muestreo (m), especie de hospedero extraído, concentración de ADN total (ng mL⁻¹), pureza (razón de absorbancia a 260/280 nm) e identidad genética (PCR-DGGE).

Muestra	Localización	Profundidad	Hospedero	ADN total	Pureza	Tipo ITS2
3N4	Bocana	3	<i>M. faveolata</i> (Scleractinia)	77.48	1.87	B17
3N3	Bocana	3	" "	107.68	1.89	D1a
B3	Bocana	3	" "	232.73	1.96	A3/B1
B4	Bocana	3	" "	476.92	1.89	B17
B5	Bocana	3	" "	302.98	1.97	B17
B8	Bocana	3	" "	307.39	1.93	A3/B17
B9	Bocana	3	" "	50.45	1.9	B17
S1	Spa	4	" "			D1a
S2	Spa	4	" "	831.43	1.97	D1a
S3	Spa	4	" "	992.27	1.93	A3
S4	Spa	4	" "	295.16	1.89	C7
40	Petempitch	5	" "	101.75	1.99	C7
62	Petempitch	5	" "	210.02	1.97	C7/B17
46	Petempitch	5	" "	153.25	1.99	C7
24	Petempitch	5	<i>M. annularis</i> (Scleractinia)	211.75	1.99	A3
14	Petempitch	5	" "	159.74	1.94	A3/C7
63	Petempitch	5	" "	136.18	1.92	A3
A23	Petempitch	5	<i>M. faveolata</i> (Scleractinia)	124.09	1.95	C7
Ma2.2	Petempitch	5	" "	46.21	1.89	C7
Ma2.3	Petempitch	5	<i>Montastrea</i> <i>annularis</i> (Scleractinia)	63.6	1.97	C7
Mf2.2	Petempitch	5	" "	36.6	1.96	A3
Mf1.2	Petempitch	5	<i>Montastrea</i> <i>faveolata</i> (Scleractinia)	26.89	2.02	A3
Ma1.2	Petempitch	5	" "	26.88	1.78	A3
Ma1.1	Petempitch	5	" "	21.37	2.06	C7
B1.2	Bocana	3	<i>Montastrea</i> <i>faveolata</i> (Scleractinia)	2184.92	1.86	D1a
B1.1	Bocana	3	" "	1712.95	1.89	C7/B1
B1.3	Bocana	3	" "	2509.9	1.91	B17
B1.4	Bocana	3	" "	1728.06	1.9	B17

La banda diagnóstico o dominante es la más distintiva de cada perfil y la que identifica el genotipo de la muestra. Puede además tener una segunda banda menos pronunciada acompañándola que define la especie. Estas dos bandas son las más resistentes a la desnaturalización y por tanto las que más avanzan en el gel. Las demás bandas son de menor intensidad y pueden ser debidas a heterodúplex (HET, Figura 13) formados por la desnaturalización y re-alineamiento de hebras de ADN heterólogo durante el proceso de amplificación (Myers et al. 1985). La electroforesis por DGGE es capaz de diferenciar mutaciones

de hasta un par de bases (p. e. D1 y D1a, Figura 13). En caso de encontrar dos bandas diagnóstico puede indicar la presencia de mezclas (Figura 13).

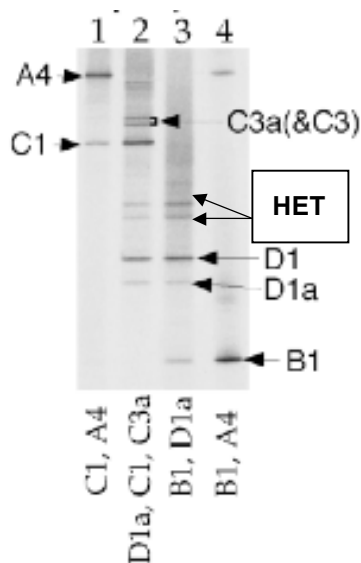


Figura 13. Ejemplo de huellas genéticas y su interpretación. En la parte superior aparece el nombre de las muestras correspondientes a cada carril (1-4), en la parte inferior su genotipo, y las flechas identifican el genotipo de cada banda. También aparecen indicados los heteroduplexes (HET), siempre de menor intensidad que las bandas mayoritarias (LaJeunesse 2002).

2 Elección de loci específicos

Se verificó la amplificación de ADN extraído de algas en cultivo (estándares) y de muestras naturales por parte de un total de 14 pares de cebadores publicados y sin publicar, de los cuáles se eligieron aquellos cuatro loci (Cuadro 4) que obtuvieron amplificación específica con mejores resultados en agarosa. Se consideró amplificación positiva a una única banda discreta y uniforme y en ausencia de dímeros.

Cuadro 4. Loci específicos elegidos para cada clado (A, B, C y D), microsecuencia repetida dentro de la secuencia, secuencias hacia adelante (F) y reversa (R) de cada par de cebadores, temperatura de alineamiento (°C), número de acceso del GenBank y referencia (en caso de estar publicados).

Clado	Cebador	Microsatélite	Secuencia 5'-3'	Ta	GenBank	Referencia
A	A3Sym28	(GAT) ₆	F: CGAGCCCGCCAAAGCTTCGAGGTT R: TGACCCAGAGTTATCAGTGATCG	52	HM802880	Pinzón et al. (2010)
B	B7Sym15	(TG) ₈₋₁₄	F: CTCACCTTCAAATCAGTAGCCA R: CGTAGCTTCTGAAGGTACGACAC	55	EF212868	Pettay y LaJeunesse (2007)
C	C1SymC22L	(TAA) ₅	F: CATGCAATGAGGGATGTGAG R: TCAGTTGTGCACACGAAAAT	54	_____	Wham et al. (2012, en prensa)
D	D1Sym66	(TCT) ₈	F: T1-CTCTGGGATGGACCCCGAA R: GACAGTGTTTCACTGGTCGCA	57	HQ894461	Wham et al. (2011)

3 Diseño de los oligonucleótidos y sondas TaqMan para PCR en tiempo real

Se desarrollaron pares de cebadores y sondas a partir de las regiones flanqueantes de los microsatélites elegidos en el apartado anterior, siguiendo los criterios especificados en el apartado de *Metodología* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Secuencias diseñadas a partir de las regiones flanqueantes de microsatélites para cada clado, secuencias 5'-3' hacia adelante (F) y reversa (R) de cada par de cebadores, temperatura de fusión (°C) de los cebadores, longitud del amplicón (bp) y secuencia en sentido 5'-3' de la sonda.

Clado	Secuencia 5' - 3'	Tm	Amplicón	Sonda 5' - 3'
A	F: CAC GAG AAG AGC TGG CGT AG	58	74	FAM-CCCTGAATCCGCATGACCCGACGTGC-BHQ1
	R: ATG AGC AGC AGC ATC ATC GG	58		
B	F: TT TCT TGG TGG CTC TGG TGAT	63	32	FAM-TGCAAACGCAAGGCAACTTTCCCACGTTCA-BHQ1
	R: ATG TCG ACC AGT ACG TGT CCA TC	62		
C	F: CCC AGC AGT CAG CAT GCA AT	59	56	FAM-TCGGAAGCCGAATCGCCCACTCAGGA-BHQ1
	R: GAG GAC CAC GAG GGT GAA GA	59		
D	F: TCG CCT CGG AGA CTC TTG AT	58	137	FAM-CGGCAACAAGAACGTCAGGCTCGCCA-BHQ1
	R: CAG CTG ATG CTG CTG CTG TA	58		

La longitud de los oligonucleótidos se mantiene constante en casi todos los juegos (20 bp) salvo por el reverso de B (23 bp). Cuanto menor sea la longitud de estos oligonucleótidos mayor será la eficiencia en la amplificación dentro de un rango óptimo de 20 a 40 bp y siempre menor de 300 bp. Según este criterio, los oligonucleótidos diseñados tienen longitudes óptimas para su uso en qPCR. La longitud de las sondas se mantiene para A, C y D con 26 bp, y se incrementa a 30 bp en B. Ambas longitudes están dentro del rango óptimo de 20 a 30 bp. Las secuencias amplificadas (amplicones) son más heterogéneas, yendo desde las 32 bp de B a las 137 bp de C. Los criterios recomiendan amplicones cortos, siempre menores de 400 bp, propiedad que se mantiene en todos los casos. Se establece como óptimos aquellos amplicones entre 50 y 150 bp, de modo que B es el único que estaría, aunque dentro de los parámetros funcionales, ligeramente desfasado. Con respecto a las temperaturas de fusión, los oligonucleótidos de B tienen las temperaturas más altas, alejándose del óptimo de 60 °C según las especificaciones de la enzima, por 2° y 3 °C. No obstante todas las temperaturas son muy similares.

4 Resolución de la qPCR

Precisión: La precisión del método, se pone de manifiesto en las curvas de calibración a través de la desviación estándar entre réplicas y se representa en forma de barras de error verticales en la figura 14. Sin embargo no es concluyente dado el limitado número de réplicas.

Rango de amplificación y límites de detección. Determinar el punto de inflexión en el cual la medida pasa de ser positiva a negativa es fundamental para la validación de los resultados. De este modo, definir aquellos ciclos umbrales que hacen de límite de detección en este experimento requiere de consideración previa y verificación de distintos factores. Las diluciones seriadas aportan esa información. Según el Cuadro 6, ninguno de los cuatro juegos de reactivos son capaces de amplificar concentraciones de ADN purificado de *Symbiodinium* por encima a 1 ng mL⁻¹ y los ciclos umbrales del resto de concentraciones van desde 25.5 ±0.04 en la máxima concentración del estándar de B hasta 28.79 ±0.04 para el estándar de D. El límite mínimo de resolución en todos los casos excepto de B está en 0.001 ng mL⁻¹.

Cuadro 6. Controles positivos de cada clado, número de cultivo, ciclos umbrales promedio para cada concentración de ADN (ng mL⁻¹), desviación estándar del promedio, pendiente y coeficiente de determinación (R²) de cada recta de calibración, y eficiencia de amplificación (%).

Clado	Clon	Concentración	Ct	Pendiente	R ²	Eficiencia
A	# 174	10				
		1	26.97			
		0.1	30.31	-3.062	0.994	112.1 %
		0.01	33.66			
		0.001	36.06			
B	# 351	10				
		1	25.5			
		0.1	28.79	-3.6932	0.996	86.5%
		0.01	32.88			
		0.001				
C	# 152	10				
		1	26.12			
		0.1	29.92	-3.5205	0.9993	92.5%
		0.01	33.22			
		0.001	36.76			
D	# BAJA	10				
		1	28.79			
		0.1	32.06	-3.4760	0.9985	94%
		0.01	35.42			
		0.001	39.26			

Eficiencia. Con el logaritmo natural de las concentraciones de ADN estándar de cada clado y los ciclos umbral extraídos de la amplificación por qPCR (Cuadro 6), se obtuvo una curva de calibración para cada clado (Figura 14). En la figura las barras de error verticales corresponden a la desviación estándar del promedio de las réplicas por dilución (dos en A y B, tres en C y D). El análisis de regresión de cada curva permitió calcular las eficiencias medias de cada juego de oligonucleótidos así como su linealidad (Cuadro 6). Las eficiencias obtenidas van desde 86.5% (pendiente de 3.7) en el clado B hasta 112.1% (pendiente de 3.1) en el clado A, con 92.5 y 94% para C y D respectivamente; las R² van desde 0.994 en A hasta 0.999 para C.

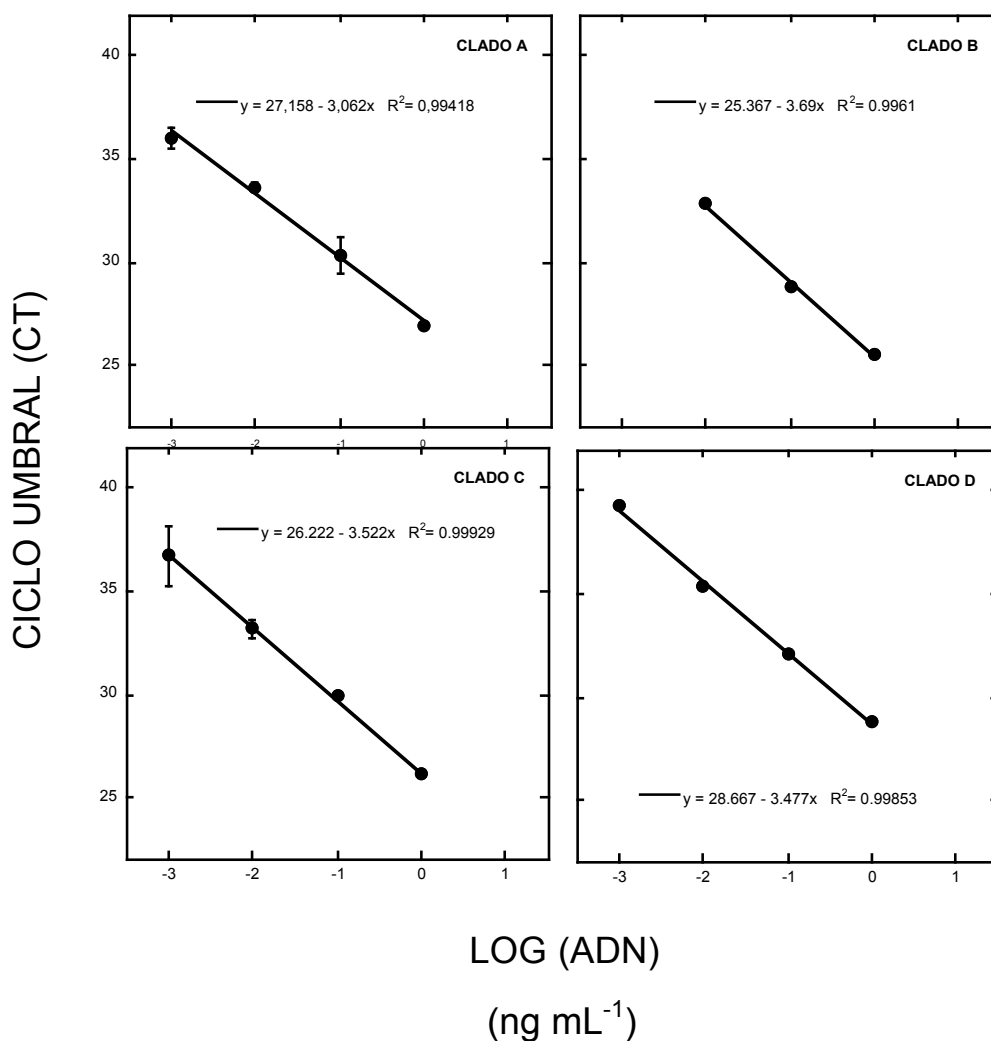


Figura 14. Curvas de calibración con sus respectivos análisis de regresión para cada uno de los clados amplificados (A, B, C y D).

5 Especificidad de la qPCR:

5.1 Amplificación específica

La amplificación específica de los juegos cebador-sonda se comprobó al verificarse la amplificación positiva y exclusiva en el estándar correspondiente, y no en el resto de clados. Tan sólo el juego de sonda y oligonucleótidos de D amplificó tardíamente (Ct=33) al estándar de A, sin embargo, esta amplificación representa tan sólo el 0.001% del total amplificado (Figura 15, columna 1, fila 4).

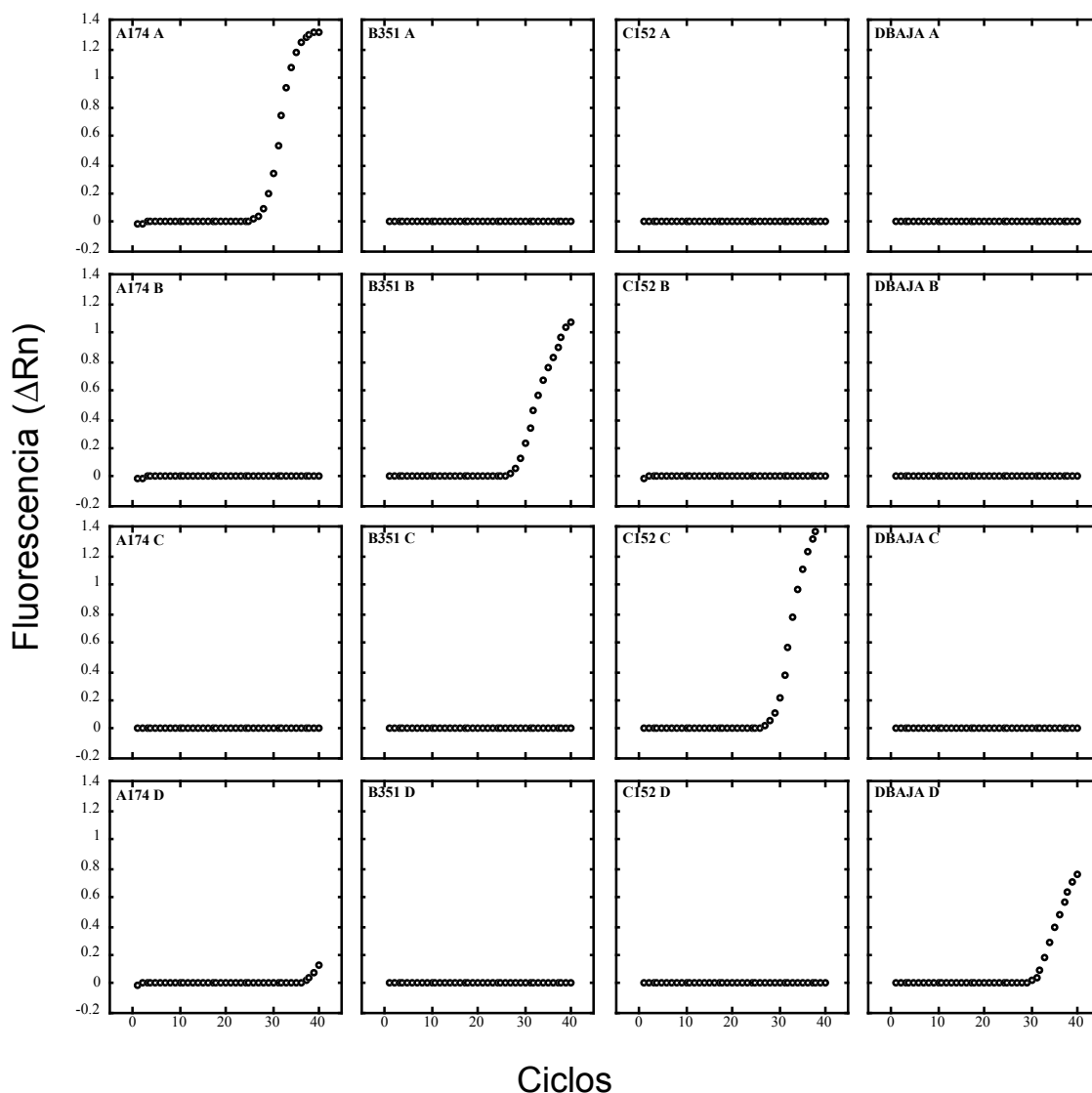


Figura 15. Gráficas de amplificación específica (fluorescencia a lo largo de los cuarenta ciclos de la qPCR) del juego de oligonucleótidos y sonda para A (fila 1), B (fila 2), C (fila 3) y D (fila 4); enfrentados con los estándares de A (columna 1), B (columna 2), C (columna 3) y D (columna 4).

5.2 Amplificación diferencial

Mezclas AB. Se comprobó la amplificación diferencial de cada uno de los dos juegos de reactivos en las cinco combinaciones de estándares (Cuadro 2) para los clados A y B (Figura 16). La precisión de cada juego, representado por las barras verticales de error y calculada con la desviación estándar entre réplicas, para el clado A se mantiene muy baja (1: ± 0.0002 , 2: ± 0.016 , 3: ± 0.008 , 4: ± 0.011) con un máximo en la mezcla más concentrada (5: ± 0.147). Para el clado B, las desviaciones estándar entre réplica son mayores, sin embargo el patrón se mantiene, con un máximo de ± 0.105 en la mezcla más concentrada (1), y un mínimo de ± 0.004 en las menos concentradas (4 y 5). Si se considera la razón C/T (concentración calculada:nominal) como parámetro de la eficiencia de la amplificación (Cuadro 7), una razón de 1 significaría que el 100% de las moléculas de ADN molde incluidas en la muestra serían amplificadas por los oligonucleótidos específicos, y cuantificadas por el equipo de qPCR. Así, en el caso de A se

observan eficiencias muy altas en las concentraciones intermedias (84, 94 y 98% en las mezclas 2, 3 y 4) y con diferencias más notables en las concentraciones máxima (mezcla 5, 135%) y mínima (mezcla 1, 61%). Así pues, salvo en la mezcla 5, el juego de reactivos está subestimando la muestra. Con respecto a B, los reactivos están subestimando la mezcla más concentrada (mezcla 1, 91%) y sobrestimando ligeramente el resto (mezcla 2, 104%; mezcla 3, 110%; mezcla 4, 117%; mezcla 5, 146%) siguiendo un patrón inversamente proporcional a la concentración de ADN molde en la muestra.

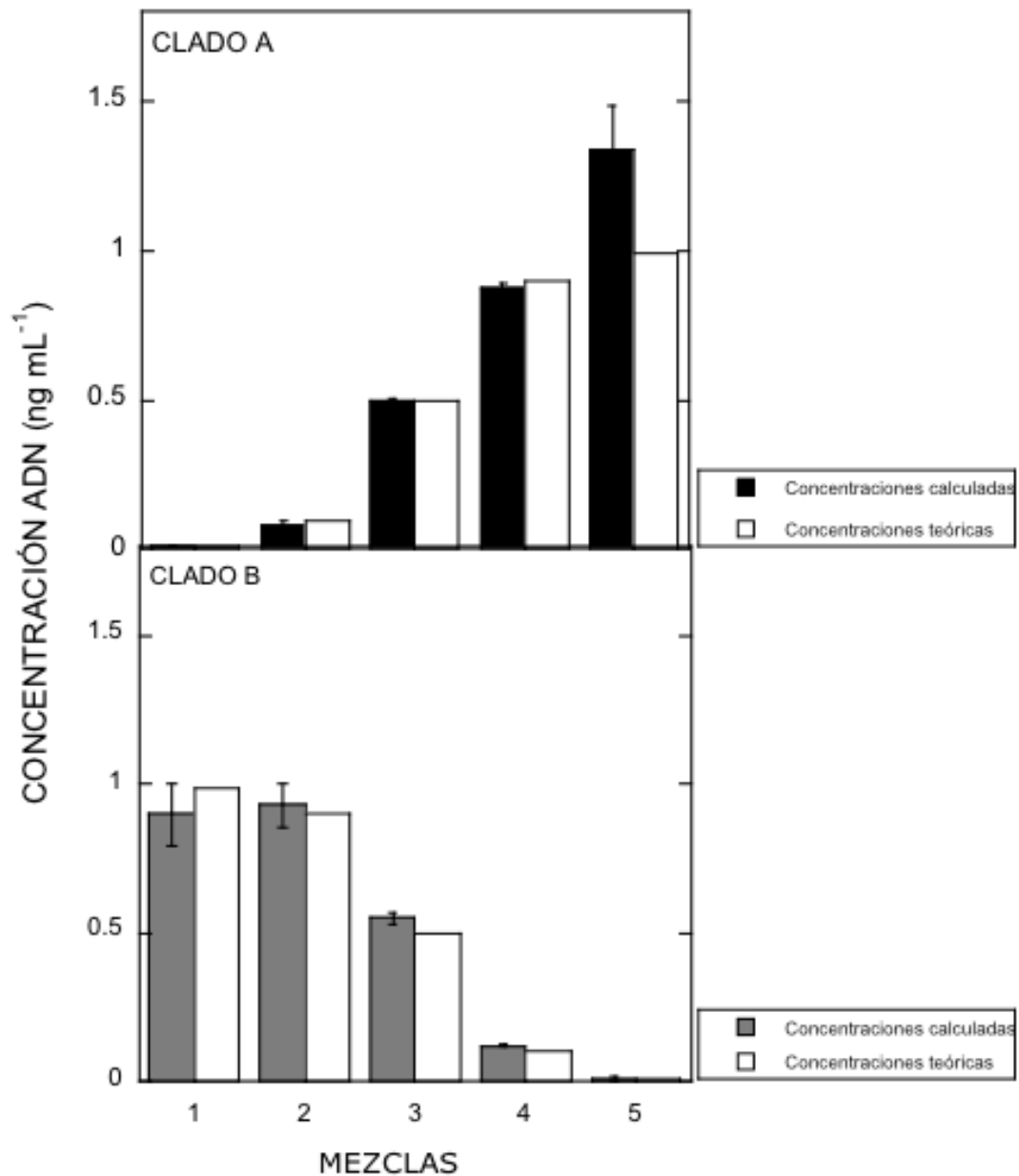


Figura 16. Concentraciones calculadas de cada uno de los dos clados en las mezclas AB comparadas con las concentraciones nominales (1-5 ver Cuadro 2).

Cuadro 7. Concentraciones nominales y calculadas (ng mL⁻¹) promedio para cada una de las cinco mezclas AB y su razón.

Mezcla	Clado	Concentración calculada	Concentración nominal	C/T
1	A	0.01	0.01	0.61
2		0.08	0.10	0.84
3		0.50	0.50	0.99
4		0.88	0.90	0.98
5		1.34	0.99	1.35
1	B	0.90	0.99	0.91
2		0.93	0.90	1.04
3		0.55	0.50	1.10
4		0.12	0.10	1.17
5		0.01	0.01	1.46

Mezclas CD. Desafortunadamente para este juego de mezclas no se contó con información previa, de modo que se desconocen las razones de mezcla de cada una de las muestras. No obstante sí se observa un patrón diferencial (Figura 17).

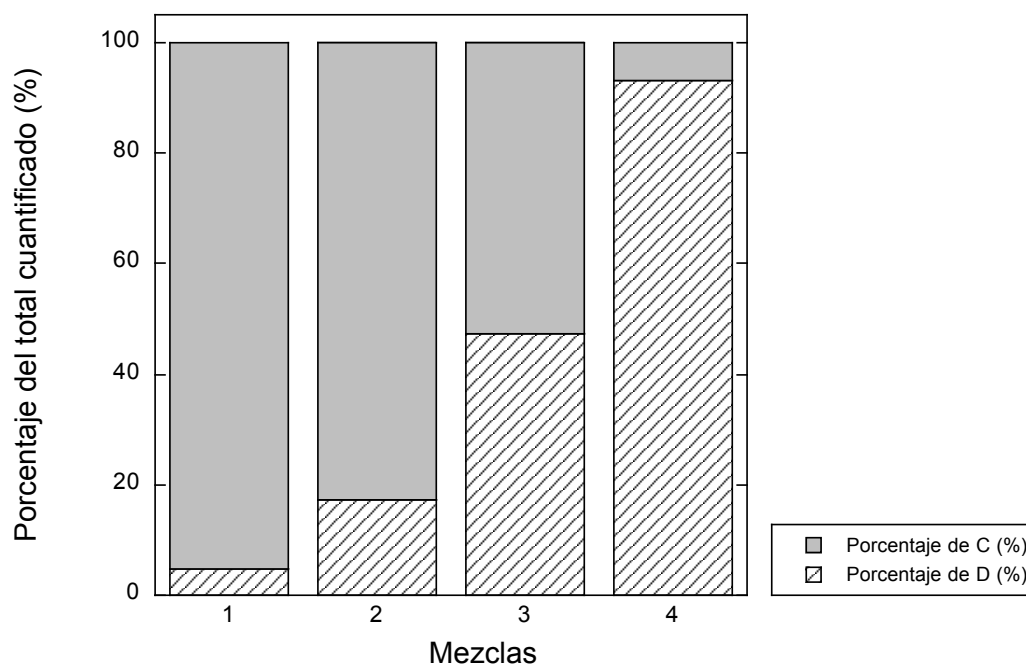
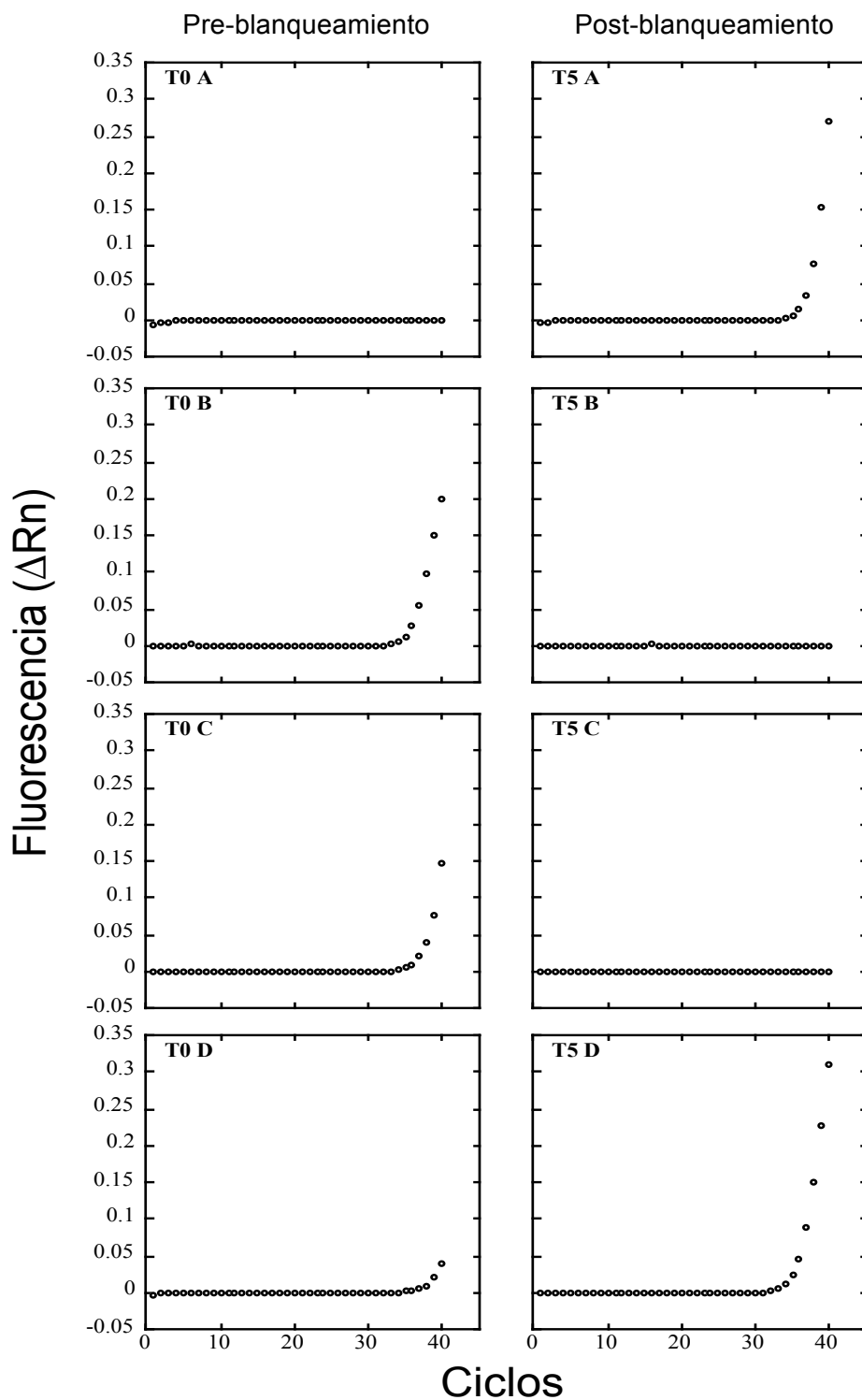


Figura 17. Porcentaje de cada uno de los clados con respecto al total de ADN calculado en las cuatro mezclas CD.

6 Quantificación de cambios en las poblaciones simbios presentes en muestras de *M. faveolata*

Se consiguió la amplificación diferencial de cada uno de los cuatro oligonucleótidos en la muestra 197 (Figura 18a) y 196 (Figura 18b) obteniéndose ciclos umbrales en general muy altos entre 34.8 amplificado por D en la muestra 197 blanqueada (Figura 18a, segunda columna, fila 4) hasta 38.8 amplificado por D en la misma muestra sin blanquear (Figura 18a, primera columna, fila 4). Sin embargo sólo se consiguió fluorescencia significativa en 9 de las 16 reacciones, mientras que en las 7 restantes la fluorescencia es indeterminada. Los gráficos de amplificación permiten discernir patrones en los cambios de cada población entre tratamientos de cada muestra, cambios respaldados por los porcentajes cuantificados (Figura 19). En la muestra 197 el tratamiento pre-blanqueamiento (Figura 19a, T₀) muestra una mezcla de B (50.65%), D (35.82%) y C (13.53%) que se convierte en una mezcla de D (98.93%) y A (1.07%) en el tratamiento post-blanqueamiento (Figura 19a, T₅). En la muestra 196, en el tratamiento (Figura 19b, T₀) se encontró una mezcla de D (75.21%) y B (24.79%), y en T₅ de D (76.19%) y C (23.81%) (Figura 19b, T₅).

a)



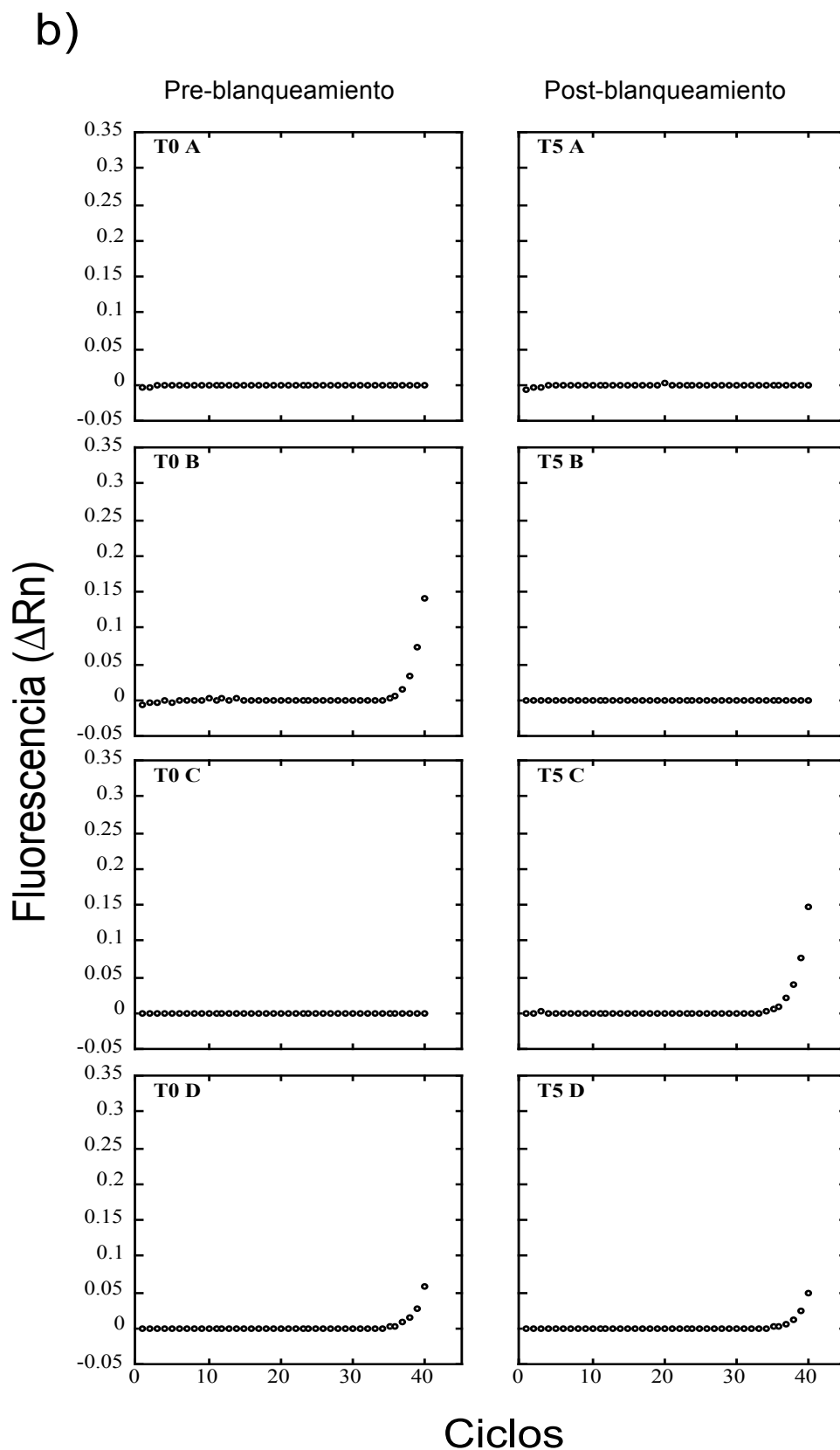


Figura 18. Gráficas de amplificación (fluorescencia a lo largo de los cuarenta ciclos de la qPCR) del juego de oligonucleótidos y sonda para A en la primera fila, B en la segunda, C en la tercera y D en la cuarta, enfrentados con las muestras 197 (a) y 196 (b) y los tratamientos pre-blanqueamiento (T₀, primera columna) y post-blanqueamiento (T₅, segunda columna).

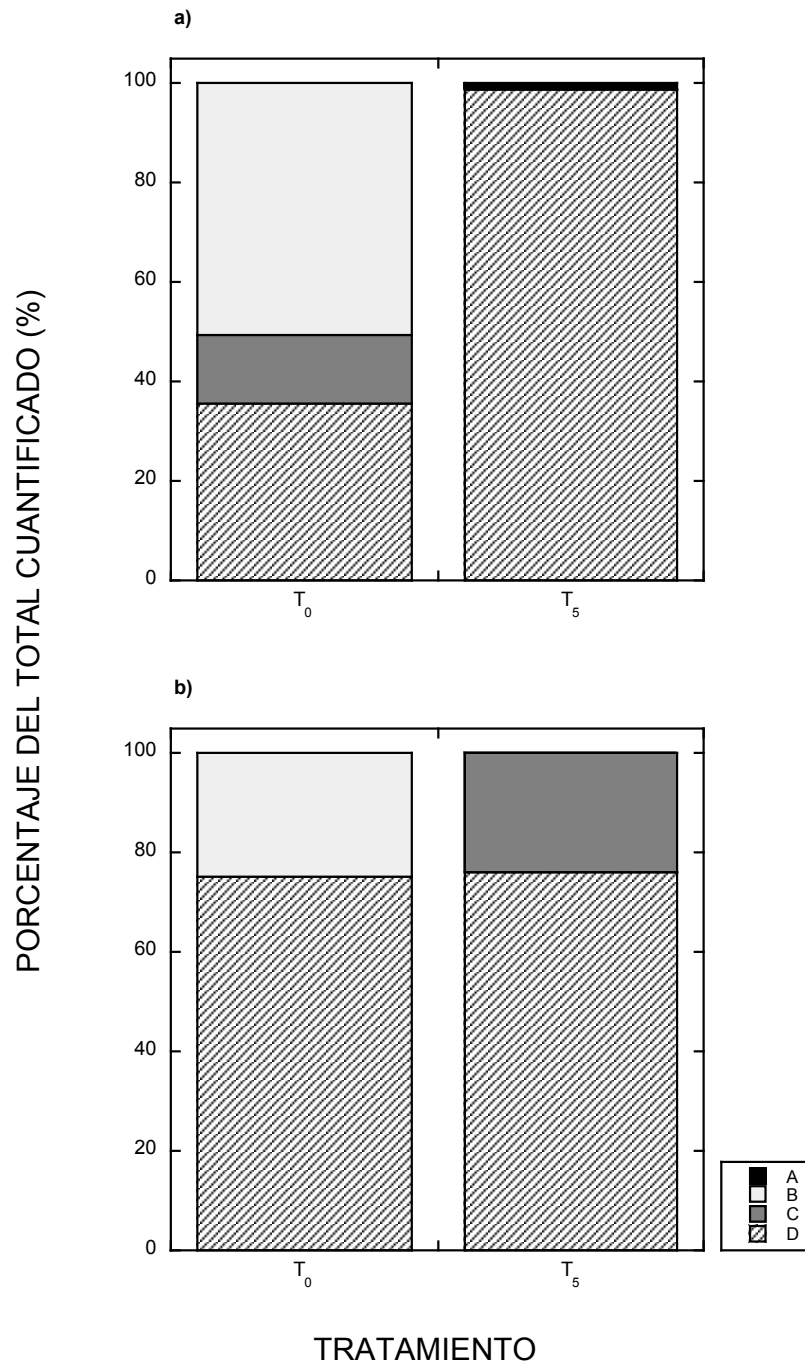


Figura 19. Porcentaje del total cuantificado de cada uno de los cuatro clados en los dos tratamientos (T₀ pre-blanqueamiento y T₅ post-blanqueamiento) en las dos muestras estudiadas (a. 197 y b. 196).

Discusión

El coral masivo *M. faveolata* es capaz de asociarse simultáneamente con cuatro líneas filogenéticas divergentes distintas del género *Symbiodinium* (clados A, B, C y D) (Franklin et al. 2012), cada una de las cuales posee características fisiológicas distintas y son, por tanto, capaces de conferir al hospedero distintas habilidades para responder a un ambiente variable.

En 1997, Iglesias-Prieto y Trench ratificaron la zonación vertical predecible de la simbiosis *Symbiodinium*-coral correlacionándola con las distintas capacidades fotoaclimatorias de cada especie de *Symbiodinium* estudiada, y determinando la irradiancia como la fuerza motriz para la diversificación de nichos que conllevará la distribución natural de la simbiosis. Sin embargo, la luz puede tener efectos más dramáticos a escalas más pequeñas como la que ofrece una única colonia, donde pequeños cambios en la orientación de la superficie de los pólipos hacia la luz, crean un continuo entre ambientes lumínicos que facilitan la diversificación de los nichos, y permiten la coexistencia de los cuatro clados de *Symbiodinium*, siguiendo patrones forzados por los cambios en la intensidad lumínica recibida. Se sabe que estas proporciones pueden abarcar desde el 99% de las células de *Symbiodinium*, hasta poblaciones crípticas por debajo del 10%; sin embargo, será la suma de las capacidades fisiológicas de todas esas poblaciones la que determinará el desempeño del hospedero, teniendo una relevancia potencial en eventos en los que las condiciones ambientales cambien.

Dada la dificultad metodológica en la caracterización taxonómica del género *Symbiodinium*, las técnicas moleculares abrieron una nueva vía, más precisa, en su identificación. En primer lugar, la PCR-RFLP de Rowan y Powers (1995) consigue la resolución a nivel de clado que nos interesa habiendo sido utilizada en estudios de infecciones múltiples (Baker 2003); sin embargo, la técnica es cualitativa pues está diseñada a partir de PCR en punto final y la cantidad final de producto viene dada por la limitación de reactivos, más que por la cantidad inicial de ADN molde presente en la muestra (Makrigiorgos et al. 2002). En segundo lugar, la PCR-DGGE aplicada en *Symbiodinium* por LaJeunesse (2001) tiene más precisión (a nivel de subclado); sin embargo, con el ITS2 tenemos el mismo problema que con el 18S de la SSU del ARN ribosomal, al tener un número desconocido de copias por célula. Por tanto, aún cuando se es capaz de cuantificar la amplificación, el gen está presente en un número indeterminado y variable de veces en el genoma de *Symbiodinium*, siendo imposible la correlación del número de amplicones con células presentes en la muestra. De cualquier modo, ninguno de estos métodos son cuantitativos y su resolución (>10% de células totales) subestimaría poblaciones minoritarias existentes en la muestra. Estudios recientes han comenzado a incorporar la técnica de la PCR en tiempo real como solución cuantitativa y de alta resolución, pues monitorea la acumulación de producto en tiempo real (Cheesman et al. 2003). La elección del marcador molecular a amplificar en qPCR está sin embargo introduciendo una variabilidad muy alta en los estudios de poblaciones de *Symbiodinium*. Se ha utilizado el ITS2 y la actina, ambos genes presentes en múltiples copias en el genoma de *Symbiodinium*, de modo que con ellos sólo es posible dar un dato relativo del número de copias de un clado con respecto a otro (van Oppen 2003), y han sido hasta ahora incapaces de determinar el

número de copias de ese gen por célula y por tanto incapaces de relacionarlo con poblaciones reales de *Symbiodinium*.

En la presente tesis hemos sido capaces de diseñar un protocolo capaz de amplificar satisfactoriamente mediante qPCR regiones del ADN de *Symbiodinium* presentes una única vez en el genoma de cada célula, con la resolución necesaria para abarcar la diversidad local de simbioses en el arrecife de Puerto Morelos. Con esta técnica hemos además sido capaces de cuantificar mínimos cambios en las poblaciones de *Symbiodinium* presentes en el coral *M. faveolata* (desde 1 hasta 0.001 ng mL⁻¹ de ADN total de muestra, 0.1 ng mL⁻¹ en el caso del clado B) con una precisión máxima de ±0.02 y mínima de ±1.44 y con una eficiencia de entre 86% y 112% debidas a cambios ambientales; y en futuros trabajos, ser capaces de correlacionar cambios poblacionales con variaciones en el campo lumínico a microescala.

1. Resolución

Se verificaron los oligonucleótidos diseñados *de novo* como altamente específicos para los clados de *Symbiodinium* presentes en las muestras naturales del coral *M. faveolata* encontradas en el arrecife de estudio:

Clado A (filotipo A3). Los oligonucleótidos iniciales fueron diseñados por Pinzón et al. (2010) para amplificar las regiones flanqueantes y el microsatélite A3Sym_28 (GenBank: HM802887.1) de la especie *Symbiodinium fitti*, tipo A3, en el coral *Acropora palmata* del Caribe. Esta especie se ha probado como cosmopolita, encontrándose en hospederos desde actinarios hasta escleractinios en zonas tropicales de todos los océanos y evolutivamente basal en varios linajes de hospederos (LaJeunesse y Loh 2009). Es particularmente común en almejas gigantes del Indo-Pacífico (Baillie et al. 2000) y aparece en todas las especies de *Acropora* del Caribe (Franklin et al. 2012). Además es exactamente la misma especie encontrada en los complejos *Montastraea annularis* y *M. faveolata* en el Caribe, ocupando los tejidos más expuestos a altas irradiancias. El alto grado de conservación de las MFRs de A3Sym_28 facilitado por la lenta tasa de evolución que el clado A ha tenido, hace que los oligonucleótidos diseñados en este trabajo sean capaces de amplificar A3 extraído tanto de *Acropora* (Pinzón et al. 2010), de almejas del Pacífico (cultivo #168 y #174) y de *Montastraea*, así como otros subtipos pertenecientes al mismo clado tales como A6 y A7 (Pinzón et al. 2010). Sin embargo, se ha reportado que en colonias blanqueadas, una segunda especie del clado A poco común, el tipo A13 (antes A1.1, *sensu* LaJeunesse 2001) concretamente, es capaz de colonizar los nichos libres dentro del complejo *Montastraea*.

Análisis filogenéticos de máxima parsimonia a partir de ITS2 identifican dos tipos ancestrales y generalistas en cuanto al hospedero dentro del clado A: A3 y A1. Finney et al. (2010) sitúa al tipo A13 dentro del *cluster* de A1 ó *Symbiodinium microadriaticum*, con 7 bp de diferencia del *cluster* A3, lo que significa que incluso para las conservativas MFRs estos son demasiados cambios. Esto hace imposible para el juego de oligonucleótidos presentados en este estudio amplificar satisfactoriamente poblaciones existentes de A13 en muestras naturales, sin importar su concentración (LaJeunesse comunicación personal). Pese a que hasta la fecha sólo se han reportado concentraciones crípticas de este subtipo A13 en muestras de *M. faveolata* en el Caribe,

potencialmente pueden ser ecológicamente relevantes puesto que se desconoce la fisiología de estas algas y el efecto que esta simbiosis pueda tener en el holosimbionte. Además, en caso de existir en nuestra muestra concentraciones crípticas de este simbiote, nuestro método estaría subestimando la cantidad total de células pertenecientes al clado A, puesto que estaríamos registrando las células de A3, pero no las de A1. Todo ello pone de manifiesto la importancia de direccionar más recursos hacia el desarrollo de más marcadores moleculares específicos, como los microsátélites para este *cluster* del clado A para ampliar los marcadores disponibles para estudios de mayor resolución en qPCR como el reportado en este trabajo.

Clado B (filotipos B1 y B17). Los oligonucleótidos iniciales, publicados por Pettay y LaJeunesse (2007) se desarrollaron para amplificar las MFRs y microsátélite B7Sym15 en el filotipo de *Symbiodinium* B7 en corales del género *Madracis* en el Caribe (GenBank EF212868.1). Pettay y LaJeunesse (2007) desarrollaron nueve pares de oligonucleótidos a partir de microsátélites encontrados en el tipo 7 del clado B de *Symbiodinium* del coral caribeño *Madracis decactis*. Los autores reportan además la amplificación exitosa de los tipos B13 y B13a por parte de los nueve oligonucleótidos, siete de ellos además son capaces de amplificar B1, y sólo uno B5. A partir de estas pruebas, se verificó al locus B7Sym15 como especialista para todo el clado B, siendo ampliamente utilizado en estudios filogenéticos y de biogeografía en distintos hospederos (LaJeunesse et al. 2010, Finney et al. 2010). En el presente trabajo se verificó una vez más esta especificidad al comprobar la amplificación del locus B7Sym15 en el tipo B17 de *M. faveolata*. Esto se explica dado que los tres filotipos (B7, B1 y B17) pertenecen al mismo *cluster*, en donde B1 es el ancestro común y del que parten los tipos B7, B13, B13a y B17. Así, este método de qPCR será capaz de cuantificar las copias del clado B presentes en la muestra, pero no será capaz de distinguir si son B1 o B17, únicos filotipos del clado presentes en el complejo *Montastraea* (Rowan y Knowlton 1995; Franklin et al 2012). Obviamente, el desarrollo de microsátélites más específicos para cada uno de estos dos tipos deberá ser la opción a tomar. Sin embargo, y mientras esto no sea posible, un medio de tener el sesgo en cuenta, podría ser la combinación de la qPCR con PCR-DGGE, completando la información, y definiendo si lo que estamos cuantificando es B1, B17 o una mezcla de los dos, en cuyo caso nos sería imposible definir sus porcentajes relativos. No obstante, y hasta la fecha, no se han reportado diferencias fisiológicas entre corales dominados por B1 y B17 (Iglesias-Prieto comentario personal), ni siquiera se han reportado dichas diferencias en cultivo, de modo que la repercusión ecológica de la falta de precisión en la cuantificación de este clado es desconocida por el momento y futuros estudios serían necesarios para definirla.

Clado C (filotipo C7). El par de oligonucleótidos utilizado para amplificar el locus del microsátélite C1Sym_22L y MFRs en este estudio para el clado C no ha sido aún publicado (Wham et al. 2012 en prensa). Se ha demostrado que los oligonucleótidos diseñados para este locus fueron capaces de amplificación positiva en los tipos C1, C3 (datos no publicados) y C7; por ello, aunque el estándar utilizado para C es C1, se espera que siga la misma amplificación que C7. Una aproximación razonable podría ser que las eficiencias de amplificación de estos oligonucleótidos en los tres tipos (C1, C3 y C7) son semejantes, puesto que los cambios en las secuencias que estamos manejando son de una a dos bases; además, teniendo en cuenta la

cercanía en las eficiencias entre clados distintos, las diferencias entre estos tipos serán insignificantes en comparación. Por otra parte, C es el clado más joven y es el que contiene una mayor diversidad de ITS2, de modo que es el más tedioso en cuanto a la diferenciación de especies ecológicamente significativas. Esto significa que la diversidad intracladal y entre mismos tipos de ITS2 puede potencialmente ser muy alta, de modo que hemos de ser muy cautos en las conclusiones que generemos en relación a este clado. Nuevas poblaciones siguen siendo identificadas, incluso a partir de lo que se consideraba un único filotipo.

Clado D (*S. trenchi*, filotipo D1a)

El clado D de *Symbiodinium* generalmente comprende linajes ecológicamente distintos encontrados a lo largo del Indo-Pacífico tropical. Aquellos corales en los que se ha encontrado este clado parecen menos susceptibles al blanqueamiento (Jones et al. 2008; LaJeunesse et al. 2010) por lo que este clado es dominante en hábitats expuestos a amplias fluctuaciones térmicas y cambios de turbidez (Fabricius et al. 2004; Abrego et al. 2009; LaJeunesse et al. 2010). *Symbiodinium trenchi* (tipo D1a, previamente identificado como clado E por Toller y Rowan [2001]) es una especie relativamente nueva en el Caribe. Es una especie perfectamente ubicada filogenéticamente y para la cual se han encontrado múltiples microsatélites altamente específicos (Pettay y LaJeunesse 2009; Wham et al. 2011) usados en estudios previos de filogenia y biogeografía del clado y de la especie en particular (Pettay y LaJeunesse 2009). El locus D1Sym66 (GenBank HQ894461,1) fue elegido puesto que su par de oligonucleótidos iniciales amplificaron *S. trenchi* extraído de cultivos y muestras naturales de *M. faveolata* positivamente, dando productos claramente definidos en agarosa y con la menor concentración de falsos positivos debidos a artefactos genéticos. Sin embargo, es importante destacar que este locus no se conserva en todos los subtipos del clado D, de hecho, ni siquiera está conservado en el ancestro común de su *cluster*, *S. glynni* (tipo D1), aunque sí se ha reportado que este par de oligonucleótidos presentan amplificación positiva en su especie hermana, D5 (Pettay y LaJeunesse 2009). Cabe destacar que a lo largo del Caribe sólo se ha encontrado D1a (LaJeunesse 2002) pese a lo descrito por Franklin et al. (2012).

2. Límites de detección

Pese al discreto número de subréplicas incluidas en el estudio, la información que nos ofrecen los límites de amplificación es muy valiosa pues nos permiten determinar los límites de detección y su significancia ecológica. LaJeunesse et al. (2005) estudiaron el tamaño del genoma de distintos tipos de *Symbiodinium* en cultivo, gracias a lo cual se pueden traducir los límites de amplificación del método en forma de concentraciones de ADN total (ng mL^{-1}) a número de células mL^{-1} , con desviaciones estándares promedio de 60 células mL^{-1} y amplificaciones positivas muy por debajo de una célula por mililitro (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tabla de conversión de los límites de detección en concentraciones celulares para cada uno de los tipos de ITS2. El peso de cada célula viene dado en picogramos (LaJeunesse et al. 2005) y la concentración de los límites en nanogramo por mililitro.

Tipo ITS2	Peso celular	Límites de detección	Cél mL ⁻¹
A3	3.2	1	312.5
		0.001	0.3
B1	1.9	1	526.3
		0.01	5.3
C1	4.8	1	208.3
		0.001	0.2
D1	4.1	1	243.9
		0.001	0.2

También permite determinar la concentración de estudio óptima. En principio se eligió 1 ng mL⁻¹ de ADN total pues en todos los casos (salvo en D) tiene la desviación estándar menor (Cuadro 6). Y por último, nos permite hacer un análisis de regresión para estimar la fiabilidad y reproducibilidad del método. La pendiente de la curva de calibración idealmente ha de estar comprendida entre 3.1 a 3.6 (Schmittgen 2006) y gracias a ella se calcula la eficiencia (90% - 110%). Una eficiencia del 100% implicaría que cada secuencia molde se estaría duplicando perfectamente en cada ciclo, mientras que el 0% indicaría que no ha habido cambios en el producto de reacción (Bar et al. 2012). Un alto número de variables pueden afectar a la eficiencia de la PCR, desde longitud del amplicón, presencia de inhibidores, estructuras secundarias y diseño de los oligonucleótidos (Schmittgen 2006). Según Schmittgen (2006), la eficiencia de amplificación mínima aceptable estaría en 80%, de modo que todas las curvas estarían dentro de los límites aceptables; no obstante, la eficiencia de B (86%, Cuadro 6) tendría que ser reevaluada. La baja eficiencia en B puede ser debida a que la T_m de los cebadores individuales es ligeramente superior a la de los demás clados y por tanto la más alejada de la T_m del experimento. Adicionalmente, sus oligonucleótidos tienen las secuencias más largas (lo que aumenta el riesgo de dímeros) y las sondas también son más largas y los amplicones más cortos. Todos estos parámetros, pese a estar dentro de los criterios de diseño, juntos pueden crear un efecto sinérgico que disminuya la eficiencia de la reacción.

3. Especificidad

En referencia a las pruebas de especificidad única (Figura 15) sí se ha comprobado que cada juego de reactivos es específico sólo para el ADN molde perteneciente al clado para el que fueron diseñados, con la excepción de D, que amplifica tardíamente al estándar de A. No obstante se ha de mencionar, que pese a que esta amplificación está dentro de los límites de detección definidos por las curvas de calibración, supone tan sólo un 0.001% del total amplificado por D (0.3 células mL⁻¹) y dado que los estándares fueron hechos a partir de muestras naturales de ADN purificado, se podría explicar este hecho como una contaminación muy leve del estándar (o de la muestra en la placa de qPCR) más que debido a un error en el diseño de los oligonucleótidos.

Las mezclas son otra prueba de gran importancia en la caracterización del método para su aplicación práctica, pues no sólo confirman la capacidad de los reactivos de discernir entre ADN molde de uno u otro tipo, sino que además identifican una posible interferencia entre tipos de ADN. La razón C/T (Cuadro 7) engloba todos los posibles errores (humano, interferencia, baja eficiencia, etc.) y define si el desempeño de cada juego de oligonucleótidos-sonda sobre- o subestima las concentraciones de su ADN molde. Gracias a esto se sabe que A subestima en las cuatro primeras concentraciones (de la 1 a la 4) insignificantes teniendo en cuenta la desviación estándar entre réplicas. Por ejemplo, en la muestra 3, se obtuvieron una concentración calculada de 0.497 ± 0.0023 , y una concentración nominal de 0.5 ng mL^{-1} ; es decir, tenemos una subestima de 0.65%, mientras que pone de manifiesto el error latente en la mezcla número 5, que sobreestimaría en un 35% la concentración nominal de ADN molde. Con respecto al clado B, las mezclas de la 2 a la 5 estarían sobreestimadas, mientras que la número 1 estaría subestimada. Estamos hablando de diferencias de casi 110 células mL^{-1} en el caso de la mezcla 5 de A (concentraciones nominales de 0.99 ng mL^{-1}) y $2.4 \text{ células mL}^{-1}$ para la mezcla de 1 en B (0.01 ng mL^{-1}).

En un estudio semejante, Walker et al. (2004) diseñaron una serie de pares de oligonucleótidos cada uno específico para un grupo de animales. Los autores evaluaron la especificidad del experimento a través de la habilidad que los oligonucleótidos diseñados mostraron para detectar concentraciones conocidas de ADN específico presente en una mezcla de otros tipos de ADN. Encontraron que sus oligonucleótidos cuantifican satisfactoriamente en concentraciones de 0.001, 0.01, 1, 0.01 y 1%. Sin embargo, reportan que en ciertos grupos, los oligonucleótidos tienden a sobreestimar las cantidades presentes en la mezcla pese a que individualmente se comprobó que la amplificación no-específica individual era insignificante. La explicación que ofrecen en su trabajo es que las secuencias de cada par de oligonucleótidos no comparten suficiente identidad entre todas las especies muestreadas para formar un amplicón único. Así, cuando el ADN genómico de múltiples especies está presente, existe suficiente homología entre los genomas representados en la mezcla para facilitar la recombinación o el intercambio entre secuencias durante las fases de desnaturalización y alineamiento de los ciclos de PCR, creándose nuevos moldes con un número de sitios de anclaje para los oligonucleótidos suficientemente complementarios como para crear amplificación detectable. En este trabajo, los grupos en los que se observa sobreestima en la cuantificación son el felino, la rata y el ratón. Estos dos últimos presentan una divergencia genética de 94.4 m.a. (Hedges et al. 2006) con el genotipo felino, mientras que toda la divergencia de clados estudiada para *Symbiodinium* ocupa 45 m.a. (Stat et al. 2006; Pochon et al. 2006; LaJeunesse 2001; Tchernov et al. 2004), pudiendo potencialmente existir homologías entre ambos clados, A y B, que sobreestimen las cuantificaciones de los oligonucleótidos específicos para el clado B.

Otras posibles explicaciones para la sobreestima en la cuantificación de ADN específico, puede ser la interacción bioquímica de un componente disuelto en la muestra con alguno de los pasos de la amplificación, como reportaron Chevaliez et al. (2007) en estudios con Hepatitis C; sin embargo, esto no podría explicar por qué a concentraciones altas (0.99 ng mL^{-1}), los oligonucleótidos de B en vez de sobreestimar, subestiman (Cuadro 7). Además, Chevaliez et al.

(2007) encontraron una segunda falla técnica en la cuantificación de cada uno de los cuatro posibles genotipos (1-4) del virus HCV, pues los juegos oligonucleótidos-sonda TaqMan diseñados como específicos para cada uno de los genotipos subestimaban 5% en el genotipo 2 y entre 7 y 25% en el genotipo 4. Esta subestima podría ser explicada como resultado de errores en la alineación de los oligonucleótidos o de la sonda con la secuencia molde específica, pues encontraron varios polimorfismos de sustitución y de inserción, distintivos de los genotipos subestimados (2 y 4). Una solución para verificar esta hipótesis y solventar el posible error, podría ser la secuenciación de los amplicones en cada uno de los juegos de oligonucleótidos, y verificar que sus secuencias están conservadas en toda la población a cuantificar.

Todas ellas y muchas más son explicaciones válidas para la falta de precisión en la amplificación de ADN molde específico presente en mezclas. Así, se deberán tener en cuenta estos aspectos en los límites de detección, puntualizando que la concentración óptima de muestra por clado a incluir en futuros estudios, habrá de estar por debajo de 1 ng mL^{-1} para que A no se sobreestime, y por encima de 0.01 para que B no se subestime. No obstante, no sobra recordar que las eficiencias de ambos, A y B son las más dispares entre los cuatro clados, esperando que una optimización de las condiciones de PCR puedan pulir los errores acumulados en estos casos.

4. Cuantificación de cambios en las poblaciones simbioses presentes en muestras de *M. faveolata*

Por último, la prueba con las muestras naturales fue esclarecedora en muchos aspectos, poniendo de manifiesto los puntos fuertes de la aplicación práctica, aunque también la necesidad de una futura optimización. El objetivo de esta prueba fue la de estudiar los cambios en la abundancia de cada uno de los clados de endosimbiontes en las dos colonias (197 y 196) antes y después de inducir un evento de blanqueamiento. En un estudio previo se monitoreó la evolución de la señal de reflectancia a 675 nm (Figura 20) de ambas muestras sobre las que se aplicó un estrés térmico el 9 de marzo del 2012, cuando se preservaron las muestras pre-blanqueamiento (T_0), y que duró 10 días. El experimento cesó el 29 de abril del 2012. El día 26 de abril del 2012 se preservaron las muestras etiquetadas como T_5 . La reflectancia o fracción de la luz incidente reflejada por una superficie puede ser usada para estimar la absorptancia, o fracción de luz incidente absorbida por el aparato fotosintético del organismo, a través de la ecuación $\text{Absorptancia} = 1 - \text{Transmitancia} - \text{Reflectancia}$ (Enríquez 2005) donde la transmitancia es la fracción de la luz incidente que atraviesa el tejido fotosintético. Asumiendo que la transmitancia en esqueleto de coral es insignificante, la reflectancia será la inversa de la absorptancia, y por tanto, conociendo la reflectancia se podrá estimar las propiedades de absorción de luz de un coral.

El blanqueamiento es la ruptura de la simbiosis *Symbiodinium*-coral (Iglesias-Prieto y Matta 1992). Uno de los signos más claros usados como indicadores de estrés en una muestra es la reducción en su absorptancia (Rodríguez-Roman et al. 2006). Según el espectro de reflectancia, en T_0 ambas muestras tienen el mismo desempeño que se mantendrá en los controles (Figura 20). De ahí la muestra 197 se blanqueará primero, seguida por 196 que alcanzará mayores niveles de reflectancia que se mantendrán altos sin dejar que el coral se recupere. Sin embargo, 197, que

alcanza menores reflectancias, al cabo de los 10 días de estrés, será capaz de recuperar el 100% de su reflectancia inicial.

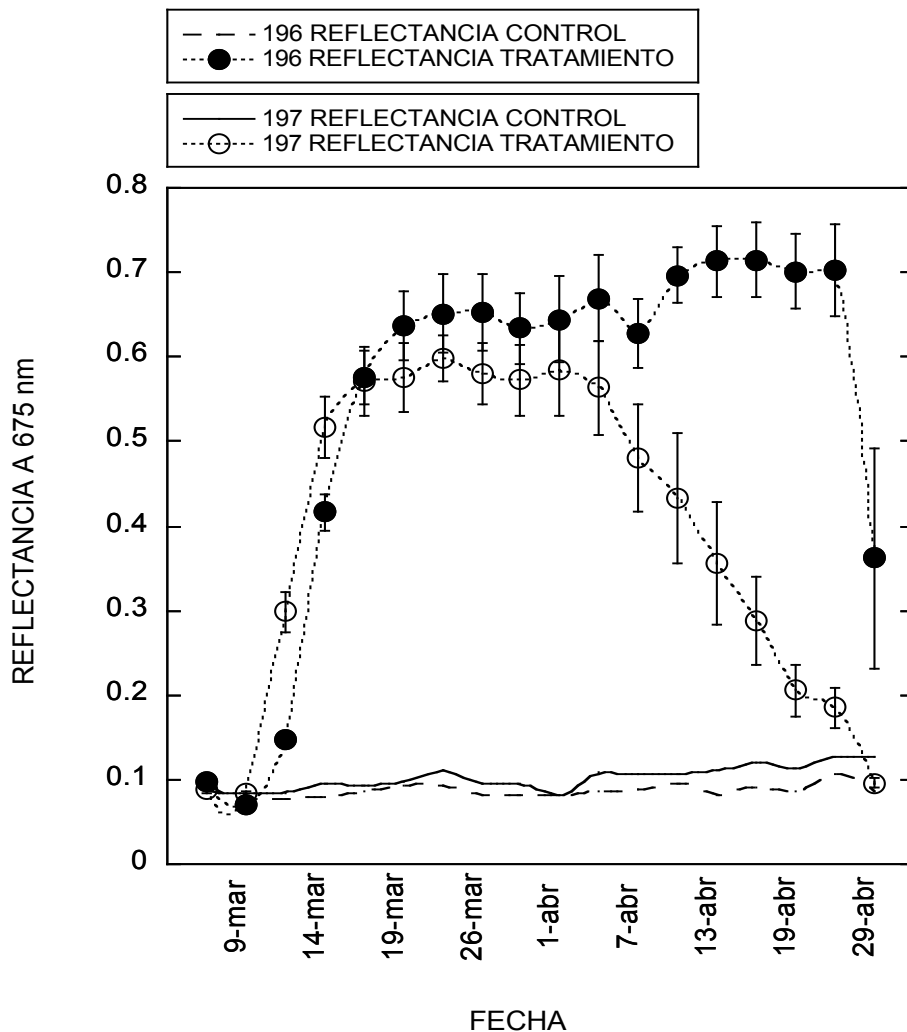


Figura 20. Curvas de reflectancia a 675 nm para las dos muestras (197 y 196) y sus controles lo largo de los 40 días de experimento. El estrés se incorporó el día 9 de Marzo (T_0) y se paró el 19 de Marzo. El punto T_5 corresponde al día 26 de abril, y el experimento abarcó hasta el 29 de Abril. Modificado de Weber et al. (2013, en preparación).

Los datos genéticos por su parte nos indican claras diferencias en las poblaciones durante el blanqueamiento y recuperación. La muestra 197 en T_0 , muestra dos clados dominantes (B y D) y C en menor concentración, combinación esperada en una colonia aclimatada a media luz (Kemp et al. 2013, en preparación), y que deriva en T_5 a una dominancia del clado más tolerante, D. Aquellos corales en los que se ha encontrado este clado parecen menos susceptibles al blanqueamiento (Jones et al. 2008; LaJeunesse et al. 2010) por lo que este clado es dominante en hábitats expuestos a amplias fluctuaciones térmicas y cambios de turbidez (Fabricius et al. 2004; Abrego et al. 2009; LaJeunesse y Smith 2010). El único representante de D encontrado en *Montastraea* en el Caribe es D1a (S. Trenchi, LaJeunesse 2002), presente ampliamente a lo largo de esta zona en poblaciones crípticas. LaJeunesse y Smith (2010) encontraron que poblaciones

críticas de D1a aumentan su prevalencia y abundancia en corales que exhiben alta sensibilidad al estrés, compitiendo por los nichos libres que las poblaciones de *Symbiodinium* menos tolerantes dejan, y en concentración suficiente para hacer que la colonia luzca coloreada y sana pese a estar en su máximo de estrés (Lesser et al. 2000). Según esto cabe la posibilidad de que pese a que la colonia 197 recupere su reflectancia, esto ya no sea indicativo del desempeño del coral. Según Thornhill et al. (2007), una vez que las condiciones estresantes se revierten, las poblaciones de D1a típicamente son desplazadas a concentraciones minoritarias por los simbioses más robustos (B y C en este caso). Se necesitan datos de fotosíntesis y desempeño en forma por ejemplo, de calcificación, para poder comprobar esta hipótesis.

La muestra 196 parte de una mezcla de 75% de D y 25% de B durante el preblanqueamiento. Tras 40 días, la población de D se mantiene mientras que la población de B se sustituye íntegramente por C. La Figura 20 muestra cómo la reflectancia de la colonia 196 no recupera los valores de reflectancia iniciales o del control tras revertir el estrés térmico y pese al cambio en la población simbiote. Esto dio como resultado una mortalidad del 100% de las muestras (datos no presentados). En este caso, D es incapaz de dominar la muestra y por tanto recuperar la capacidad fotosintética de la población simbiote. Se podría pensar que la identidad genética de las poblaciones de C en cada una de las dos colonias son distintas, pues en la colonia 196 parecen más robustas frente al clado D que en 197. Se necesitaría secuenciar el ADN de C en ambos casos para verificar que estamos hablando de dos poblaciones distintas y por tanto con distintas respuestas fisiológicas.

5. Consideraciones futuras

De cara a la aplicación ecológica de éste método, se ha de tener en consideración la cantidad real de material genético con el que estamos trabajando, así como la traducción de estas cantidades en unidades ecológicamente relevantes. Es de gran importancia que la eficiencia en la extracción del ADN en cada muestra sea máxima con el fin de obtener datos absolutos lo más reales posibles. Si la eficiencia en la extracción no es del 100% los resultados expresados como concentración de células de cada clado en la muestra no serán reales, obteniéndose tan sólo una estima relativa que perdería aún mayor precisión en la cuantificación de las poblaciones críticas o minoritarias. Por otra parte, cuanto menor es la eficiencia en la extracción del ADN total, menor se hace la proporción ADN alga:animal, incrementando el error introducido por el ADN animal a la hora de calcular la concentración de ADN inicial; y mayor se hace la concentración de agentes inhibidores de la PCR, disminuyendo la eficiencia del método. Este problema se puede subsanar estimando la eficiencia de cada extracción, que iría en función de la especie de muestra, de la cantidad de tejido extraído, de los reactivos utilizados y del método seguido. Un posible método para cuantificar esta extracción podría ser por cuantificación espectrofotométrica del material extraído a partir de cultivos, y relacionarlo a través de una curva de calibración con distintas concentraciones celulares. Esta aproximación no obstante requeriría de toda una nueva metodología así como de nueva calibración y optimización que pese a ser de gran importancia para la aplicación práctica del método de cuantificación a tratar, considero se escapa de los

objetivos marcados para esta tesis. Sin embargo sucesivos pasos de purificación por precipitación y lavado pueden ayudar mucho a la relación de ADN simbiote:animal. La incorporación del fraccionamiento con fenol:cloroformo incrementa notablemente la pureza del ADN extraído; además, se ha comprobado que la calidad del ADN aumenta al incrementar el tiempo de precipitación de las proteínas (datos no presentados), eliminando inhibidores y aumentando la relación ADN alga:animal; por último, y pese que a sólo contar con observaciones preliminares, cuanto más inmediata es la preservación del tejido del coral, en especial en aquellas especies en las que la cantidad de mucus es mayor, mejor resolución de PCR tenemos. En este último punto es recomendable la fijación de la pieza completa de coral en nitrógeno líquido, y en caso de no tener acceso a este recurso, la incorporación de pequeñas piezas de tejido en DMSO sería la opción aconsejable (Gaither et al. 2010). La contaminación animal se podría estimar utilizando un juego de oligonucleótidos que amplificasen el ADN animal a modo de control interno (β -actina por ejemplo) y cuantificar su concentración inicial por amplificación en tiempo real, pudiendo estimar la relación ADN animal/alga (Mieog et al. 2009).

Otra consideración a tener muy en cuenta, es la temperatura de alineamiento en el experimento de qPCR. Existe un compromiso entre las temperaturas de alineamiento de cada juego oligonucleótidos-sonda, y la eficiencia del experimento global. Pese a no estar trabajando en multiplex (los cuatro juegos de oligonucleótidos y sondas estarían juntos en una misma reacción) es muy importante que todos los experimentos se hagan bajo un mismo protocolo de temperaturas. Así, se requiere optimizar la temperatura de alineamiento en qPCR de modo que maximice la eficiencia del alineamiento del experimento, sin por ello perder eficiencia en cada una de las reacciones individuales.

Conclusiones

- ✓ Se logró el diseño de oligonucleótidos y sondas TaqMan suficientemente específicos para amplificar diferencialmente cuatro líneas genéticas divergentes de *Symbiodinium* presentes en el coral *M. faveolata* del arrecife de Puerto Morelos, gracias al empleo de marcadores moleculares monocopia en qPCR.
- ✓ Se comprobó que el protocolo desarrollado es capaz de producir amplificaciones positivas en concentraciones por debajo de una célula por mililitro, tanto en mezclas de células a partir de cultivo como en muestras naturales con los cuatro clados en simbiosis con el coral *M. faveolata*.
- ✓ Se comprobó la correlación positiva entre los cambios en las concentraciones de cuatro clados de *Symbiodinium* con respecto a cambios observados en el estado fisiológico a través de medidas de reflectancia de las colonias muestreadas durante un evento estresante. Estos resultados explican las diferencias en la respuesta fisiológica al estrés y mortalidad subsecuente en las colonias estudiadas.

- ✓ La aportación de este trabajo tiene un valor ecológico relevante por su implicación en el futuro de los arrecifes coralinos a través del mejor entendimiento de la simbiosis alga-coral y su robustez frente a las variaciones ambientales.

Referencias

- Abrego D, van Oppen M, Willis B (2009) Onset of algal endosymbiont specificity varies among closely related species of *Acropora* corals during early ontogeny. *Molecular Ecology*. 18: 3532–3543.
- Baillie BK, Belda BCA, Silvestre V, Sison M, Gomez AV, Gomez ED, Monje V (2000) Genetic variation in *Symbiodinium* isolates from giant clams based on random-amplified-polymorphic DNA (RAPD) patterns. *Mar Biol* 136:829 – 836.
- Baker AC (1999) The symbiosis ecology of reef-building corals. PhD dissertation, University of Miami, Miami, FLA. 120 pp.
- Baker AC (2003) Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34:661–689.
- Baker AC, Rowan R, Knowlton N. (1997) Symbiosis ecology of two Caribbean acroporid corals. In Lessios, H. A. & Macintyre, I. G. (eds.) *Proc 8th Int Coral Reef Symp Vol 2*:1295–1300.
- Banaszak A, LaJeunesse T, Trench R (2000) The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249:219–233.
- Bar T, Kubista M, Tichopad A (2012) Validation of kinetics similarity in qPCR. *Nucleic Acids Research*. 40:1395–1406.
- Berkelmans R, Van Oppen M (2006) The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a “nugget of hope” for coral reefs in an era of climate change. *Proc R Soc B* 273: 2305-2312.
- Blank RJ, Huss VAR (1989) DNA divergency and speciation in *Symbiodinium* (Dinophyceae). *Pl Syst Evol* 163:153–63.
- Blank RJ, Trench RK (1985a) *Symbiodinium microadriaticum*: a single species? In: *Proceedings of the Fifth International Coral Reef Conference*, Vol. 6, pp. 113–117.
- Blank RJ, Trench RK (1985b) Speciation and symbiotic dinoflagellates. *Science* 229: 656–658.
- Blank RJ, Trench RK (1986) Nomenclature of endosymbiotic dinoflagellates. *Taxon* 35:286–94.
- Blank, R. J. 1987. Presumed gametes of *Symbiodinium*: feintings by a fungal parasite? *Endocyt C Res* 4:297–304.
- Buddemeier RW, Fautin DG (1993) Coral bleaching as an adaptive mechanism: a testable hypothesis. *BioScience* 43:320–326.
- Carlos AA, Baillie BK, Kawachi M, Maruyama T (1999) Phylogenetic position of *Symbiodinium* (Dinophyceae) isolates from tridacnids (Bivalvia), cardiids (Bivalvia), a sponge (Porifera), a soft coral (Anthozoa), and a free-living strain. *J Phycol* 35:1054—1062.
- Cheesman SJ, de Roode JC, Read AF, Carter R (2003) Real-time quantitative PCR for analysis of

- genetically mixed infections of malaria parasites: technique validation and applications. *Mol Biochem Parasitol* 131:83–91.
- Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R, Pawlotsky JM (2007) Overestimation and Underestimation of Hepatitis C Virus RNA Levels in a Widely Used Real-Time Polymerase Chain Reaction-Based Method. *Hepatology* 46(1):22-31.
- Coffroth M, Santos S (2005) Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. *Protist* 156:19-34.
- Coleman AW, Suarez AS, Goff LJ (1994) Molecular delineation of species and syngens in volvocacean green algae (Chlorophyta). *J Phycol* 30:80–90.
- Correa A, McDonald M (2009) Development of clade-specific *Symbiodinium* primers for quantitative PCR (qPCR) and their application to detecting clade D symbionts in Caribbean corals. *Mar Bio* 156:2403–2411.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS (1991) “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- Drummond A, Ashton B, Cheung M, Heled J, Kearse M, Moir R, Stones S, Thiere T, Wilson A (2009) Geneious v4.8, Available from <http://www.geneious.com>.
- Ellis J, Solander D (1786). The natural history of many curious and uncommon zoophytes collected from various parts of the globe. Benjamin White and Son, London. 145-243.
- Enríquez S (2005) Form-function analysis of the effect of canopy morphology on leaf self-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Oecologia* 145: 235–243.
- Fabricius KE, Mieog JC, Colin PL, Idip D, Van Oppen MJH (2004) Identity and diversity of coral endosymbionts (zooxanthellae) from three Palauan reefs with contrasting bleaching, temperature and shading histories. *Molecular Ecology* 13:2445–2458.
- Fensome RA, Taylor FJR, Norris G, Sarjeant WAS, Wharton DI, Williams GL (1993) A classification of fossil and living dinoflagellates. *Micropaleontol. Press Spec. Paper* 7, 1–351.
- Finney JC, Pettay DT, Sampayo EM, Warner ME, Oxenford HA, LaJeunesse TC (2010) The relative significance of host-habitat, depth, and geography on the ecology, endemism, and speciation of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Microbial Ecology* 60:250–263.
- Fitt WK, McFarland FK, Warner ME, Chilcoat GC (2000). Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol Oceanogr.* 45:677-485.
- Frade PR, Englebert N, Faria J, Visser PM, Bak RPM (2008) Distribution and photobiology of *Symbiodinium* types in different light environments for three colour morphs of the coral *Madracis pharensis*: is there more to it than total irradiance?. *Coral Reefs* 27:913–925.
- Franklin EC, Stat M, Pochon X, Putnam HM, Gates RD (2012) GeoSymbio: a hybrid, cloud-based web application of global geospatial bioinformatics and ecoinformatics for *Symbiodinium*-host symbioses. *Mol Ecol Resour* 12:369–373.
- Freudenthal HD (1962) *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: taxonomy, life cycle, and morphology. *J Protozool* 9:45–52.
- Gaither M, Szabó Z, Crepeau M, Bird C (2010) Preservation of corals in salt-saturated DMSO buffer is superior to ethanol for PCR experiments. *Coral Reefs* 30:329–333.
- Glynn PW (1996) Coral reef bleaching: facts, hypotheses, and implications. *Glob Change Biol*

2:495–509.

- Goulet TL, Coffroth MA (2003) Stability of an octocoral-algal symbiosis over time and space. *Mar Ecol Prog Ser* 250:117–124.
- Goulet TM (2006) Most corals may not change their symbionts. *Mar Ecol Prog Ser* 321:1-7.
- Hallock P (2001) Coral reefs, carbonate sediments, nutrients and global change. In Stanley Jr. GD (ed) *The History and Sedimentology of Ancient Reef Systems*. Springer-Verlag, New York, pp 387-427.
- Hamada H, Petrino M, Kakunaga T (1982) A Novel Repeated Element With Z-DNA-Forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6465–6469.
- Hedges SB, Dudley J, Kumar S (2006) TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. *Bioinformatics Applications Note* 22(23): 2971–2972.
- Hillis DM, Dixon MT (1991) Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology* 66(4):411-453.
- Iglesias-Prieto R, Beltran VH, LaJeunesse TC, Reyes-Bonilla H, Thome PE (2004) Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proc R Soc Lond* 271:1757-1763.
- Iglesias-Prieto R, Matta J (1992) Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc Natl Acad Sci* 89:10302-10305.
- Iglesias-Prieto R, Trench R (1997) Photoadaptation, photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses. *Proc 8th Int Coral Reef Symp* 2:1319–1324.
- Jones A, Berkelmans R, Van Oppen M, Mieog JC, Sinclair W (2008) A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *P R Soc B* 275:1359.
- Kawaguti S (1944) On the physiology of reef corals VII. Zooxanthella of the reef coral is *Gymnodinium* sp., Dinoflagellata; its culture *in vitro*. *Palao Trop Biol Stn Stud* 2: 675—679.
- Kemp D, Fitt W, Schmidt G (2008) A microsampling method for genotyping coral symbionts. *Coral Reefs* 27:289–293.
- Kirk TO (1994) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 399 pp.
- Kitano H (2007) Towards a theory of biological robustness. *Mol Syst Biol* 3:137.
- Kreader CA (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and environmental microbiology* 62:1102–1106.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 27:95–125.
- LaJeunesse T (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 TC (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Mar Biol* 141:387–400.

- LaJeunesse T, Trench R (2000) Biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Biol Bull* 199:126–134.
- LaJeunesse TC, Loh WKW, van Woesik R, Hoegh-Guldberg O, Schmidt GW, Fitt WK (2003). Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals relative to those of the Caribbean. *Limnol Oceanogr* 48:2046–2054.
- LaJeunesse T, Thornhill D, Cox E, Stanton F (2004) High diversity and host specificity observed among symbiotic dinoflagellates in reef coral communities from Hawaii. *Coral Reefs* 23:596–603.
- LaJeunesse TC, Lambert G, Andersen RA, Coffroth MA, Galbraith DW (2005) *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) genome sizes (DNA content) are smallest among dinoflagellates. *J Phycol* 41:880–886.
- LaJeunesse T, Reyes-Bonilla H (2007) Spring “bleaching” among Pocillopora in the Sea of Cortez, Eastern Pacific Coral Reefs 26:265–270.
- LaJeunesse T, Loh W (2009) Do introduced endosymbiotic dinoflagellates “take” to new hosts? *Biological Invasions*, 11(4):995–1003.
- LaJeunesse T, Pettay D (2010) Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host-symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *J. Biogeogr.* 37, 785–800.
- LaJeunesse T, Smith R (2010) Outbreak and persistence of opportunistic symbiotic dinoflagellates during the 2005 Caribbean mass coral “bleaching” event. *Proc. R. Soc. B* 1405.
- LaJeunesse TC, Smith R, Walther M, Pinzón J, Pettay DT, McGinley M, Aschaffenburg M, Medina-Rosas P, Cupul-Magaña AL, Pérez AL, Reyes-Bonilla H, Warner ME (2010) Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coral-dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *P R Soc B* 277:2925–2934.
- Lenaers G, Maroteaux L, Michot B, Herzog M (1989) Dinoflagellates in evolution. A molecular phylogenetic analysis of large subunit ribosomal RNA. *J Mol Evol.* 29:40–51.
- Lesser MP, Mazel C, Phinney D, Yentsch CS (2000) Light absorption and utilization by colonies of the congeneric hermatypic corals *Montastraea faveolata* and *Montastraea cavernosa*. *Limnology and Oceanography* 76–86.
- Lobban CS, Scheffer M, Simpson AGB, Pochon X, Pawlowski J, Foissner W (2002). *Maristentor dinoferus* n. gen., n. sp., a giant heterotrich ciliate (*Spirotrichea: Heterotrichida*) with zooxanthellae, from coral reefs on Guam, Mariana Islands. *Mar Biol* 140:411–423.
- Loeblich III AR, Sherley JL (1979) Observations on the theca of the mobile phase of free-living and symbiotic isolates of *Zooxanthella microadriaticum* (Freudenthal) comb. nov. *J Mar Biol Assoc UK* 59: 195–205.
- Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 49, 727–764.
- Loram JE, Boonham N, O’Toole P, Trapido-Rosenthal HG, Douglas AE (2007) Molecular quantification of symbiotic dinoflagellate algae of the genus *Symbiodinium*. *Biology Bulletin*, 212, 259–268.
- Makrigiorgos GM, Chakrabarti S, Zhang Y, Kaur M, Price BD (2002) A PCR-based amplification method retaining the quantitative difference between two complex genomes. *Nat Biotechnol* 20:936–939.

- Mieog JC, Van Oppen M, Cantin N, Stam W, Olsen J (2007) Real-time PCR reveals a high incidence of *Symbiodinium* clade D at low levels in four scleractinian corals across the Great Barrier Reef: implications for symbiont shuffling. *Coral Reefs* 26:449–457.
- Mieog JC, Van Oppen MJH, Berkelmans R, Stam WT, Olsen JL (2009) Quantification of algal endosymbionts (*Symbiodinium*) in coral tissue using real-time PCR. *Mol Ecol Resour* 9:74–82.
- Muscantine L, Porter J (1977) Reef corals: mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *BioScience* 27(7):454-460.
- Myers RM, Lumelsky N, Lerman LS, Maniatis T (1985) Detection of single base substitutions in total genomic DNA. *Nature* 313:495–498.
- O'Hara RJ (1993) Systematic generalization, historical fate, and the species problem. *Systematic Biology*, 42:231–246.
- Pawlowski J, Holzmann M., Fahrni JF, Pochon X, Lee JJ (2001) Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid foraminifera. *J Eukaryot Microbiol.* 48:368–37.
- Pettay D, LaJeunesse T (2007) Microsatellites from clade B *Symbiodinium* spp. specialized for Caribbean corals in the genus *Madracis*. *Molecular Ecology Notes* 7:1271–1274.
- Pettay DT, LaJeunesse TC (2009) Microsatellite loci for assessing genetic diversity, dispersal and clonality of coral symbionts in “stress-tolerant” clade D *Symbiodinium*. *Mol Ecol Resour* 9:1022–1025.
- Pinzon JH, Devlin-Durante MK, Weber MX, Baums IB, LaJeunesse TC (2010) Microsatellite loci for *Symbiodinium* A3 (*S. fitti*) a common algal symbiont among Caribbean *Acropora* (stony corals) and Indo-Pacific giant clams (*Tridacna*). *Conservation Genet Resour* 3:45–47.
- Pochon X, Pawlowski J, Zaninetti L, Rowan R (2001) High genetic diversity and relative specificity among *Symbiodinium*-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. *Mar Biol* 139:1069—1078.
- Pochon X, LaJeunesse TC, Pawlowski J (2004) Biogeographic partitioning and host specialization among foraminiferan dinoflagellate symbionts (*Symbiodinium*, Dinophyta). *Mar Biol* 146:17—27.
- Pochon X, Montoya-Burgos J, Stadelmann B (2006) Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:20–30.
- Pochon X, Gates RD (2010) A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular phylogenetics and evolution* 56:492–497.
- Pochon X, Putnam HM, Burki F, Gates RD (2012) Identifying and characterizing alternative molecular markers for the symbiotic and free-living dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *PLoS One* 7:e29816.
- Pomerance R (1999) Coral Bleaching, coral mortality and global climate change: report presented by Deputy Assistant Secretary of State for the Environment and Development to the U.S. Coral Reef Task Force, 5 March 1999, Maui, Hawaii.
- Rodríguez-Roman A, Hernández-Pech X, Thomé P, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2006) Photosynthesis and light utilization in the Caribbean coral *Montastraea faveolata* recovering from a bleaching event. *Limnology and Oceanography* 51:2702–2710.
- Rogers SO, Bendich AJ (1987) Heritability and variability in ribosomal RNA genes of *Vicia faba*. *Genetics* 117:285 –295.

- Rowan R (1998) Diversity and ecology of zooxanthellae on coral reefs. *J Phycol* 34:407–417.
- Rowan R, Knowlton N (1995) Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2850.
- Rowan R, Knowlton N, Baker A, Jara J (1997) Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature* 388:265-269.
- Rowan R, Powers D (1991) Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Marine ecology progress series*. Oldendorf 71:65–73.
- Sampayo EM, Franceschinis L, Hoegh-Guldberg O, Dove S (2007) Niche partitioning of closely related symbiotic dinoflagellates. *Molecular Ecology* 16:3721–3733.
- Santos S, Taylor D, Coffroth M (2001) Genetic comparisons of freshly isolated versus cultured symbiotic dinoflagellates: implications for extrapolating to the intact symbiosis. *Journal of Phycology* 37:900–912.
- Savage AM, Goodson MS, Visram S, Trapido- Rosenthal H, Wiedenmann J, Douglas AE (2002). Molecular diversity of symbiotic algae at the latitudinal margins of their distribution: dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* in corals and sea anemones. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 244:17–26.
- Schmittgen TD (2006) Quantitative gene expression by real-time PCR: a complete protocol. In Dorak MT (ed) *Real-time PCR*. School of Clinical Medical Sciences (Child Health) Newcastle University Newcastle-upon-Tyne, UK. pp 127-138.
- Schoenberg DA, Trench RK (1980) Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I. Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *S. microadriaticum*. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 207:405– 427.
- Seutin G, White BN, Boag PT (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can J Zool.* 69:82-90.
- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989) Attachment of a 40-Base-Pair G+C-Rich Sequence (GC-Clamp) to Genomic DNA Fragments by the Polymerase Chain Reaction Results in Improved Detection of Single-Base Changes. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:232–236.
- Stat M, Carter D, Hoegh-Guldberg O (2006) The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts-Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 8:23–43.
- Streelman JT, Zardoya R, Meyer A, Karl SA (1998) Multilocus phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes): evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. *Molecular Biology and Evolution* 15:798–808.
- Taylor DL (1974) Symbiotic marine algae: taxonomy and biological fitness. En Vernberg WB (ed) *Symbiosis in the Sea*. University of South Carolina Press, South Carolina, pp 245—262.
- Tchernov D, Gorbunov M, De C (2004) Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *The National Academy of Sciences of the USA*, 101 (37): 13531-13535.
- Thornhill DJ, LaJeunesse TC, Santos SR (2007) Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Mol Ecol* 16:5326–5340.
- Thornhill D, Fitt W, Schmidt G (2006a) Highly stable symbioses among western Atlantic brooding

- corals. Coral Reefs 25:515–519.
- Thornhill D, LaJeunesse TC, Kemp D, Fitt W, Schmidt G (2006b) Multi-year, seasonal genotypic surveys of coral-algal symbioses reveal prevalent stability or post-bleaching reversion. Mar Biol 148:711–722.
- Toller W, Rowan R (2001) Zooxanthellae of the *Montastraea annularis* species complex: patterns of distribution of four taxa of *Symbiodinium* on different reefs and across depths. Biol. Bull. 201: 348–359.
- Toonen RJ (1997) Microsatellites for ecologists: Non-radioactive isolation and amplification protocols for microsatellite markers. <http://www2.hawaii.edu/~toonen/Msats/>.
- Trench RK (1979) The cell biology of plant-animal symbiosis. Annu Rev Plant Physiol 30:485–531.
- Trench RK (1993) Microalgal–invertebrate symbioses: a review. Endocytobiosis Cell Res 9:135–175.
- Trench R (1997) Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses. Proc 8th Int Coral Reef Symp 2:1275–1286.
- Trench RK, Blank RJ (1987). *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, *S. Goreauii* sp. nov., *S. kawagutii* sp. nov. and *S. pilosum* sp. nov.: gymnodinoid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. J Phycol 23, 469–481.
- Ulstrup KE, van Oppen M (2003) Geographic and habitat partitioning of genetically distinct zooxanthellae (*Symbiodinium*) in *Acropora* corals on the Great Barrier Reef. Molecular Ecology 12:3477–3484.
- Walker J A, Hughes DA, Hedges DJ, Anders BA, Laborde ME, Shewale J (2004) Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific inter- spersed repetitive elements. Genomics 83(3):518–527.
- Wham DC, Pettay DT, LaJeunesse TC (2011) Microsatellite loci for the host-generalist “zooxanthella” *Symbiodinium trenchi* and other Clade D *Symbiodinium*. Cons. Gen. Res. 3:541–4.
- Wood R (1999). Reef Evolution, Wrst ed Oxford University Press, New York. 415 pp.
- Yamashita H, Suzuki G, Hayashibara T, Koike K (2010) Do corals select zooxanthellae by alternative discharge? Mar Biol 158:87–100.
- Zardoya R, Vollmer DM, Craddock C, Streelman JT, Karl S, Meyer A (1996) Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). Proc Biol Sci 263:1589–1598.