



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

“Transformación de *Symbiodinium* spp. con vectores que contienen genes reporteros de proteínas fluorescentes”

T E S I S

que para optar por el grado académico de

Doctor en Ciencias
(Biología Marina)

p r e s e n t a

M. en BE. Mario Fernando Ortiz Matamoros

Director de Tesis: Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMYL-UNAM.

Comité Tutor:

Dr. Roberto Iglesias Prieto
Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, ICMYL-UNAM

Dr. Píndaro Díaz Jaimes
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Dra. Martha Robles Flores
Facultad de Medicina, UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México



**“Transformación de *Symbiodinium* spp. con vectores
que contienen genes reporteros de proteínas
fluorescentes”**

Director de Tesis:

Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez

Comité Tutor:

Dr. Roberto Iglesias Prieto

Dr. Píndaro Díaz Jaimes

Dra. Martha Robles Flores

Jurado de examen:

Presidente: Dra. Martha Robles Flores

Secretario: Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez

Vocal: Dr. Píndaro Díaz Jaimes

Suplente: Dr. Roberto Iglesias Prieto

Suplente: Dr. Javier Carmona Jiménez

Dedicado a mis padres
Alejandra y Fernando

a mis hermanas
Vania, Belén, Abril

a mi hermano
Luis

RECONOCIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca para estudios de Doctorado (131280) y la beca mixta para realizar una estancia internacional.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM

A la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos por el uso de la Unidad habitacional.

A la Dra. Mónica Medina por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su grupo de investigación en la U. C. Merced, EE. UU.

A los técnicos académicos: M. en C. Fernando Negrete Soto, M. en C. Cecilia Barradas Ortiz y M. en C. Edgar Escalante Mancera, por la impartición del curso de Buceo.

Este trabajo fue apoyado por los donativos PAPIIT IN- 200409, PAPIIT IN-210514 de DGAPA-UNAM y 175951 del CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermanos, gracias a ustedes sigo adelante.

A mi familia de sangre: los Ortiz y los Matamoros

A mi familia de vida: Rebeca y Fabián.

A Yared por su amistad incondicional.

A mi tutor el Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación, por tener el tiempo, la paciencia, por guiarme y orientarme durante todo el doctorado.

A la Dra. Tania Islas Flores, por su ayuda y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio: Gina, Jessica, Claudia, Tania, Alma, Esmeralda, Patricia, Celina, Stefano y Francisco por un agradable ambiente de trabajo.

A la Dra. Patricia Thomé Ortiz por la ayuda, la asesoría y las facilidades para el desarrollo de mi trabajo.

Un sincero agradecimiento a los miembros de mi comité tutor y jurado: Dr. Roberto Iglesias Prieto, Dra. Martha Robles Flores, Dr. Píndaro Díaz Jaimes, Dr. Javier Carmona Jiménez, por los valiosos comentarios y el tiempo dedicado a este trabajo.

A Rafael Álvarez por el apoyo de biblioteca.

A Darren Brown por ofrecerme siempre su ayuda y por su amistad.

A Bere, Yared, Rebeca, Miriam, Daniela, Selene, Yolotl, Lili, David, por estar en los momentos difíciles.

Y a todas aquellas personas que contribuyeron directa o indirectamente a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

I. ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
II. ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	3
III. ABREVIATURAS.....	3
IV. RESUMEN.....	5
V. ABSTRACT.....	7
VI. INTRODUCCIÓN.....	9
VII. ANTECEDENTES.....	12
A. El género <i>Symbiodinium</i>	12
B. Morfología y Ciclo de vida de <i>Symbiodinium</i> spp.....	13
C. Organización del núcleo.....	16
D. Estudios de transcriptómica en <i>Symbiodinium</i> spp.....	17
E. Transformación genética.....	18
a. Electroporación.....	20
b. Biolística.....	21
c. Micro inyección.....	22
d. Transformación mediada por fibras de carburo de silicio.....	23
e. Perlas de vidrio.....	24
f. Transformación mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
IX. OBJETIVOS.....	28

A. Objetivo General.....	28
B. Objetivos Particulares.....	28
X. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
A. Material Biológico.....	29
B. Construcciones.....	29
a. pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	29
b. pCB302- <i>gfp-MBD</i>	31
c. pCB302- <i>gfp-FABD2</i>	32
C. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
D. Aislamiento y purificación de los plásmidos pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> , pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i>	33
E. Digestión de los plásmidos pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> , pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i> con enzimas de restricción.....	34
F. Amplificación de <i>AtRACK1C</i> y <i>gfp</i> de los plásmidos pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> , pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i> mediante la técnica de PCR.....	35
G. Cultivos de <i>Symbiodinium</i> con el herbicida que contiene glufosinato de amonio.....	36
H. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. con el plásmido pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	36
I. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
J. Extracción de ADN genómico de cultivos normales y transformados de <i>Symbiodinium</i> spp.....	38
K. PCR inverso.....	39
L. Amplificación de un fragmento del gen de <i>AtRACK1C</i> a partir de ADN genómico de células de <i>Symbiodinium</i> spp. transformadas	40
M. Amplificación de una parte de la secuencia de <i>gfp</i> a partir de ADN genómico de células de <i>Symbiodinium</i> spp. transformadas	41

N. Inmunodetección (Western blot) de la proteína híbrida GFP-AtRACK1C en extractos totales de proteínas de células de <i>Symbiodinium</i> spp. transformadas mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
a. Anticuerpos y sondas secundarias.....	41
b. Extracción de proteínas totales de <i>Symbiodinium</i> spp. y análisis por Western blot.....	42
O. Inoculación de pólipos de <i>Cassiopea xamachana</i> con <i>Symbiodinium</i> KB8.....	43
XI. RESULTADOS.....	44
A. Análisis de los plásmidos pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> , pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i> con enzimas de restricción.....	44
a. Digestión de pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> con <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> y <i>BglII</i>	44
b. Digestión de pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i> con <i>SmaI</i> , <i>BamHI</i> y <i>BglII</i>	46
B. Análisis de los plásmidos pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> , pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i> mediante la técnica de PCR.....	48
a. Amplificación de una parte de la secuencia codificante de <i>AtRACK1C</i>	48
b. Amplificación de un fragmento de la secuencia codificante de <i>gfp</i>	50
C. Cultivos de <i>Symbiodinium</i> spp. en presencia de herbicida que contiene glufosinato de amonio (Finale®).....	53
D. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. con el plásmido pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	56
E. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. con pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
a. Transformación de <i>Symbiodinium</i> KB8 con pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
b. Transformación de <i>Symbiodinium</i> Mf11 con pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	60

c. Transformación de <i>Symbiodinium kawagutii</i> con pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> mediada <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	61
F. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. con otros vectores que contienen GFP.....	64
G. Ensayos para determinar la incorporación de ADN foráneo al genoma de <i>Symbiodinium</i> spp.....	67
a. PCR inverso.....	67
b. PCR Genómico.....	67
i. Amplificación de una parte de la secuencia codificante de <i>AtRACK1C</i> usando ADN genómico de cultivos de <i>Symbiodinium</i> spp. transformados.....	67
ii. Amplificación de un fragmento de la secuencia codificante del gen de <i>gfp</i> usando ADN de cultivos de <i>Symbiodinium</i> spp. transformados.....	69
H. Inmunodetección de la proteína híbrida GFP- <i>AtRACK1C</i> en extractos totales de proteínas de células de <i>Symbiodinium</i> spp. transformadas mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	70
I. Inoculación de pólipos de <i>Cassiopea xamachana</i> con <i>Symbiodinium</i> KB8.....	71
XII. DISCUSIÓN.....	76
XIII. CONCLUSIONES.....	84
XIV. PERSPECTIVAS.....	85
XV. LITERATURA CITADA.....	86

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios morfológicos principales de <i>Symbiodinium</i> spp.	14
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Symbiodinium</i> spp.	15
Figura 3. Mapa de restricción del plásmido pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	30
Figura 4 Mapa de restricción del plásmido pCB302- <i>gfp-MBD</i>	31
Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pCB302- <i>gfp-FABD2</i>	32
Figura 6. Análisis del plásmido pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i> con enzimas de restricción.....	45
Figura 7. Digestión de los plásmidos pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i> con la enzima de restricción <i>SmaI</i>	46
Figura 8. Digestión de los plásmidos pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i> con las enzimas de restricción <i>BamHI</i> y <i>BglII</i>	47
Figura 9. Amplificación de un fragmento de la secuencia codificante de <i>AtRACK1C</i> presente en el plásmido pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	49
Figura 10. Amplificación de productos parciales de la secuencia codificante del gen de <i>gfp</i> de los plásmidos pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i>	51
Figura 11. Amplificación de productos parciales del gen <i>nptIII</i> con los plásmidos pCB302- <i>gfp-MBD</i> y pCB302- <i>gfp-FABD2</i>	52

Figura 12. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. con el plásmido pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	57
Figura 13. Células de <i>S. KB8</i> transformadas mediante <i>A. tumefaciens</i> con la construcción pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	59
Figura 14. Células de <i>S. Mf11</i> transformadas mediante <i>A. tumefaciens</i> con la construcción pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	60
Figura 15. Células de <i>S. kawagutii</i> transformadas mediante <i>A. tumefaciens</i> con la construcción pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	62
Figura 16. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. mediada por <i>A. tumefaciens</i> con pCB302- <i>gfp-MBD</i>	65
Figura 17. Transformación de <i>Symbiodinium</i> spp. mediada por <i>A. tumefaciens</i> con pCB302- <i>gfp-FABD2</i>	66
Figura 18. Amplificación de una parte de la secuencia codificante de <i>AtRACK1C</i> usando como templado el ADN genómico de cultivos transformados de <i>Symbiodinium</i> spp.....	68
Figura 19. Amplificación de una parte de la secuencia codificante del gen <i>gfp</i> de células transformadas de <i>Symbiodinium</i> spp.....	69
Figura 20. Inmunodetección de la proteína híbrida GFP- <i>AtRACK1C</i> en extractos totales de proteínas de células de <i>S. Mf11</i> transformadas mediante <i>A. tumefaciens</i> que contenía el plásmido pCB302- <i>gfp-AtRACK1C</i>	71
Figura 21. Ciclo de vida de la medusa <i>Cassiopea xamachana</i>	72

Figura 22. Diferentes etapas en el ciclo de vida de la medusa *Cassiopea xamachana*.....73

Figura 23. Incubación de pólipos de la medusa *Cassiopea xamachana* con células de *Symbiodinium* KB8 transformadas.75

II. ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Cultivos no saturados de *Symbiodinium* spp. en presencia y ausencia de un herbicida que contiene glufosinato de amonio.....54

Gráfica 2. Cultivos saturados de *Symbiodinium* spp. en presencia y ausencia de un herbicida que contiene glufosinato de amonio.....55

III. ABREVIATURAS

GFP: Green Fluorescent Protein, traducido como Proteína Verde Fluorescente.

gfp. Gen que codifica para la proteína verde fluorescente.

RACK1: Receptor for Activated C Kinase 1 (Receptor para la cinasa C activa 1).

AtRACK1C. Gen que codifica para RACK1C proveniente de *Arabidopsis thaliana*.

FABD2: Fimbrin Actin Binding Domain 2 (gen que codifica para el dominio 2 de unión a actina de la Fimbrina).

MBD: Microtubule Binding Domain (gen que codifica para un dominio de unión a microtúbulos).

PEG: Polietilenglicol.

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

ADN: Ácido desoxirribonucleico

***uidA*:** Gen que codifica para la enzima beta-glucuronidasa.

***nptII*:** neomycin phosphotransferase II (gen de resistencia a kanamicina)

***hpt*:** hygromycin B phosphotransferase (gen que codifica para la enzima higromicina fosfotransferasa).

***bar*:** bialaphos gene resistance. (gen de resistencia a herbicidas a base de glufosinato de amonio).

FITC: Fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína).

EDTA: ácido etilendiaminotetra acético.

SDS: sodium dodecyl sulfate. (dodecil sulfato de sodio)

MA: millones de años

SL: splice leader

kDa: Kilodaltones

EST's: marcadores de secuencia expresada

IV. RESUMEN

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* son organismos unicelulares fotosintéticos que pertenecen al grupo de los protistas. Estos dinoflagelados pueden formar asociaciones simbióticas con diversos organismos incluyendo a corales, medusas y anémonas, entre otros. *Symbiodinium* spp. es un simbiote obligado para los corales formadores de arrecife por lo que el arrecife coralino es altamente dependiente de su maquinaria fotosintética. Muchos estudios se han enfocado en conocer su biología y fisiología, así como también en los mecanismos por los cuales se establece la interacción simbiótica con otros organismos. Sin embargo, debido a la falta de herramientas adecuadas para llevar a cabo estudios de genómica funcional, estas investigaciones, en su mayoría, se han hecho mediante técnicas de biología celular y bioquímicas. De hecho, las técnicas de biología molecular han sido aplicadas recientemente, pero no se han llevado a cabo investigaciones significativas utilizando genómica funcional. En este sentido, existe un solo reporte desde 1998 hasta la fecha, de la transformación estable de dinoflagelados de los géneros *Symbiodinium* y *Amphidinium*.

Las técnicas de transformación proveen de una herramienta poderosa que permite la introducción y expresión de genes específicos dentro de organismos vivos para llevar a cabo estudios de genómica funcional. Por ello, métodos de transformación que sean reproducibles y confiables representan herramientas clave para entender la fisiología de estos organismos fotosintéticos. Más aún, estas herramientas son esenciales para la identificación de genes y las vías involucradas en el establecimiento y mantenimiento

de la simbiosis, y para entender los mecanismos celulares y moleculares que desembocan en la asociación simbiótica entre los cnidarios y los dinoflagelados. Dichos mecanismos incluyen la señalización entre simbiote-hospedero, la coordinación de la división celular y el control del transporte de nutrientes, así como también la identificación de genes y las vías involucradas en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis.

En años recientes, se ha reportado la transformación exitosa de muchos organismos incluyendo microalgas. Además, el método de transformación estable de plantas mediado por *Agrobacterium tumefaciens* se ha utilizado para transformar organismos eucarióticos diferentes de las plantas bajo condiciones de laboratorio, los cuales incluyen levaduras, algas verdes, hongos filamentosos, hongos cultivados, o inclusive células humanas en cultivo *in vitro*. A la fecha, estos procedimientos no han sido aplicados para transformar células de *Symbiodinium* spp. aún cuando es imperativo el desarrollo y aplicación de técnicas de ingeniería genética apropiadas que permitan avanzar en el conocimiento de la biología básica de estos organismos fotosintéticos que representan un componente indispensable para la vida del arrecife coralino.

En este trabajo, tres clados de dinoflagelados del género *Symbiodinium* fueron transformados con tres construcciones diferentes de proteínas heterólogas fusionadas con GFP mediante la agitación en presencia de perlas de vidrio, polietilenglicol y la co-incubación con *Agrobacterium tumefaciens*. Este es el primer reporte de la transformación de células de *Symbiodinium* spp. en cultivo mediante el uso de *A. tumefaciens*, lo cual representa un parteaguas para estudios futuros de genómica funcional en estos organismos.

V. ABSTRACT

Dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* are unicellular photosynthetic organisms that belong to the protists and live in symbiosis within a wide phyletic range of marine invertebrate hosts species including corals, anemones, and jellyfish. Since *Symbiodinium* spp. are obligate symbionts of the reef-building corals, coral reefs are thus, highly dependent on their photosynthetic machinery. In this context, many studies that attempt to dissect the biology and physiology of these dinoflagellates, as well as the multiple pathways by which physiological and symbiotic interaction mechanisms are controlled and regulated, have been carried out. However, due to the lack of appropriate tools for functional genomics applications, all these studies have been, for the most part, carried out using biochemical and cell biological techniques. In fact, molecular biology techniques have only been applied recently and to a limited extent, on these organisms, but no significant functional genomics research has been carried out. This is greatly due to the fact that to date, only one report of stable transformation of the dinoflagellates *Symbiodinium* and *Amphidinium* in culture exists.

Transformation techniques provide a powerful tool that allows the introduction and expression of specific genes into a living organism for such functional genomics studies. Thus, reproducible and reliable genetic transformation methods are a key tool for understanding the physiology and cell biology of these photosynthetic dinoflagellates. More importantly, these tools are essential to dissect and understand the cellular and molecular mechanisms underlying the cnidarian–dinoflagellate symbiosis such as inter-partner signaling, coordination of cell division, control of nutrient transport, and to

ultimately identify target genes and their associated pathways involved in the establishment and maintenance of symbiosis.

The successful transformation of many organisms including microalgae, have been reported in recent years. Moreover, the standard method for stable transformation of plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, has been widely used to transform non-plant eukaryotic organisms under laboratory conditions; these have included yeasts, green algae, filamentous fungi, cultivated mushrooms, and even *in vitro* human cultured cells. These procedures have not been applied to transform *Symbiodinium* spp. cells to date, even though it is imperative to develop and apply the appropriate genetic engineering techniques that will allow major advances in understanding the basic biology of this organism.

In this work, three clades of dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* were transformed with three different constructions of GFP-fused proteins via shaking in the presence of glass beads, polyethylene glycol and, co-incubation with *Agrobacterium tumefaciens*. This is the first report of the use of *A. tumefaciens* to transform *Symbiodinium* spp. cells in culture and represents a key milestone for future functional genomics studies on these organisms.

VI. INTRODUCCIÓN

Los dinoflagelados (división Pyrrhophyta, clase Dinophyceae) son un *phylum* de eucariontes unicelulares que habitan tanto aguas marinas como continentales. Como parte del fitoplancton fotosintético, son responsables de la mayoría de la producción primaria en océanos, ríos y lagos. Los dinoflagelados pertenecen al superfilo de los alveolados y están relacionados cercanamente a los apicomplexos y a los ciliados [Baldauf, 2003]. Actualmente comprenden alrededor de 2 mil especies [Coats, 2002], su origen es monofilético y la evidencia fósil muestra que surgieron en el período siluriano (hace 400 MA) o antes, dándose su mayor apogeo en el Triásico [Fensome *et al.* 1999].

Los dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium* son genéticamente muy diversos y están divididos en nueve diferentes linajes, referidos como clados A-I [Coffroth y Santos 2005, Pochon y Gates 2010]. *Symbiodinium* spp. tiene la peculiaridad de establecer asociaciones simbióticas con distintos *taxa*, incluyendo cuatro *phyla* de invertebrados marinos (*Cnidaria*: corales, medusas, anémonas; *Mollusca*: caracoles y almejas; *Platyhelminthes*: gusanos planos; *Porifera*: esponjas) y protistas unicelulares (*Foraminifera*) [Venn *et al.* 2008].

Establecer en el registro fósil la relación simbiótica de los corales con los dinoflagelados es problemático debido a que los simbiosomas no son preservables: Sin embargo, mediante algunas estimaciones a partir del tamaño y características del esqueleto de la colonia del coral, de las características estructurales que indiquen una adaptación a la luz [Stanley 2006] y el análisis de isótopos de Carbono y de Oxígeno como marcadores

para inferir la presencia de los fotosimbiontes, se ha concluido que los corales del Triásico tardío albergaban fotosimbiontes [Stanley y Swart, 1995] y que ésta simbiosis pudo haber sido establecida mucho antes durante el Triásico medio [Stanley 2010]. Pochon *et al.* [2006] indican que el evento radiación dentro del género *Symbiodinium* ocurrió hace aproximadamente 50 MA, es decir, al comienzo de Eoceno. Además, sugieren que esta divergencia se relaciona con la gran radiación de corales escleractinios en Eoceno, durante el cual muchas familias de coral moderno aparecieron y consecuentemente los linajes de *Symbiodinium* que divergieron en ese momento, sustituyeron a otros simbiosomas presentes en los corales del Paleoceno.

En los corales, éstos simbiosomas dinoflagelados se encuentran en el tejido digestivo envueltos en una estructura membranal llamada simbiosoma. [Wakefield y Kempf 2001]. Dentro del coral, *Symbiodinium* spp. funciona como productor primario y proveedor de energía; a cambio, recibe nutrientes esenciales como fosfato y amonio (limitados en el agua marina), producto del metabolismo del coral [Yellowlees *et al.* 2008]. Este intercambio resulta en un reciclaje de nutrientes que explica parcialmente la presencia de arrecifes de coral en aguas oligotróficas tropicales, y además permite que este ambiente sea uno de los ecosistemas más productivos del planeta.

Symbiodinium spp. al ser un simbiote obligado de los corales escleractinios, es un organismo muy importante para el balance del ecosistema arrecifal ya que provee de la energía requerida para el depósito de carbonato de calcio necesario para formar estas estructuras marinas de gran importancia ecológica y económica [Pearse y Muscatine 1971, Muscatine y Porter 1977]. Los arrecifes de coral albergan a miles de organismos

y mantienen la gran diversidad biológica local, además de sustentar la actividad económica de millones de personas en todo el mundo que dependen del turismo, la pesca y la protección costera que provee este ambiente marino [Hoegh-Guldberg *et al.* 2007]. Sin embargo, la relación simbiótica entre *Symbiodinium* spp. y los corales es vulnerable a perturbaciones ambientales; cuando los corales se encuentran bajo estrés físico, químico o biológico provocado por cambios en la temperatura del agua o por la aparición de enfermedades, se provoca el rompimiento de la asociación simbiótica entre el dinoflagelado y el coral [Graham *et al.* 2006, Hoegh-Guldberg *et al.* 2007].

Aún cuando se ha avanzado en el conocimiento del rompimiento de esta asociación simbiótica [Fitt *et al.* 2009, DeSalvo *et al.* 2010], los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares no se conocen completamente, por lo que el desarrollo de estrategias y la aplicación de nuevas técnicas que permitan conocer la fisiología de estos simbioses dinoflagelados es de suma importancia.

El desarrollo de técnicas de transformación y su aplicación en ensayos de genómica funcional representa un parteaguas en el desarrollo de la investigación básica y aplicada para el estudio de *Symbiodinium* spp. A la fecha existe un solo reporte de transformación de *Symbiodinium* spp. [ten Lohuis y Miller 1998] en el cual fueron utilizados tres genes bacterianos (*nptII*, *hpt* y *uidA*) fusionados a promotores heterólogos para ser expresados en dos dinoflagelados: *Amphidinium* sp. y *Symbiodinium microadriaticum*. Aunque los resultados de ten Lohuis y Miller [1998] son alentadores, ningún otro grupo ha informado del éxito de transformación de estos organismos fotosintéticos marinos usando la metodología reportada.

VII. ANTECEDENTES

A. El género *Symbiodinium*

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* son protistas unicelulares fototróficos que se encuentran tanto en vida libre como en relaciones mutualistas con otros organismos. Estos organismos establecen relaciones simbióticas con una gran variedad de invertebrados marinos como cnidarios, platelmintos, moluscos, poríferos, y foraminíferos. El género *Symbiodinium* comprende el grupo más grande y prevalente de dinoflagelados endosimbióticos conocidos hasta ahora [Trench, 1979; Pawlowski *et al.* 2001]. En simbiosis, estos organismos unicelulares se encuentran comúnmente en el endodermo de los cnidarios tropicales como los corales, anémonas y medusas, donde ellos translocan los productos de la fotosíntesis hacia su hospedero y reciben a cambio nutrientes inorgánicos.

Symbiodinium spp., es coloquialmente llamado zooxantela y a los animales que hospedan a estos microorganismos han sido llamados zooxantelados. Este término zooxantela, ha sido vagamente utilizado para referirse a cualquier endosimbionte de pigmentación café, incluyendo a las diatomeas y a otros dinoflagelados. Debido a la confusión que puede generar su uso generalizado para cualquier relación simbiótica este término debería ser discontinuado de la literatura científica.

B. Morfología y Ciclo de vida de *Symbiodinium* spp.

Los miembros del género *Symbiodinium* presentan una característica fenotípica dominante: la apariencia de una célula cocoide con coloración café-oro con un diámetro de 5-15 μm . Debido a esta gran similitud morfológica se les había considerado como una especie simbiótica única: *Symbiodinium microadriaticum* [Freudenthal, 1962]. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que estos organismos dinoflagelados son genéticamente muy diversos [Rowan y Powers, 1991] que están separados entre sí por decenas de millones de años [Pochon *et al.* 2004; Lajeunesse, 2005; Pochon y Gates, 2010]. Así mismo, exámenes detallados en la ultra estructura y composición de *Symbiodinium* spp. han mostrado características y diferencias significativas que incluyen: número de cromosomas, diferencias en el tamaño celular en su ciclo de vida; el arreglo, tamaño y número de cloroplastos, producción de aminoácidos del tipo micosporinas, composición de ácidos grasos y esteroides, así como también características fisiológicas fotoadaptativas.

La primera descripción morfológica del género *Symbiodinium* fue basada originalmente en la especie holotipo *Symbiodinium microadriaticum* [Freudenthal, 1962]. Estos dinoflagelados presentan dos principales estadios en su ciclo de vida: mastigoto (célula móvil) y cocoide (célula inmóvil) (Fig. 1).

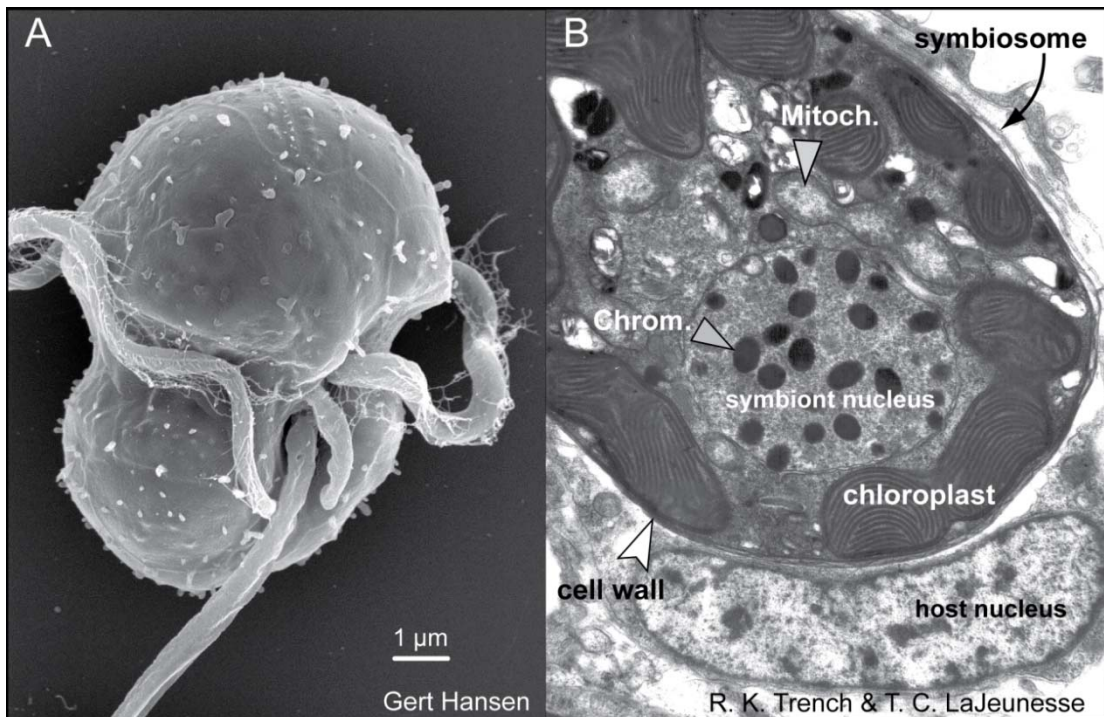


Figura 1. Estadios principales de *Symbiodinium* spp. **A:** Célula móvil (mastigoto), la cual se observa cuando los dinoflagelados se encuentran en vida libre o en cultivo. **B:** Célula cocoide (etapa no móvil). En la micrografía se observa una célula de *Symbiodinium* spp. en simbiosis [LaJeunesse *et al.* 2012].

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* presentan distintas formas en su ciclo de vida, se pueden presentar como quistes vegetativos o zoosporas móviles (Fig. 2). El quiste vegetativo, con un tamaño de entre 5 y 15 µm, presenta en la periferia celular una “envoltura” de cloroplastos que contienen membranas tilacoides paralelas multilobuladas, productos de asimilación, almidón y una o dos vacuolas [Freudenthal, 1962; Schoenberg y Trench, 1980; Blank, 1987]. Este también presenta los compartimentos citosólicos típicos de eucariontes.

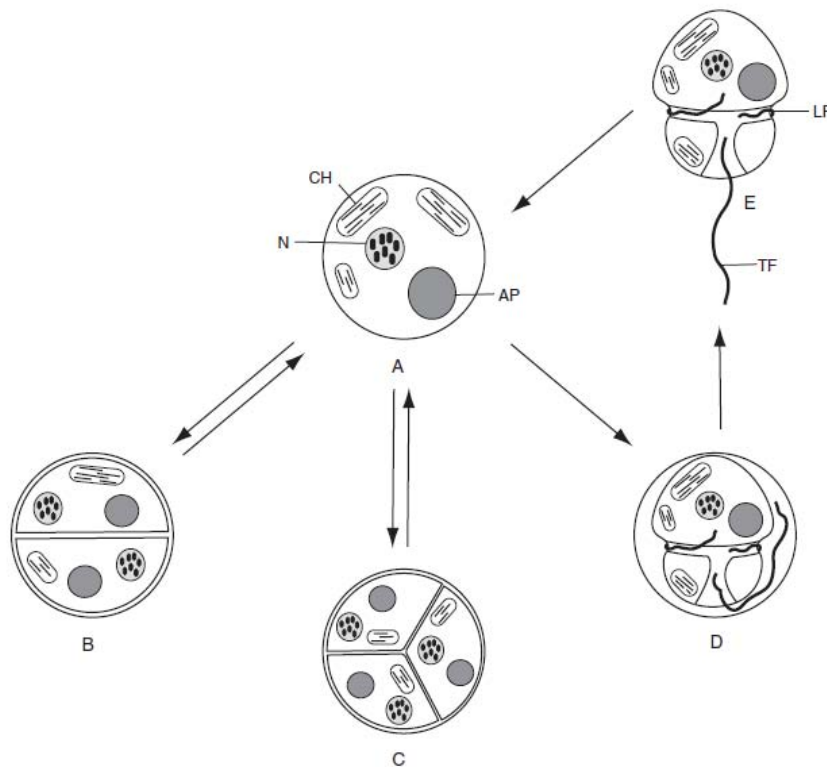


Figura 2. Ciclo de vida de *Symbiodinium* spp. (A) quiste vegetativo, (B) quiste vegetativo dividiéndose y produciendo dos células hijas, (C) quiste vegetativo dividiéndose y produciendo tres células hijas, (D) zoospora en desarrollo y (E) zoospora. CH: cloroplasto; N: núcleo; AP: producto de acumulación; LF: flagelo longitudinal; TF: flagelo transversal [Stat *et al.* 2006].

Symbiodinium spp. puede encontrarse tanto en vida libre como en simbiosis, aunque poco se sabe de la abundancia o diversidad en ambientes externos al hospedero. Una característica importante de *Symbiodinium* spp. es que se pueden mantener en cultivo en condiciones de laboratorio. Este hecho permite realizar exploraciones bioquímicas y moleculares directamente en el microorganismo.

C. Organización del núcleo.

Además de su diversidad ecológica, los dinoflagelados muestran algunas características genéticas que los hacen distintos de otros eucariontes. El tamaño de su genoma es muy grande y variable, se estima que van desde las 3 hasta 245 gigabases de tamaño [Lin, 2011; Veldhuis *et al.* 1997]. Además, a lo largo del ciclo celular su ADN genómico se encuentra en forma de cromosomas condensados [Rizzo, 1991; Shoguchi *et al.* 2013]. Algunas de estas observaciones condujeron a concluir que los dinoflagelados carecían de histonas. Sin embargo, los estudios recientes han confirmado la presencia de éstas [Bayer *et al.* 2012] en miembros de este linaje. Los genomas de los dinoflagelados pueden albergar de 40,000 a 90,000 genes, lo cual puede ser debido al alto número de copias de genes. Sin embargo, se cree que la mayoría de su ADN es no codificante (98-99.9%) [Hou y Lin, 2009]. De acuerdo a algunas de las estimaciones, *Symbiodinium* spp. contiene uno de los genomas más pequeños dentro de los dinoflagelados [LaJeunesse, 2005]. El número de cromosomas presentes en *Symbiodinium* spp. no se conoce con exactitud. De acuerdo con Trench y Blank [1987] el número de cromosomas presentes (por genoma haploide) en *S. microadriaticum*, *S. goreauii*, *S. kawagutii* y *S. pilosum* es de aproximadamente: 97, 72, 26 y 78, respectivamente. Por otra parte, Udy *et al.* [1993] encontró números muy variables de las regiones de ADN condensadas, que van desde menos de 10 a más de 100. Esta gran diversidad en el número de cromosomas también se ha observado en otros dinoflagelados, donde se reportan variaciones de 4 a 270 [de la Espina *et al.* 2005]. Por otra parte, además de las cuatro bases de ADN comunes (adenina, citosina,

guanina y timina), los dinoflagelados son los únicos eucariontes conocidos que en su genoma presentan una gran cantidad de la base modificada hidroximetiluracilo, que puede sustituir a la timidina entre 12 y 68% de estos residuos [Blank *et al.* 1988; Rae, 1976]. Otra característica única de la maquinaria molecular de los dinoflagelados es el trans-splicing de las secuencias “spliced leader”. En este proceso, una secuencia altamente conservada llamada “spliced leader” (SL) se incorpora al extremo 5’ de los ARNm. El trans-splicing a base de SL actúa para convertir mARNs polycistrónicos a ARNm monocistrónicos y también se ha sugerido que podría regular la expresión génica [Lin *et al.* 2010; Lin, 2011].

D. Estudios de transcriptómica en *Symbiodinium* spp.

A nivel de estudios de transcriptómica, los esfuerzos se han dedicado principalmente a la comprensión de los procesos celulares y moleculares implicados en el establecimiento de la simbiosis desde la perspectiva del hospedero [Weis, 2008; Voolstra *et al.* 2009a; Schnitzler y Weis, 2010; Yuyama *et al.* 2011]. Por otro lado, desde la perspectiva del simbiote, los estudios han sido enfocados principalmente a la generación y análisis de marcadores de secuencia expresada (*Expressed Sequence Tags*, EST’s) bajo diferentes condiciones [Leggat *et al.* 2007; Voolstra, 2009b; Bayer *et al.* 2012]. Los ESTs son porciones de genes expresados que varían en longitud y proporcionan una “instantánea” de los genes activos en una muestra, en un momento y en condiciones específicas [Miller *et al.* 2011]. Este tipo de análisis del transcriptoma

permite examinar la expresión de una amplia variedad de genes; sin embargo, esta expresión solo representa la respuesta a las condiciones en las cuales se encontraba la célula en un momento dado. Por otra parte, existen algunos estudios de expresión génica basada en microarreglos para *Symbiodinium* spp. Sin embargo, el uso de éstas herramientas moleculares es todavía limitado debido a la falta de secuencias de referencia disponibles para los diferentes clados de éste género, ya que solo recientemente se ha reportado la secuenciación del genoma de *Symbiodinium minutum* [Shoguchi *et al.* 2013]. Más aún, ninguno de los estudios a nivel de transcriptoma ha combinado un enfoque que examine al hospedero y al simbiote en un solo experimento.

El uso de métodos de transformación genética en *Symbiodinium* spp. está restringido a un solo reporte [ten Lohuis y Miller, 1998]. Aunque los resultados de dicho reporte fueron en un principio muy alentadores, hasta la fecha ningún otro grupo ha informado que se haya reproducido o aplicado con éxito dicho método de transformación de estos organismos fotosintéticos marinos.

E. Métodos de transformación genética

El término “transformación” se utiliza para describir la inserción de ADN foráneo dentro de organismos como bacterias, plantas, hongos, algas, etc.; mientras que la introducción de material genético a células eucariontes animales se conoce como transfección [Rivera *et al.* 2012]. La transformación genética fue por primera vez

descrita a finales de la década de 1920 por Frederick Griffith [1928], quién reportó que las células de neumococos podían “convertirse” de una cepa inofensiva a una cepa patógena.

La aplicación de los diversos métodos de transformación incrementa drásticamente el avance en el conocimiento y uso experimental del organismo transformado. Además, permite la modificación genética de algunos organismos para la producción a gran escala de compuestos de interés biotecnológico o el mejoramiento de especies de plantas para consumo humano. La diversidad en los métodos es debida a las dificultades que representa la transferencia de genes, siendo la naturaleza misma del ADN uno de los principales obstáculos para lograr una transformación exitosa. El ADN es una macromolécula altamente cargada (debido a las cargas negativas de los fosfatos), por lo que su paso a través de las barreras celulares tales como la pared y la membrana es muy difícil. Es por ello que cada método de transformación presenta ventajas y desventajas en su uso dependiendo del tipo de célula u organismo de interés.

Actualmente existen diferentes métodos de transformación que son aplicados a diversos organismos con fines distintos. Estos métodos se pueden dividir en directos e indirectos [Qayyum *et al.* 2009]. Los métodos de transformación directos, también conocidos como físicos, son aquellos que están basados en la penetración de la pared y/o membrana celular. Algunos ejemplos de métodos de transformación directos son: electroporación [Fromm *et al.* 1985], biolística [Sanford *et al.* 1993], microinyección [Hammer *et al.* 1985], así como agentes disruptores de la pared celular como son las

fibras de carburo de silicio [Asad *et al.* 2008] y perlas de vidrio [Feng *et al.* 2009], entre otros. Algunos de estos métodos son generalmente utilizados en combinación con pre-tratamientos con enzimas que digieren la pared celular [Kindle, 1990]. Por otra parte, los métodos de transformación indirectos son aquellos que introducen el material genético, principalmente en forma de plásmidos (moléculas de ADN circulares independientes), dentro de las células blanco mediante el uso de un vector, como bacterias o virus. En estos métodos, se han aprovechado los mecanismos que han desarrollado estos organismos para introducir material genético a las células hospederas [Scholthof *et al.* 1996; Broothaerts *et al.* 2005]. Las bacterias del género *Agrobacterium* son ampliamente usadas para transformar plantas y en el mejoramiento de cultivos [Tzfira y Citovsky, 2003]. Por otra parte, el uso de virus como vectores para transfectar células animales se ha vuelto cada vez más evidente, como por ejemplo en la terapia génica [Thomas *et al.* 2003].

A continuación se describen algunos de los métodos de transformación más comúnmente usados:

a. Electroporación. Esta técnica de transformación genética es ampliamente utilizada debido a que es simple y rápida. Comúnmente es empleada para transportar sustancias bioquímicas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos al interior de la célula [Weaver y Chizmadzhev, 1996]. El principio de esta técnica se basa en la aplicación de un campo eléctrico que permite la formación de poros en la superficie celular debido a la

alteración de la polaridad en la membrana. Las principales desventajas de esta técnica son la baja eficiencia de transformación en plantas y la necesidad de aplicar pre-tratamientos de degradación de la pared celular para obtener protoplastos en diversos tipos de células [Sawahel y Cove, 1992].

b. Biolística. También conocida como bombardeo de partículas, consiste en la aceleración de partículas acarreadoras de alta densidad, de aproximadamente 2 micras de diámetro, cubiertas con ADN acoplado a oro coloidal, y que atraviesan las células dejando el ADN adentro. Esta técnica fue desarrollada en la década de 1980 para poder transformar genéticamente a algunos cereales [Sanford *et al.* 1987]. La biolística puede ser empleada para la transformación nuclear y/o cloroplasto, así como para la transformación de plantas, bacterias, hongos, células animales e incluso organelos subcelulares [Boynton *et al.* 1988]. Sus principales ventajas son el tiempo reducido de procesamiento, y en el caso de transformación de plantas, el bajo costo de la producción de plantas transgénicas debido a la simplicidad para la introducción de genes múltiples o ADN quimérico. Además, en esta técnica no se requieren de vectores con secuencias específicas ni depende de las propiedades electrofisiológicas de la célula tales como el potencial eléctrico y los componentes estructurales de la membrana celular para la entrada del material genético. Por otra parte, la principal desventaja de esta técnica es la presencia de múltiples copias de los genes introducidos, lo que podría tener efectos no deseados como el silenciamiento génico o

una expresión génica alterada. Otra desventaja es también el alto costo del equipo especializado [Sanford, 1990].

c. Micro inyección. La transformación a través de micro inyección está basada en la introducción de ADN en el núcleo del citoplasma utilizando una pipeta con un micro capilar de inyección de vidrio. Esta técnica es principalmente utilizada para la transformación de células animales [Capecchi, 1980]. Debido a que la pared celular vegetal representa una barrera para el capilar de vidrio, la aplicación de esta técnica está limitada a aquellas plantas cuyas células posean paredes que contengan una delgada capa de ligninas y celulosa. La micro inyección de protoplastos teóricamente podría resolver esta limitación; sin embargo, esto podría producir la liberación de hidrolasas y otros componentes tóxicos desde la vacuola al citoplasma, lo que causaría la muerte rápida de los protoplastos [van Doorn *et al.* 2011]. Aunque es posible eliminar las vacuolas antes de la micro inyección sin ninguna consecuencia en la viabilidad de los protoplastos, su pérdida derivaría en un decremento en la capacidad de división celular, y en consecuencia, en la regeneración de la planta [Lörz *et al.* 1981]. Actualmente, la micro inyección es ampliamente utilizada para la transformación de células animales grandes como por ejemplo, células de óvulo de rana y células de embriones mamíferos [Geurts *et al.* 2009]. Sin embargo, aún no ha sido desarrollado como un método de transformación de rutina para plantas. La principal desventaja de este método es que se trata de un procedimiento tardado y requiere de un micro manipulador que puede llegar a ser muy costoso. Sin embargo, una de las grandes

ventajas es que permite la introducción no sólo de plásmidos de ADN, sino también de cromosomas completos dentro de las células vegetales [Griesbach, 1987; Jones-Villeneuve *et al.* 1995].

d. Transformación mediada por fibras de carburo de silicio. Las características físicas y químicas de las fibras de carburo de silicio, las hacen capaces de perforar a las células sin matarlas. Usando esta propiedad, el método de transformación mediado por fibras de carburo de silicio fue propuesto para la transformación de maíz y tabaco [Kaepler *et al.* 1990]. Este método es fácil de desarrollar, rápido y económico, y puede ser eficientemente implementado para varias especies. De hecho, en el único reporte de transformación de *Symbiodinium* y *Amphidinium*, ten Lohuis y Miller [1998] utilizaron este método, el cual consiste en agregar las fibras de carburo de silicio a una suspensión que consta de las células (puede ser de tejidos, embriones, etc.) y el gen o genes de interés contenidos en plásmidos. La agitación posterior de esta mezcla permite la entrada del ADN en la pared y membrana celulares a través de pequeños orificios creados por la colisión entre las fibras y las células vegetales. La eficiencia de este método depende del tamaño de la fibra, de los parámetros de la agitación (tipo, velocidad y duración); así como de las características celulares y/o especie vegetal, por ejemplo, del grosor de la pared celular [Kaepler *et al.* 1992].

Para emplear este método no se requiere de equipo sofisticado, materiales costosos o técnicos especializados. Sin embargo, las principales desventajas que presenta son la

baja eficiencia de transformación, así como también el daño causado por la manipulación, el cual podría afectar de manera considerable la viabilidad de las células [Rakoczy-Trojanowska, 2002] Además, otra desventaja es el cuidado extremo que se debe tener al manejar las fibras, ya que representan un material peligroso cuya aspiración puede derivar en enfermedades muy serias [Vaughan *et al.* 1991; Songstad *et al.* 1995].

e. Perlas de vidrio. En este método la entrada del material genético a las células se logra mediante la agitación de las mismas en presencia de las perlas de vidrio y usualmente en presencia de PEG. Al igual que el método de transformación mediado por fibras de carburo de silicio, la transformación mediada por perlas de vidrio es una técnica sencilla y rápida y no requiere de equipo especializado. A diferencia de las fibras, las perlas no se manejan como desecho peligroso. Sin embargo, el daño producido a las células por su colisión con las perlas durante la agitación podría resultar en una baja eficiencia de transformación. Por otra parte, este método es usualmente aplicado a protoplastos, para lo cual se requiere de un pre tratamiento enzimático para eliminar la pared celular [Kindle, 1990].

f. Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Los miembros del género *Agrobacterium* son componentes ubicuos de la microflora del suelo; la gran mayoría son saprofitos sobreviviendo primordialmente del decaimiento

de la materia orgánica. Sin embargo, algunas especies de *Agrobacterium* como *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *A. vitis* y *A. tumefaciens* causan enfermedades neoplásicas [Escobar y Dandekar, 2003]. Investigaciones en las últimas décadas han hecho evidente que la patogénesis de *Agrobacterium* es un proceso único y altamente especializado que involucra la transferencia de genes de la bacteria a la planta infectada [McCullen y Binns, 2006; Citovsky *et al.* 2007]. Este mecanismo de transferencia de genes ha sido aprovechado para producir plantas modificadas genéticamente [Newell, 2000]. Interesantemente, se ha reportado recientemente la transformación genética de organismos distintos a las plantas mediante el uso de *Agrobacterium*; por ejemplo, algas verdes [Kumara *et al.* 2004], hongos filamentosos [de Groot *et al.* 1998], levaduras [Bundock *et al.* 1995] e inclusive células humanas en cultivo [Kunik *et al.* 2001].

Aún cuando en la última década las técnicas de transformación genética se han aplicado a varios organismos (bacterias [Terpe, 2006], levaduras [Maráz 1999], y células de mamíferos incluyendo al humano [Kunik *et al.* 2001], la transformación de los dinoflagelados, representa un reto debido a las características celulares que presentan éste grupo de organismos. Los principales problemas encontrados son: la dificultad para introducir ADN a través de la pared celular y la baja expresión de los genes que permiten la selección de las células transformadas. A la fecha existe un solo reporte de transformación de dos dinoflagelados: *Amphidinium* sp. y *Symbiodinium microadriaticum* [ten Lohuis y Miller 1998]. En ese trabajo la secuencia codificante para la enzima beta-glucuronidasa (*uidA*) fue usada como gen reportero. Además, los genes

bacterianos de resistencia a los antibióticos kanamicina (*nptII*) e higromicina, (*hpt*), fusionados a promotores heterólogos, se usaron para seleccionar a las células transformadas. La eficiencia de transformación de este método fue de 5-24 células transformadas por cada 10^7 células. Estos autores también reportaron la integración de estos genes al genoma de los dinoflagelados. La agitación con agujas de carburo de silicio permitió atravesar la pared celular e introducir el material genético a las células; esta técnica había sido previamente aplicada para transformar a *Chlamydomonas reinhardtii* [Dunahay 1993] y a plantas superiores [Wang *et al.* 1995]. Sin embargo, a la fecha no existe otro reporte de transformación genética o reproducibilidad de esta técnica aplicada a *Symbiodinium* spp.

Siguiendo el método de ten Lohuis y Miller [1998] (con algunas variantes) se lograron transformar células de tres diferentes subtipos de los dinoflagelados del género *Symbiodinium*. Las transformaciones se llevaron a cabo con el plásmido purificado pCB302-*gfp-AtRACK1C* que contenían la secuencia codificante para una proteína verde fluorescente (*gfp*) fusionada a la secuencia codificante para RACK1C de *Arabidopsis thaliana* (*AtRACK1C*). Además, se desarrolló un método de transformación mediante la co-incubación con *Agrobacterium tumefaciens* que contenía diferentes construcciones con la secuencia codificante para una proteína verde fluorescente (*gfp*) fusionada a algunas de las siguientes secuencias: a) *AtRACK1C*; b) al dominio 2 de unión a actina de la fimbrina (*FABD2*); o c) al dominio de unión a microtúbulos (*MBD*). El acceso a través de la pared celular del dinoflagelado se logró mediante la agitación con perlas de vidrio en presencia de polietilenglicol (PEG); el gen de resistencia al herbicida Basta[®] se

usó para seleccionar a las células transformadas. El monitoreo de las células transformadas se realizó mediante observaciones en el microscopio de epifluorescencia para detectar la emisión de fluorescencia verde proveniente de la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las células de *Symbiodinium* spp. Además, se verificó la introducción de los genes heterólogos a las células del dinoflagelado mediante la amplificación de las secuencias de *gfp* y *AtRACK1C* por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y ADN genómico. Este trabajo demuestra por primera vez la transformación de células de *Symbiodinium* spp. en cultivo mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con genes heterólogos que contienen proteínas fluorescentes como reporteras.

VIII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen antecedentes de la transformación de dinoflagelados marinos pero no existe confirmación ni metodologías definidas para ello, por lo que es necesario desarrollar una metodología confiable y reproducible para la transformación de estos organismos. La aplicación de la técnica de transformación genética permitirá acelerar el avance en el conocimiento de la biología y fisiología de *Symbiodinium* spp.

IX. OBJETIVOS

A. GENERAL

Diseñar un método optimizado y reproducible de transformación de *Symbiodinium* spp. utilizando vectores que contengan *gfp* como gen reportero.

B. PARTICULARES

Implementar y optimizar la técnica de transformación de células de dinoflagelados marinos del género *Symbiodinium* utilizando una construcción fusionada de *gfp* y un gen heterólogo de *RACK1*.

Transformar con diferentes construcciones que contengan *gfp* como gen reportero, a diversos subtipos de *Symbiodinium* spp. para asegurar que este método sea reproducible y confiable.

X. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material Biológico

Las células de las cepas de *Symbiodinium* sp. MAC-CassKB8 (de aquí en adelante referida como KB8), *Symbiodinium* sp. MAC-Mf11.04b (de aquí en adelante referida como Mf11) y *Symbiodinium kawagutii* Trench & Blank (de aquí en adelante referida como *S. kawagutii*), se obtuvieron de la colección de dinoflagelados marinos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Puerto Morelos (Dra. Patricia Thomé/Dr. Roberto Iglesias Prieto, originalmente obtenidas de la colección de M. A. Coffroth y R.K. Trench) y fueron mantenidas bajo condiciones estériles en medio ASP-8A en fotoperiodos cíclicos de 12 horas luz/obscuridad (80 $\mu\text{moles quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 25°C [Castillo-Medina, *et al.* 2013].

B. Construcciones

a. pCB302-*gfp-AtRACK1C*

El plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* [Ortiz-Matamoros *et al.* 2015a; 2015b] se construyó a partir del plásmido pCB302 [Xiang *et al.* 1999] y consta de 7875 pb que contienen las secuencias de: un gen de resistencia a kanamicina (*nptII*) y el gen *bar* (*bialaphos resistance gene*) de resistencia a herbicidas que contengan glufosinato de amonio. Adicionalmente, contiene el gen de *RACK1C* proveniente de *Arabidopsis*

thaliana (*AtRACK1C*) fusionado a un gen que codifica para la *gfp*, estos a su vez, acoplados al promotor constitutivo *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor (Fig. 3).

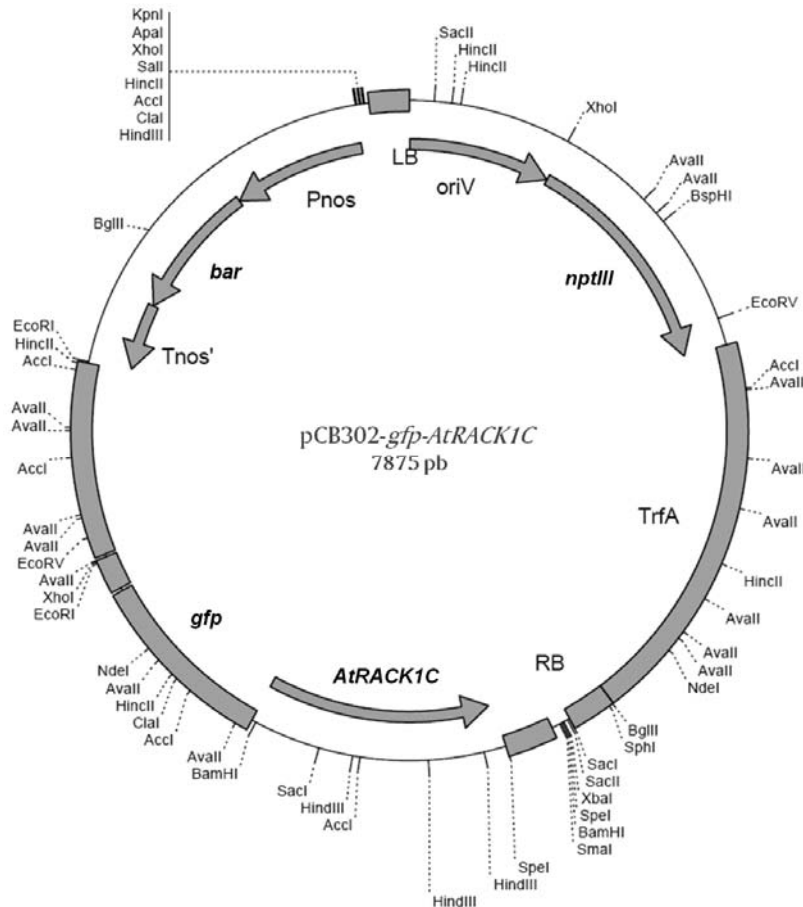


Figura 3. Mapa de restricción del plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*. . El plásmido fue construido para incorporar la fusión de la secuencia de *gfp* con el amino terminal de *AtRACK1C* [Ortiz-Matamoras *et al.* 2015a; 2015b]. El mapa señala los sitios de restricción y los principales genes presentes en esta construcción. *AtRACK1C*: gen que codifica para RACK1C proveniente de *Arabidopsis thaliana* fusionado a GFP; *nptIII*: gen que confiere resistencia al antibiótico kanamicina; *bar*: gene de resistencia a herbicidas que contengan glufosinato de amonio (Basta®, Finale®). RB: (right border), LB (left border). OriV: origen de replicación.

b. pCB302-*gfp*-MBD

El plásmido pCB302-*gfp*-MBD [Marc *et al.* 1998] de 8267 pb, contiene la secuencia de un dominio de unión a microtúbulos (MBD, por sus siglas en inglés: Microtubule Binding Domain) fusionado al gen de la *gfp*. Todos estos genes se encuentran bajo el control del promotor constitutivo *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor. Además contiene el gen *nptII* de resistencia a kanamicina y el gen *bar* de resistencia a herbicidas que contengan glufosinato de amonio (Fig. 4).

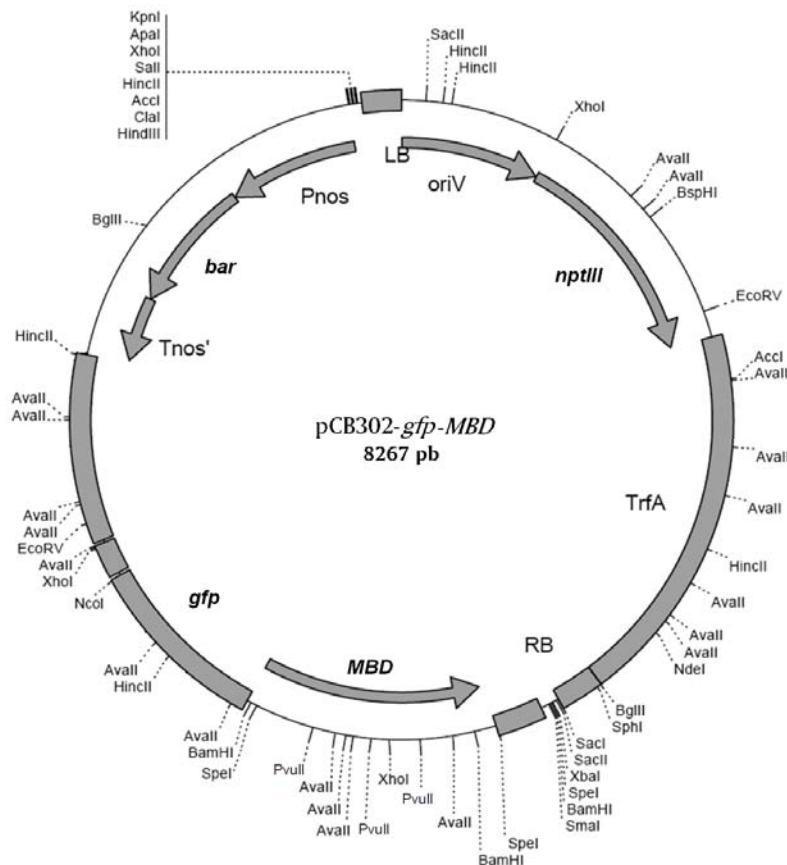


Figura 4. Mapa de restricción del plásmido pCB302-*gfp*-MBD. El mapa señala los sitios de restricción y los principales genes presentes en esta construcción. *MBD*: gen que codifica para un dominio de unión a microtúbulos fusionado al gen de la *gfp*; *nptIII*: gen de resistencia al antibiótico kanamicina; *bar*: gen de

resistencia a herbicidas que contengan glufosinato de amonio (como Basta® o Finale®). RB: (right border), LB (left border). OriV: origen de replicación.

c. pCB302-gfp-FABD2

El plásmido pCB302-gfp-FABD2 [Voigt, *et al.* 2005] de 7895 pb contiene un gen con la secuencia del dominio 2 de unión a actina de la fimbrina (*FABD2* por sus siglas en inglés: Fimbrin Actin Binding Domain 2) fusionado al gen de la *gfp* bajo el control de un promotor constitutivo *CaMV35S* del virus del mosaico de la coliflor. Contiene además los genes *nptIII* y *bar* de resistencia a kanamicina y a herbicidas que contengan glufosinato de amonio, respectivamente. (Fig. 5).

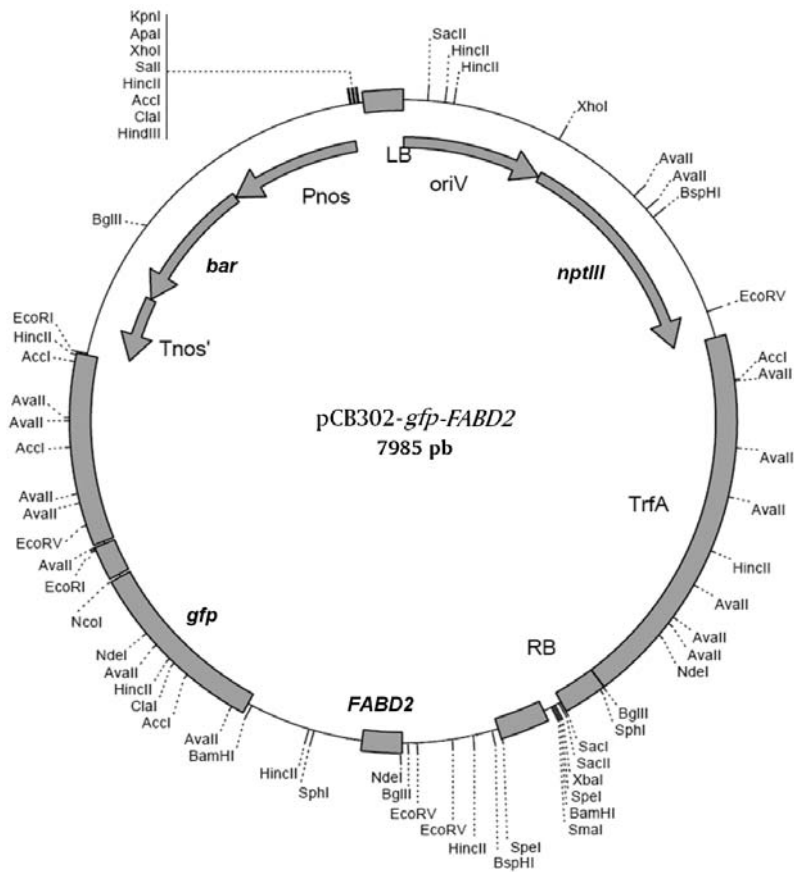


Figura 5. Mapa de restricción del plásmido pCB302-*gfp-FABD2*. En el mapa se señalan los sitios de restricción y los principales genes presentes en la construcción. *FABD2*: gen que codifica para el dominio 2 de unión a actina de la fimbrina, fusionado al gen de la *gfp*; *nptIII*: gen de resistencia al antibiótico kanamicina; *bar*: gen de resistencia a los herbicidas que contengan glufosinato de amonio. RB: (right border), LB (left border). OriV: origen de replicación.

C. *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens de la cepa GV3101 se creció en medio Luria-Bertani (LB: 10% bacto-triptona, 5% extracto de levadura, 10% NaCl) adicionado con kanamicina (50 µg/ml), gentamicina (25 µg/ml) y rifampicina (100 µg/ml) a 28°C y agitación constante (200 rpm) por aproximadamente 16 h hasta que la OD₆₀₀=1.5. Posteriormente, una alícuota del cultivo fue transferida a cajas petri con medio LB sólido (LB-bacto agar 15 g/L) y antibióticos e incubadas a 28°C hasta la aparición de colonias. Una vez que aparecieron colonias, las cajas fueron mantenidas a 4°C hasta su uso.

D. Aislamiento y purificación de los plásmidos pCB302-*gfp-AtRACK1C*, pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2*

Las cepas de *A. tumefaciens* que contenían los plásmidos pCB302-*gfp-AtRACK1C*, pCB302-*gfp-MBD* o pCB302-*gfp-FABD2*, fueron incubadas como se mencionó anteriormente hasta que la OD₆₀₀=1.5. Del cultivo resultante se tomaron alícuotas y se aislaron los plásmidos mediante el sistema de purificación de DNA Wizard® Plus SV Minipreps (Promega Corporation, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del

fabricante. Los plásmidos aislados fueron analizados por electroforesis en un gel de 1 % (p/v) agarosa en búfer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) a 80 V durante 80 min. Posteriormente, el gel fue incubado con SYBR Green I (Molecular Probes Inc. Eugene, OR) en búfer TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) o GelRed (Biotium, Inc. Hayward, CA) en agua, a una dilución 1:10 000 durante 30 min. Al término del tiempo de incubación el gel fue observado en un transiluminador con luz ultravioleta.

E. Digestión de los plásmidos *pCB302-gfp-AtRACK1C*, *pCB302-gfp-MBD* y *pCB302-gfp-FABD2* con enzimas de restricción

El análisis de los plásmidos se realizó mediante el corte con las enzimas de restricción *SmaI* (Promega Corporation, Madison, WI), *BamHI* (Life Technologies Corp. Carlsbad, CA) y *BglII* (Life Technologies Corp. Carlsbad, CA), las cuales reconocen las secuencias 5'-CCC|GGG-3' y 3'-GGG|CCC-5', 5'-G|GATCC-3' y 3'-CCTAG|G-5', 5'-A|GATCT-3' y 3'-TCTAG|A-5', respectivamente. Los plásmidos se incubaron con cada una de las enzimas (*SmaI* 25°C, *BamHI* 37°C y *BglII* 37°C) durante 1 h. Los productos resultantes del corte fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa como se describió anteriormente.

F. Amplificación de *AtRACK1C* y *gfp* de los plásmidos pCB302-*gfp-AtRACK1C*, pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2* mediante la técnica de PCR

Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y utilizando oligonucleótidos específicos (oligos) se amplificó una parte de la secuencia codificante del gen de *AtRACK1C* presente en pCB302-*gfp-AtRACK1C*. Así mismo, se amplificó una parte de la secuencia codificante de los genes *gfp* y *nptIII* presentes en los plásmidos pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2*. Se realizaron 30 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C, 30 s, alineamiento 52°C, 45 s y extensión 72°C por 1 min. Los oligos utilizados fueron: *forward* (AtFw): 5'-ACCATGGCCGAGGGACTC-3', *reverse* 1 (AtRv1): 5'-CTAGTGTAACGACCAATACCC-3' y *reverse* 2 (AtRv2): 5'-CCAACAAGAGAGTTCCTC-3' para amplificar una parte de la secuencia de *AtRACK1C*. *Forward* (*gfpFw*): 5'-GATGAGTAAAGGAGAAGA-3' y *reverse* (*gfpRv*): 5'-TATTTGTATAGTTCATCCATGCC-3', para amplificar una parte de la secuencia de *gfp* y *forward* (kanFw): 5'-CCGGACGCAGAAGGCAATGT-3', *reverse* (kanRv): 5'-AAGCTGGTGGGAGAAAATGAAAAC-3', para amplificar una parte de la secuencia de *nptIII*. Los productos de la amplificación fueron analizados en un gel de agarosa como se describió anteriormente.

G. Cultivos de *Symbiodinium* spp. en presencia de glufosinato de amonio (Basta[®]/Finale[®])

Para verificar que el herbicida que contiene glufosinato de amonio (conocido comercialmente como Basta[®] o Finale[®]) es capaz de matar a las células de *Symbiodinium* spp, se hicieron cultivos en presencia y ausencia de este compuesto. Se ensayaron por triplicado cultivos subsaturados y saturados (1×10^5 y 5×10^5 células/mL, respectivamente) de *S. KB8*, *S. Mf11* y *S. kawagutii*, los cuales fueron incubados en presencia o ausencia de 1 mg/mL del herbicida Finale[®] (Bayer) que contiene glufosinato de amonio. La densidad de células se determinó mediante un hematocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA), por duplicado cada dos días.

H. Transformación de *Symbiodinium* spp. con el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*

De los cultivos de *Symbiodinium* spp., se tomó una alícuota (13×10^6 células en medio ASP-8A) y se agregó a una mezcla de transformación que consistía de 100 μ l del plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* aislado de *A. tumefaciens* (500 ng/ml), 300 μ l de PEG 3500 (Sigma-Aldrich, St. Louis MO EE. UU.), a una concentración final del 5% y un volumen aproximado de 200 μ l de perlas de vidrio (600 μ m de diámetro, Sigma-Aldrich) en un tubo con fondo cónico de 2 ml. La introducción del plásmido a través de la pared y membrana celular se logró mediante agitación en un “bead beater” (Bio Spec Products Inc. Bartlesville, OK) a 2500 rpm durante 90 s. Posteriormente, la mezcla se transfirió a tubos de cultivo transparentes y se le adicionó medio de selección (ASP-8A,

50 $\mu\text{g/ml}$ kanamicina y 1 mg/ml del herbicida Basta[®] o Finale[®]) para seleccionar aquellas células que hubieran sido transformadas. Las células en transformación se mantuvieron en medio de selección con fotoperiodos cíclicos de 12 h luz/obscuridad (40 $\mu\text{moles quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a 25°C. Posteriormente, fueron observadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemania) por contraste de fases y bajo un filtro para FITC (excitación 450-490 nm, emisión 510-515 nm) a diferentes periodos de tiempo. Las imágenes fueron adquiridas mediante una cámara Canon PowerShot A640 (Canon Inc. Japón) y procesadas con el programa Zeiss AxioVision (Carl Zeiss).

I. Transformación de *Symbiodinium* spp. mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

De cada uno de los cultivos de *S. kawagutii*, *S. Mf11* y *S. KB8*, se tomó una alícuota de 1.3×10^7 células y fue agregada a una mezcla de transformación que consistía de 300 μl de PEG 3500 (Sigma-Aldrich) a una concentración final del 5% y un volumen aproximado de 200 μl de perlas de vidrio (Sigma) en tubos con fondo cónico de 2 ml. Después, la mezcla de transformación fue agitada en un “bead beater” a 4200 rpm durante 1 min. Posteriormente, la mezcla fue transferida a tubos de cultivo transparentes y fueron adicionados 150 μl de células de *A. tumefaciens* ($\text{OD}_{600}=1.5.$) crecidas como se describió previamente. Después de 1-2 días, se adicionó medio de selección que contenía kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y el herbicida Basta[®] o Finale[®] (1 mg/ml) para seleccionar aquellas células que hubieran sido transformadas. Para eliminar a la

bacteria se agregó una solución comercial de antibióticos/antimicótico, 1000 unidades de penicilina, 1 mg de estreptomina y 2.5 µg de anfotericina por ml (Sigma), o ampicilina a una concentración final de 50 µg/ml. Las células transformadas se mantuvieron bajo fotoperiodo, y fueron observadas en el microscopio de fluorescencia como se describió anteriormente.

J. Extracción de ADN genómico de cultivos normales y transformados de *Symbiodinium* spp.

Para la extracción del ADN de células de *Symbiodinium* spp. en cultivo se tomó una alícuota de 25 ml que fue centrifugada a 3000 g por 10 min para sedimentar las células y eliminar el medio de cultivo. Se adicionaron 600 µl de búfer de lisis (0.2 M Tris, 2 mM EDTA, 0.7% SDS), se transfirieron a un tubo con perlas de vidrio (\approx 0.3 g) y la mezcla se agitó a 4800 rpm por 2 min en un mini "bead beater". Se agregó Proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 65°C por 1 h. Al final del tiempo de incubación se agregaron 260 µl de 9 M acetato de amonio y se mantuvieron por 1 h a -20°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 g por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo para después mezclarlo con 700 µl de isopropanol y 25 µl de 3 M acetato de sodio e incubarlo a 4°C por 2 h. Concluido ese tiempo se centrifugó a 13000 g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se hicieron lavados con 70% etanol (EtOH). Finalmente, el EtOH utilizado en los lavados se eliminó y el precipitado fue resuspendido en 50 µl de agua destilada. Del ADN genómico extraído se tomó una

alícuota y se analizó en un gel de 1% agarosa teñido con SYBR Green I en TBE o Gel Red en agua a una dilución 1:10000 y el resto se guardó a -70°C hasta su uso.

K. PCR Inverso

El PCR inverso fue diseñado para amplificar regiones desconocidas del ADN situadas en posición vecinal a secuencias conocidas. De tal manera que en lugar de amplificar la región interna flanqueada por los dos oligos (PCR convencional), se amplifica la región externa que flanquea a los mismos. Previo a la amplificación, se requiere de la digestión del ADN genómico y de la ligación de los productos. Además se requiere de oligos provenientes de las secuencias conocidas que flanqueen a las regiones desconocidas de interés.

Utilizando la técnica de PCR inverso, se intentó obtener distintos productos de amplificación con las regiones que flanquean a las secuencias incorporadas al genoma de *Symbiodinium* spp. mediante la transformación mediada por *A. tumefaciens*. El ADN genómico de los cultivos transformados de *S. KB8*, *S. Mf11* y *S. kawagutii* fue extraído como se describió anteriormente. Posteriormente, éste fue digerido con la enzima de restricción *BglIII* (Life Technologies Corp) durante toda la noche a 37°C y ligado con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific Inc.). Para diseñar los oligos para el PCR inverso se utilizó la secuencia del gen *bar* debido a que este gen se encuentra adyacente a una secuencia de corte para la enzima *BglIII*. Se diseñaron tres juegos de oligos: barInv-Fw1 5'-GGACTGGGCTCCACGCTCTACACCC-3' y barInv-Rv1

5'-CGTGCCTTCCAGGGACCCGCGTAGG 3'; barInv-Fw2 5'-GCTGAAGTCC CTGGAGGCACAGGGC-3' y barInv-Rv2 5'-CCTGCGGTTCTGCGGCTCGGTACG-3'; barInv-Fw3 5'-CGTGGTCGCTGTCATCGGGCTGCCC-3' y barInv-Rv3 5'-GGATGTCGGCCGGGCGTCGTTCTGG-3. Se realizaron 30 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C, 30 s, alineamiento 62°C, 1 min y extensión 72°C por 2 min. Los productos de amplificación se analizaron en un gel de agarosa como se describió anteriormente.

L. Amplificación de un fragmento del gen de *AtRACK1C* a partir de ADN genómico de células de *Symbiodinium* spp. transformadas

El ADN aislado de las células de *S. kawagutii*, *S. KB8* y *S. Mf11* normales y transformadas con el gen de *AtRACK1C*, se usó como templado para amplificar una parte de la secuencia del gen de *AtRACK1C* por PCR. La amplificación se realizó con el platinum™ PCR supermix (Molecular Probes Inc. Eugene, OR) y los oligos AtFw1, AtRv1 y AtRv2. Se realizaron 35 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C, 30 s, alineamiento 52°C, 45 s y extensión 72°C por 1 min. Los productos de amplificación fueron posteriormente analizados en un gel de agarosa como se describió anteriormente. Cada banda fue cortada del gel y purificada usando el Gel Purification kit S.N.A.P.™ (Invitrogen Corporation), según las instrucciones del fabricante para posteriormente ser enviadas a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

M. Amplificación de una parte de la secuencia de *gfp* a partir de ADN genómico de células de *Symbiodinium* spp. transformadas

El ADN aislado de células normales y de células transformadas de *S. kawagutii*, *S. KB8* y *S. Mf11*, fue usado como templado para amplificar una parte de la secuencia del gen de *gfp* por PCR. La amplificación se realizó con TopTaq Master Mix (Quiagen) y los oligos *gfpFw*, y *gfpRv*. Se realizaron 35 ciclos de amplificación bajo las siguientes condiciones: desnaturalización 94°C, 30 s, alineamiento 52°C, 45 s y extensión 72°C por 1 min. Posteriormente, los productos amplificados fueron analizados en un gel de agarosa, purificados y enviados a secuenciar como se describió anteriormente.

N. Inmunodetección (Western blot) de la proteína híbrida GFP-AtRACK1C en extractos totales de proteínas de células de *Symbiodinium* spp. transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens*

a. Anticuerpo y Sonda Secundaria

El anticuerpo policlonal producido en conejo anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas) contra un epítotope que corresponde a los aminoácidos 1-238 de la GFP fue utilizado para inmunodetectarla en las células transformadas. Como sonda secundaria se utilizó la proteína A acoplada a fosfatasa alcalina (SIGMA) producida en

Staphylococcus aureus, la cual tiene una alta afinidad hacia las inmunoglobulinas G de la mayoría de los mamíferos (excepto de rata, cabra y oveja).

b. Extracción de proteínas totales de *Symbiodinium* spp. y análisis por Western blot

Para la obtención de extractos totales de proteínas de células en cultivo de *Symbiodinium* spp. normales y transformadas, éstas se centrifugaron y resuspendieron en un búfer de fosfatos (PBS: 2.8 mM NaH₂PO₄, 7.2 mM Na₂HPO₄, 0.14 M NaCl, pH 7.4) y un coctel de inhibidor de proteasas Complete[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Germany). El rompimiento de las células se realizó mediante agitación con perlas de vidrio en un “bead beater”. Posteriormente, los extractos celulares se resuspendieron en búfer de Laemmli [1970] y se calentaron a 95°C por 5 min. Mediante electroforesis en un gel de 12% poliacrilamida en condiciones desnaturizantes [Laemmli 1970] se realizó la separación de proteínas, para luego ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, MA) utilizando un búfer sin metanol [Villanueva, 2008] y corriente constante por 1 h a 300 mA. La membrana fue bloqueada por 1 h a 50°C en 3% de albúmina de suero bovino en PBS e incubada toda la noche con el anticuerpo anti-GFP diluido en PBS-T (PBS - 0.01% Tritón X-100). Posteriormente, se lavó 5 veces con PBS-T y se incubó con proteína A acoplada a fosfatasa alcalina por 2 h a 25°C (SYGMA). Finalmente, se lavó 5 veces con PBS-T y se incubó con una solución comercial de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) y nitro

azul de tetrazolio (NBT) para llevar a cabo una reacción enzimática que permita detectar la reacción antígeno-anticuerpo-Proteína A.

O. Inoculación de pólipos de *Cassiopea xamachana* con *Symbiodinium* KB8

Los pólipos (scifistomas) de la medusa *Cassiopea xamachana* fueron mantenidos en placas de 6 pozos con agua de mar artificial (Instant Ocean® Blacksburg, VA) a 25°C y oscuridad. La alimentación de los pólipos se realizó cada tercer día con artemia recién eclosionada. Para los experimentos de infección con *S. KB8*, se les dejó de alimentar 5 días antes del experimento. Para determinar si las células transformadas de *S. KB8* son capaces de establecer simbiosis con los pólipos de *C. xamachana* se seleccionaron 5 pólipos de diferentes tamaños y se co-incubaron con células de *S. KB8* transformadas con *gfp-MBD* o *gfp-FABD2*. Además, como control positivo se usaron células normales de *S. KB8* y como control negativo células de *S. Mf1.05b*, las cuales no son capaces de establecer simbiosis con la medusa. Posterior a la incubación, se realizaron observaciones en un microscopio estereoscópico para determinar si los pólipos cambiaban su morfología.

XI. Resultados

A. Análisis de los plásmidos pCB302-*gfp-AtRACK1C*, pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2* con enzimas de restricción

a. Digestión de pCB302-*gfp-AtRACK1C* con *SmaI*, *BamHI* y *BglII*

El análisis del plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* se realizó mediante el corte con las enzimas de restricción *SmaI*, *BamHI* y *BglII*. Para la enzima *SmaI* existe un solo sitio de restricción en plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*, por lo que la digestión con esta enzima generó un solo producto de 7875 pb que correspondió al tamaño del plásmido (Fig. 6 B, carril 1). Por otra parte, la incubación con *BamHI* generó dos fragmentos de aproximadamente 6600 y 1200 pb (Fig. 6 B, carril 2), mientras que la digestión con *BglII* produjo 2 fragmentos de alrededor de 4200 pb y 3600 pb (Fig. 6 B, carril 3). Ya que en el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* existen dos sitios de restricción para cada una de estas enzimas, los productos obtenidos en la digestión correspondieron a lo esperado con respecto al mapa de restricción de éste plásmido (Fig. 6 A).

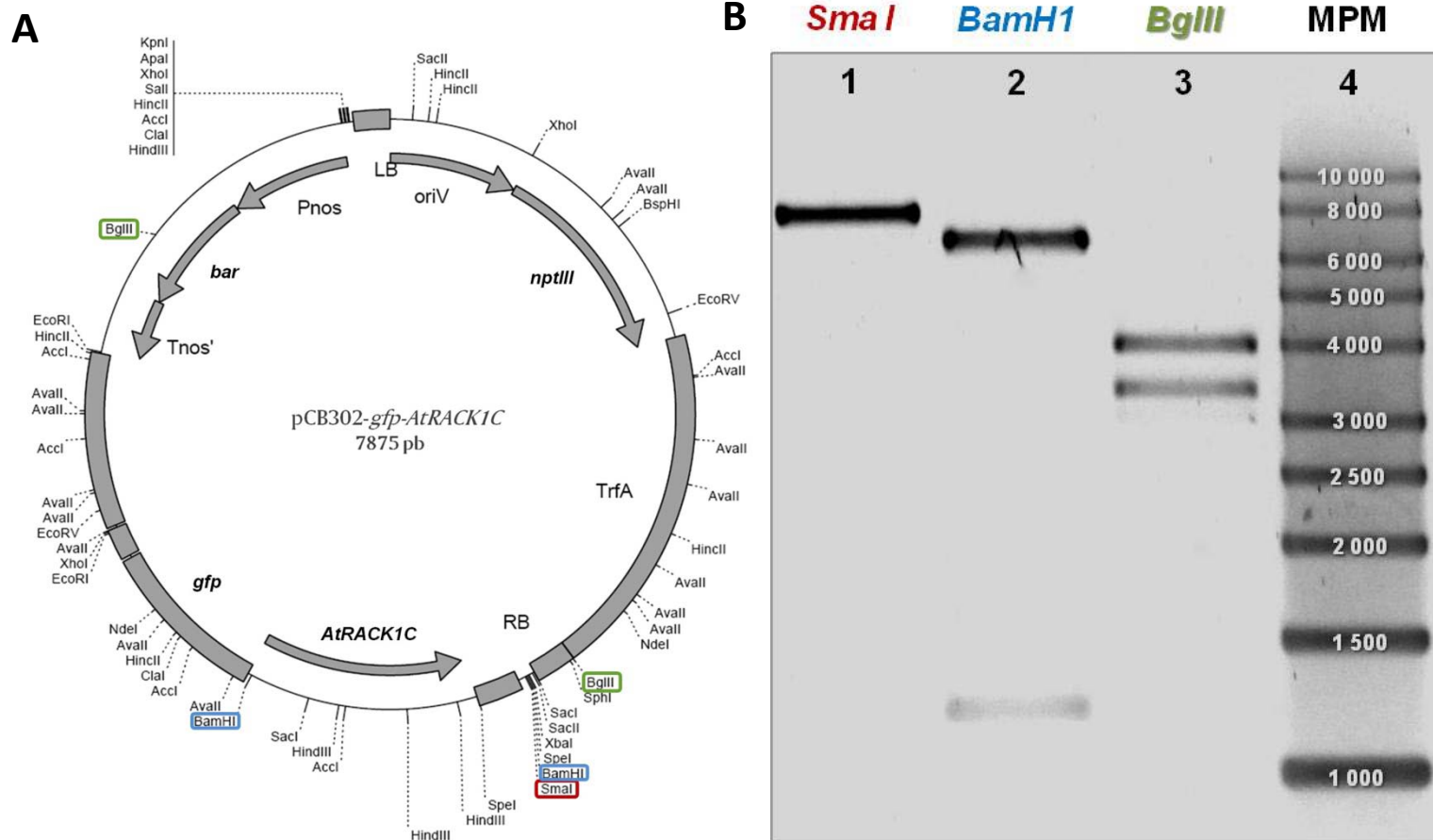


Figura 6. Análisis del plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* con enzimas de restricción. **A.** Mapa de restricción del plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* mostrando los sitios de corte para: *SmaI* (rojo), *BamHI* (azul) y *BglII* (verde). **B** Corte del plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* con las enzimas de restricción *SmaI*, *BamHI* y *BglII*. El corte con *SmaI* generó una sola banda que corresponde al tamaño del plásmido de 7875 pb (carril 1). La incubación del plásmido con *BamHI* generó dos fragmentos de aproximadamente 6600 y 1200 pb (carril 2), mientras que la digestión con *BglII* produjo 2 fragmentos de alrededor de 4200 pb y 3600 pb (carril 3). El carril 4 muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

b. Digestión de pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2* con *SmaI*, *BamHI* y *BglIII*

El corte de pCB302-*gfp-MBD* con *SmaI*, resultó en la obtención de un producto de ≈ 8000 pb (Fig. 7, carril 1). Debido a que éste plásmido presenta solo un sitio de restricción para esta enzima, la generación de una banda detectada es congruente y corresponde al tamaño total de la construcción (8267 pb, Fig. 4). Por otra parte, la digestión de pCB302-*gfp-FABD2* con *SmaI*, generó un producto de poco menos de 8000 pb (Fig. 7, carril 5). Este producto coincidió con el tamaño esperado de 7895 pb, ya que pCB302-*gfp-FABD2* posee solo un sitio de restricción para esta enzima (Fig. 5).

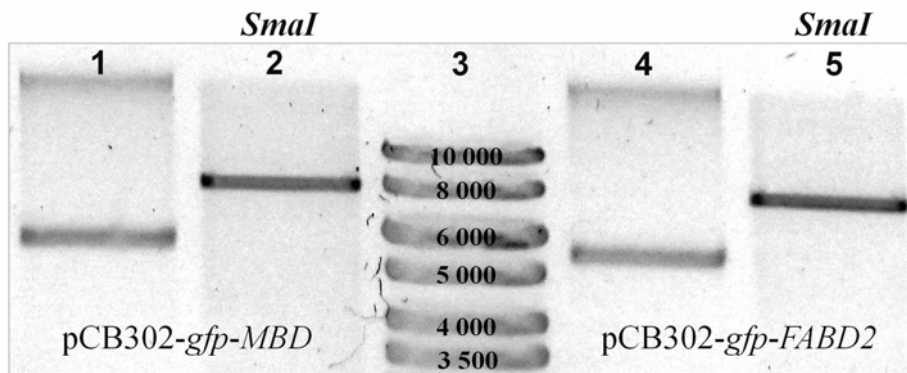


Figura 7. Digestión de los plásmidos pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2* con la enzima de restricción *SmaI*. Los productos del corte se analizaron en un gel de 1% agarosa, posteriormente teñido con SYBR Green I. La imagen muestra los plásmidos pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2* antes (carriles 1 y 4, respectivamente) y después (carriles 2 y 5, respectivamente) de la digestión con *SmaI*. En ambos se generó un producto que correspondió al tamaño de cada uno de ellos: pCB302-*gfp-MBD* **8267** pb (carril 2); y pCB302-*gfp-FABD2* **7985** pb (carril 5). El carril 3 muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

La digestión con *Bam*HI y *Bgl*II de los plásmidos pCB302-*gfp*-MBD y pCB302-*gfp*-FABD2 mostró que la cantidad de productos generados y su tamaño correspondieron al mapa de restricción de cada construcción (Figs. 4 y 5, respectivamente). Para ambos plásmidos la digestión con *Bam*HI resultó en la generación de dos productos (\approx 1400 pb y \approx 6000 pb; Fig. 8, carril 1 y 4, respectivamente). Por otro lado, el corte del plásmido pCB302-*gfp*-MBD con *Bgl*II generó dos productos de \approx 4000 y \approx 3900 pb; (Fig. 8, carril 2), y en el plásmido pCB302-*gfp*-FABD2 generó tres productos de \approx 1000 pb, 2500 pb y 4000 pb (Fig. 8, carril 5).

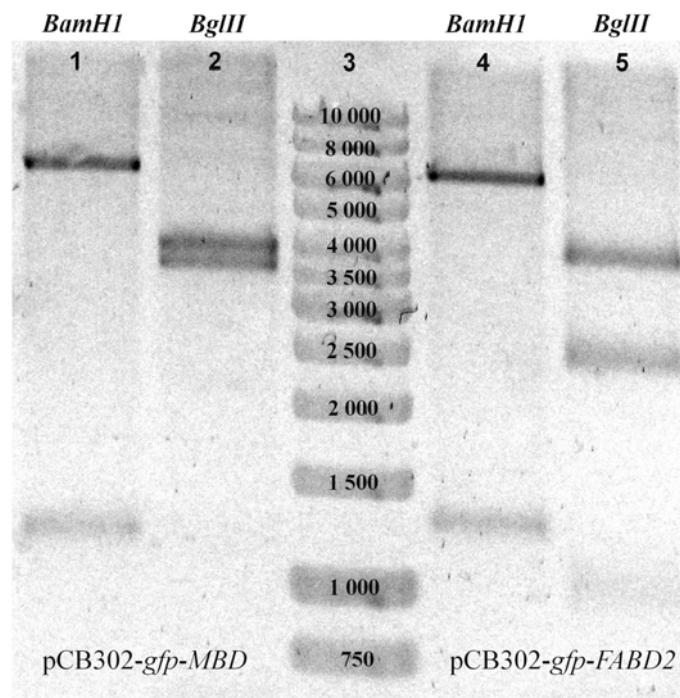


Figura 8. Digestión de los plásmidos pCB302-*gfp*-MBD y pCB302-*gfp*-FABD2 con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Bgl*II. Los productos del corte fueron analizados en un gel de 1% agarosa y posteriormente teñido con SYBR Green I. La digestión con *Bam*HI generó dos productos de \approx 1400 pb y 6400 pb en ambas construcciones (carriles 1 y 4, respectivamente). Por otra parte, la digestión de pCB302-*gfp*-MBD con *Bgl*II generó dos productos de \approx 4000 pb y 3900 pb (carril 2), mientras que en pCB302-*gfp*-FABD2 generó tres productos de \approx 1000 pb, 2500 pb y

4000 pb (carril 5). Todos los productos generados en las digestiones correspondieron al tamaño esperado de acuerdo al mapa de restricción de los plásmidos. El carril 3 muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

B. Análisis de los plásmidos pCB302-*gfp-AtRACK1C*, pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2* mediante la técnica de PCR

Adicionalmente al corte con enzimas de restricción, los plásmidos se analizaron mediante la amplificación por PCR de fragmentos de los genes *AtRACK1C*, *gfp* y *nptII*.

a. Amplificación de una parte de la secuencia codificante de *AtRACK1C*

Utilizando oligos específicos para la secuencia codificante del gen de *AtRACK1C*, (Fig. 9 A), se amplificó una parte de dicha secuencia mediante la técnica de PCR. El uso de diferentes pares de oligos (*AtFw-AtRv1* y *AtFw-AtRv2*) resultó en la amplificación de dos productos de diferente tamaño: 984 pb (Fig. 9 B, carriles 1, 2, 3, 4) y 585 pb (Fig. 9 B, carril 6). Cuando se usaron los oligos *AtFw-AtRv1* los templados utilizados fueron: el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* purificado (Fig. 9 B, carril 1) y digerido con las enzimas de restricción *SmaI* (Fig. 9 B, carril 2), *BamHI* (Fig. 9 B, carril 3) o *BglII* (Fig. 9 B, carril 4). Por otra parte, cuando se usaron los oligos *AtFw-AtRv2* se usó como templado plásmido purificado sin digestión (Fig. 9 B, carril 6). Los productos amplificados correspondieron, en todos los casos, a los tamaños esperados calculados a partir de la secuencia reportada de *AtRACK1C* (Fig. 9 A).

A *Arabidopsis thaliana* RACK1C_AT (RECEPTOR FOR ACTIVATED C KINASE 1C); nucleotide binding (RACK1C_AT) mRNA, complete cds.
 ACCESSION NM_112695 (Gen Bank)

```

1 aatctctcgc tctgttacgc cattttctgt agtaagaaga aaaaaccoga aaacctcaaa AtFw
61 ccatggccga gggactcgta ttgaaggga ttatggcgc ccacacogac attgtcaagg
121 ccctcgttac gccgatcgac aattccgaca tcatcgtcac agcgtcgcgt gacaaaatcca
181 tcatcctctg gaaactcaca aaggaogata agtcttacg tggtgctcag cgttaggctca
241 caggtcactc tcacttctgt gaagatgttg ttctctcacc ggacgggtcag ttgcactct
301 cgggaagctg ggaagggtgag ctccgtctct gggatcttgc caccgggagaa acaactcgtc
361 gattcgttgg tcatcagaaa gatgtctct ctgttgcatt ctctaactgat aacoggcaga
421 tctgtctcgc ttctcgtgat cgtacgatta agctttggaa cacacttggg gagtgttaagt
481 ataccatctc tgaagggtgat ggtcacaagg aatgggttag ttgtgttagg tttagtctca
541 ataactctgt accaactatt gtatctgctt cttgggataa aactgtgaaa gttgggaatc
601 tccagaactg taagctgag aactctcttg ttggtcactc tggttactc acaactgttg AtRv2
661 ctgtctcgc tgatggttcc ctatgcgcca gtgggtggaa agatggtgtt atcttgttct
721 gggatcttgc tgaaggaaag aagcttact cgtttgagc gggttctgatt attcaactcc
781 tttgcttcag tctaacaga tactgttct gtgctgctac tgagaatagc attaggattt
841 gggatcttga gagcaagtct gttgttgagg acttgaaggt tgatctcaag ttgaggcag
901 agaagaatga aggtggtggt ggaactggta accagaagaa gggttatctac tgcacaagct
961 tgaactggag tgcagatgga agcaattgt tcaagtgtta cactgatgga gttgtcaggg
1021 tctgggtat tggtcgttac tagagacaca acaagatgaa gaagaagtc cyaatctcc AtRv1
1081 ggaaaaaagt ttagctgctt ttaattttc cagactgct cagtattgta ttagctctc
1141 gcaaacctct attttggcaa tttttgtta atttccagaa gagaaaaaaa caatccattg
1201 attatcatat cactatatat caaaaggta cgaatttctg tacactta

```

AtFw-AtRv1: 984 pb.

AtFw-AtRv2: 575 pb.

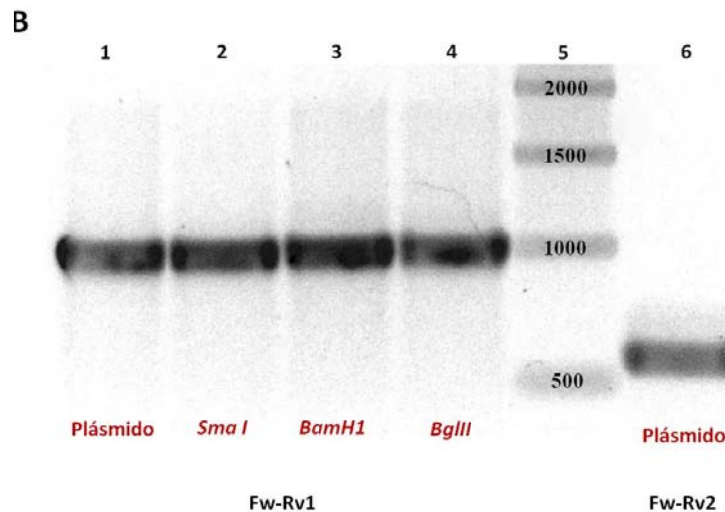


Figura 9. Amplificación de un fragmento de la secuencia codificante de *AtRACK1C* presente en el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*. A. Secuencia codificante del gen de *RACK1C* de *Arabidopsis thaliana* donde se muestran en rojo las secuencias de nucleótidos utilizadas para diseñar los oligos “AtFw, AtRv1 y AtRv2” y los tamaños esperados de los productos de amplificación (984 pb con AtFw y AtRv1; 575 pb con AtFw y AtRv2). **B.** Amplificación de una parte de la secuencia de *AtRACK1C* usando los oligos AtFw-AtRv1 y utilizando como templado: el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* (carril 1), digerido con *SmaI* (carril 2), *BamHI* (carril 3) y *BglII*

(carril 4), respectivamente. Además, el producto del plásmido sin digerir utilizando los oligos AtFw-AtRv2 (carril 6). Los tamaños esperados de los productos de la amplificación son de **984** pb cuando se usa AtFw y AtRv1 (carriles 1-4); y de **575** pb cuando se usan AtFw y AtRv2 (carril 6). El carril 5 muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

b. Amplificación de un fragmento de la secuencia codificante de *gfp*

Usando los oligos específicos para amplificar una parte de la secuencia codificante del gen de la *gfp* (Fig. 10 A), se logró amplificar un producto de ≈ 700 pb usando como templado el plásmido pCB302-*gfp-MBD* (Fig. 10 B, carril 1) o el plásmido pCB302-*gfp-FABD2* (Fig. 10 B, carril 3). Los productos amplificados correspondieron al tamaño esperado de 717 pb (Fig. 10 A).

A

Aequorea victoria green-fluorescent protein mRNA, complete cds

GenBank: M62653.1

>gi|155660|gb|M62653.1|AEVGFPA *Aequorea victoria* green-fluorescent protein mRNA, complete cds

TACACACGAATAAAAGATAACAAAAGATGAGTAAAGGAGAAGA ACTTTTCACTGGAGITGTCCCAATCTTG gfpFw
 TTGAATTAGATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATAC
 GGAAAACCTACCCCTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCATGGCCAACTTGTCACTACTT
 TCTCTTATGGTGTCAATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAACAGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCAT
 GCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGA ACTATATTTTCAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAG
 TCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTAAAGAAGATGGAAAC
 ATTCCTGGACACAAATTGGAATACA ACTATAA CTACACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAAT
 GGAATCAAAGTTAACTTCAAATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACATTATCA
 ACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATACCTGTCCACACAATCTGCCCTT
gfpRw TCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACA
TGGCATGGATGAACTATACAATAAAATGTCAGACTTCCAATTGACACTAAAGTGTCGGAACAATTAATAA
 AATCTCAGGGTTCTGGTTAAATTCAGGCTGAGATATTATTTATATATTTATAGATTCATTAATAATTTGATGA
 ATAATTTATTGATGTTATTGATAGAGGTTATTTCTATTAAACAGGCTACTTGGAGTGATTCTTAATTCTAT
 ATTAATTACAATTTGATTGACTTGCTCAA

gfpFw-gfpRv: 717 pb.

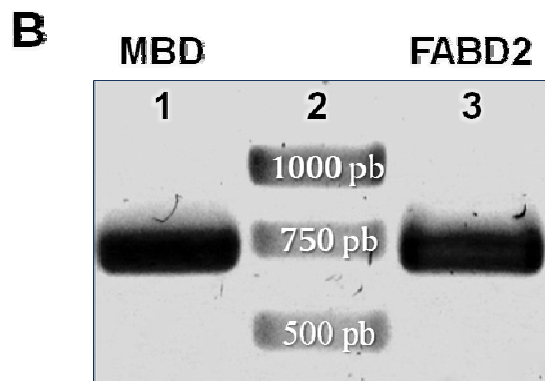


Figura 10. Amplificación de productos parciales de la secuencia codificante del gen *gfp* de los plásmidos pCB302-*gfp*-MBD y pCB302-*gfp*-FABD2. **A:** Secuencia codificante de la *gfp* proveniente de *Aequorea victoria* (GenBank M62653.1), con las secuencias de nucleótidos utilizadas como oligos en color rojo. **B:** Amplificación de un fragmento de la secuencia codificante del gen de la *gfp* usando como templado el plásmido pCB302-*gfp*-MBD (carril 1) o pCB302-*gfp*-FABD2 (carril 3). El producto esperado es de 717 pb (carriles 1 y 3). El carril 2 muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

Adicionalmente, se realizó la amplificación de una parte de la secuencia codificante del gen *nptII* presente en los plásmidos pCB302-*gfp*-MBD y pCB302-*gfp*-FABD2 (Fig. 11). Utilizando oligos específicos para la secuencia de este gen (Fig. 11 A), se amplificó un producto de \approx 600 pb usando las construcciones pCB302-*gfp*-MBD (Fig. 11 B, carril 1) o pCB302-*gfp*-FABD2 (Fig. 11 B, carril 3) como templado. El tamaño del producto de la amplificación correspondió al tamaño esperado (582 pb, Fig. 11 A).

A**Plant transformation vector pCB301 plasmid pXT1, complete sequence**

GenBank: JN029690.1

gi|334847649|gb|JN029690.1| Plant transformation vector pCB301 plasmid pXT1, complete sequence

CCTTATTCCTGATTTGACCCGCTGGTGCCCTTGGTGTCAGATAATCCACCTTATCGGCAATGAAGTCGGTCC
 CGTAGACCGTCTGGCCGTCCTTCTCGTACTTGGTATCCGAATCTTGCCCTGCACGAATACCAGCGACCCCTT
 GCCCAAATACTTGCCGTGGGCTCGGCCTGAGAGCCAAAACACTTGATGCGGAAGAAGTCGGTGCCTCCT
 GCTTGTGCGCCGGCCTGTTGCGCCACATCTAGGTAATAAACAATTCATCCAGTAAAATATAATATTTATTT
 TCTCCAATCAGGCTTGATCCCAGTAAGTCAAAAAATAGCTCGACATACTGTTCTCCCGATATCCTCCCT
 GATCGA**CCGGACGCGAGAAGGCAATGT**CATACCACCTTGCCGCCCTGCCGTTCTCCAAGATCAATAAAGC
 CACTTACTTTGCCATCTTTCACAAAGATGTTGCTGTCTCCAGGTCGCCGTGGGAAAAGACAAGTTCCTCTTC
 GGGCTTTTCCGCTTTAAAAAATCATACAGCTCGCGCGGATCTTAAATGGAGTGTCTTCTCCAGTTTTCG
 CAATCCACATCGGCCAGATCGTTATTCAGTAAGTAATCCAATTCGGCTAAGCGGCTGTCTAAGCTATTCTGA
 TAGGGACAATCCGATATGTCGATGGAGTGAAAGAGCCTGATGCACTCCGCATACAGCTCGATAATCTTTTC
 AGGGCTTTGTTTCATCTTACTCTCCGAGCAAAGGACGCCATCGGCCTCACTCATGAGCAGATTGCTCCA
 GCCATCATGCCGTTCAAAGTGCAGGACCTTGGAACAGGCAGCTTTCCTCCAGCCATAGCATCATGTCTT
 TTCCCGTTCCACATCATAGGTGGTCCCTTATACCGGCTGCCGTCAATTTTAAATATAG**GTTTTCATTTTCTC**
CCACCAGCTTATATACCTTAGCAGGAGACATTCTCCGTATCTTTACGCAGCGGTATTTTTCGATCAGTTT
 TTTCAATTCGGTGATATTCTCATTTTAGCCATTTATTTTCTTCTCTTCTACAGTATTTAAAGATACCC
 CAAGAAGCTAATTATAACAAGACGAACTCCAATTCAGTTCCTTGCATTCTAAAACTTAAATACCAGAAA
 ACAGCTTTTTCAAAGTTGTTTTCAAAGTTGGCGTATAACATAGTATCGACGGAGCCGATTTTGAAACCACAA
 TTATGGGTGATGCTGCCAACTCGAGAGCGGGCCGGAGGGTTCGAGAAGGGGGGCAACCCCTTCGGC
 GTGCGCGGTACGCGCACAGGGCGCAGCCCTGGTTAAAAACAAGGTTTATAAATATTGGTTAAAAGCAG

kanFw

kanRv

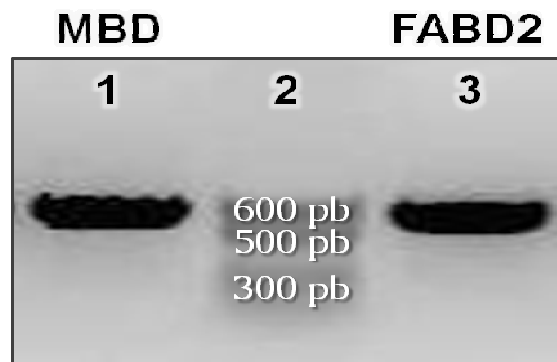
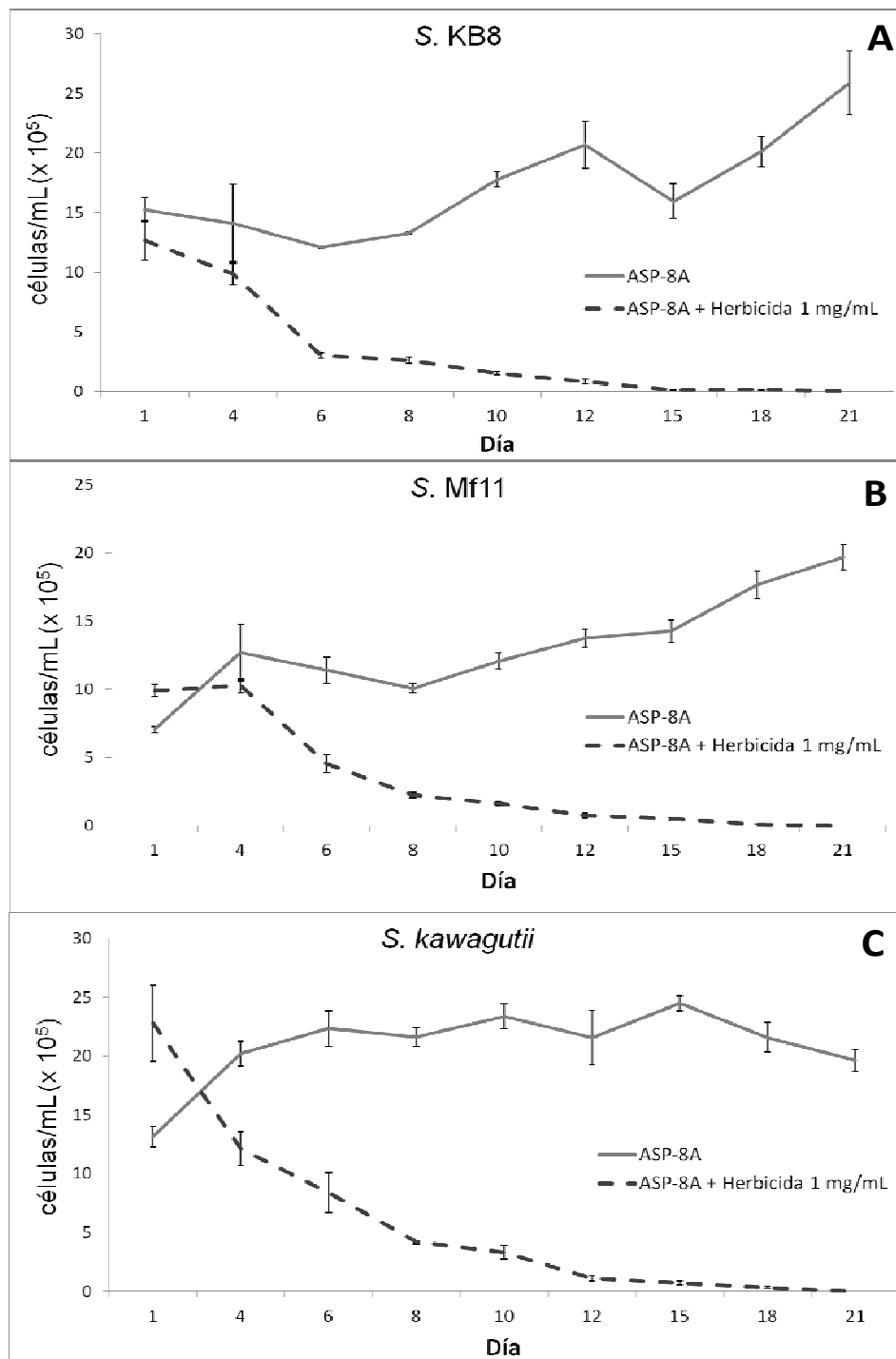
kanFw-kanRv: 582 pb.**B**

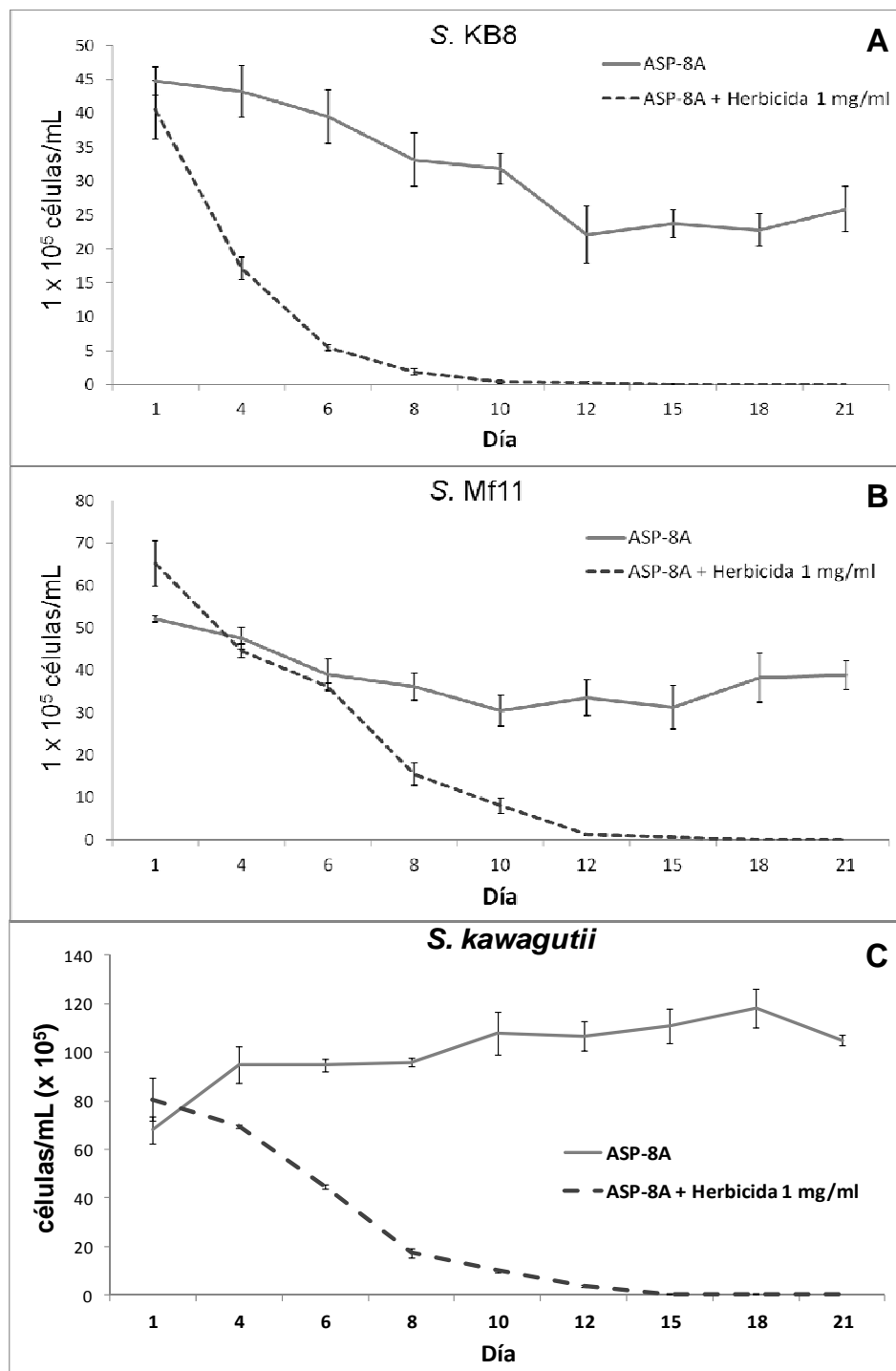
Figura 11. Amplificación de productos parciales del gen *nptIII* con los plásmidos pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2*. A: Parte de la secuencia del plásmido pCB301 que contiene la secuencia codificante del gen *nptIII* [Xiang *et al.* 1999]; las secuencias utilizadas como oligos (kanFw y kanRv) se muestran en color rojo. **B:** Amplificación de un fragmento de la secuencia del gen *nptIII* usando el plásmido pCB302-*gfp-MBD* (carril 1) o pCB302-*gfp-FABD2* (carril 3) como templado. El producto esperado es de **582 pb** (carriles 1 y 3, respectivamente). El carril 2 muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

C. Cultivos de *Symbiodinium* spp. en presencia de herbicida que contiene glufosinato de amonio (Finale®)

En presencia de 1 mg/mL del herbicida Finale®, tanto en cultivos subsaturados como saturados, el número de células de *S. kawagutii*, *S. Mf11* y *S. KB8* se redujo significativamente durante la primera semana de incubación. Para la segunda semana, prácticamente todas las células habían muerto y a los 21 días de incubación no se detectó ninguna célula por microscopía (gráficas 1 y 2 líneas discontinuas). En contraste, aquellos cultivos en ausencia del herbicida mostraron un patrón diferente: los cultivos subsaturados de *S. kawagutii*, *S. Mf11*, *S. KB8* y los cultivos saturados de *S. kawagutii* incrementaron el número de células (gráficas 1A, 1B, 1C y 2C); mientras que los cultivos saturados de *S. KB8* y *S. Mf11*, tuvieron una ligera disminución del número de células en la primera semana de incubación; sin embargo, para la segunda semana el número de células se mantuvo constante (gráfica 2A y 2B).



Gráfica 1. Cultivos no saturados de *Symbiodinium* spp. en presencia y ausencia de un herbicida que contiene glufosinato de amonio. A. Cultivo no saturado de células de *S. KB8*; **B.** Cultivo no saturado de células de *S. Mf11*. **C.** Cultivo no saturado de células de *S. kawagutii*. Línea continua: células en medio ASP-8A; línea discontinua: células en medio ASP-8A con 1 mg/mL de glufosinato de amonio (Finale®). El conteo de células se realizó cada 2-3 días mediante un hemocitómetro durante 21 días. Los experimentos se llevaron a cabo en cultivos por triplicado. Los datos se presentan como la media +/- desviación estándar.



Gráfica 2. Cultivos saturados de *Symbiodinium* spp. en presencia y ausencia de un herbicida que contiene glufosinato de amonio. A. Cultivo saturado de células de *S. KB8*; **B.** Cultivo saturado de células de *S. Mf11*. **C.** Cultivo de células de *S. kawagutii*. Línea continua: células en medio ASP-8A; línea discontinua: células en medio ASP-8A con 1 mg/mL de glufosinato de amonio (Finale®). El conteo de células se realizó cada 2-3 días mediante un hemocitómetro durante 21 días. Los experimentos se llevaron a cabo en cultivos por triplicado. Los datos se presentan como la media +/- desviación estándar.

D. Transformación de *Symbiodinium* spp. con el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*

Las células de *Symbiodinium* spp., transformadas con el plásmido purificado (pCB302-*gfp-AtRACK1C*) fueron monitoreadas en el microscopio de fluorescencia para detectar la emisión de fluorescencia verde. La presencia de células verdes fluorescentes fue detectada a los 8 (*S. kawagutii*), 25 (*S. KB8*) y 26 (*S. Mf11*) días posteriores a la transformación (Fig. 12 B, D y F, respectivamente). La emisión de ésta fluorescencia en las células sugiere que la transformación con éste método fue exitosa en los tres clados de *Symbiodinium* spp.

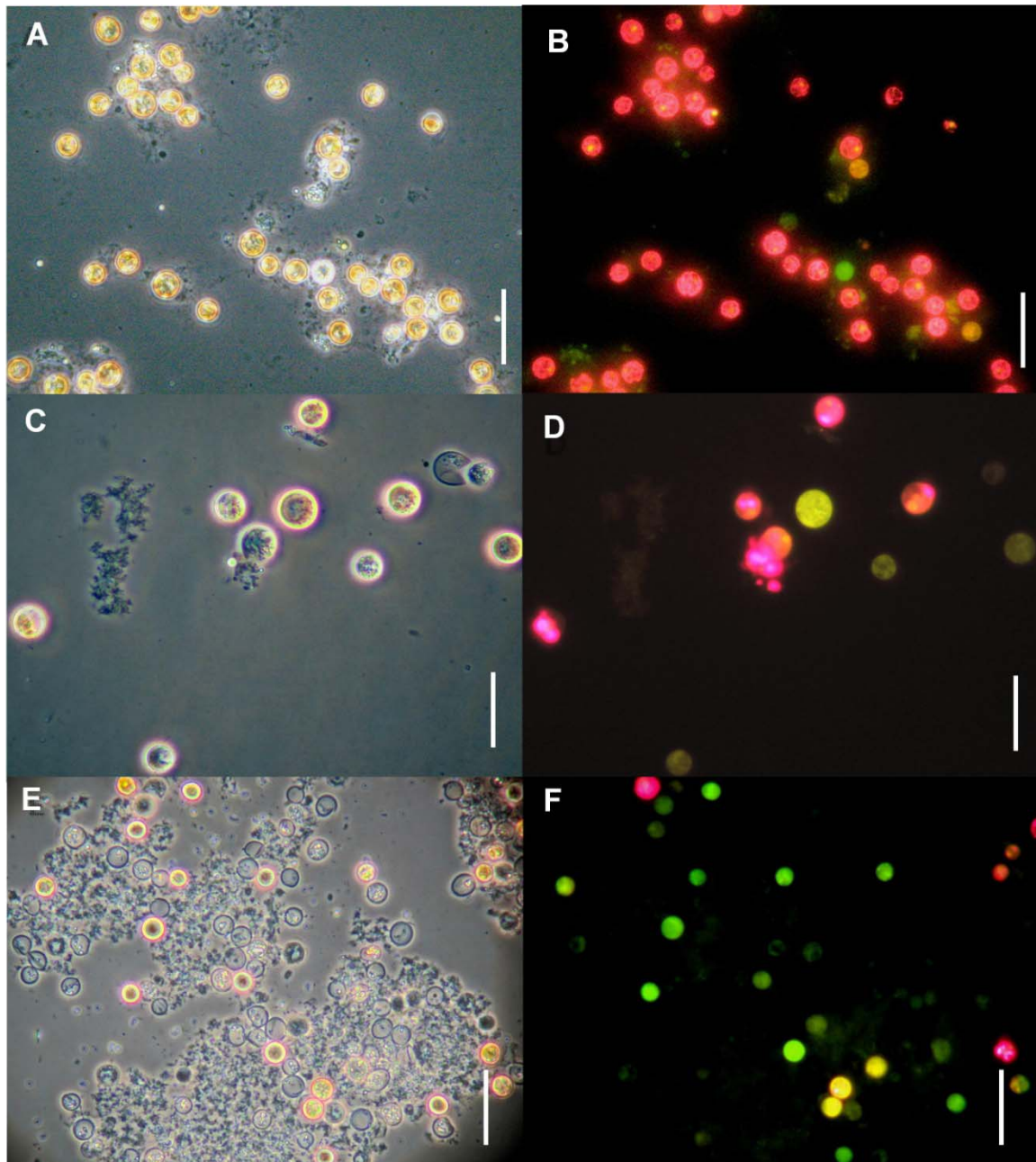


Figura 12. Transformación de *Symbiodinium* spp. con el plásmido purificado pCB302-gfp-AtRACK1C. A y B: Células de *S. kawagutii* después de 8 d de la transformación, **C y D:** células de *S. KB8* después de 25 d de la transformación; **E y F:** células de *S. Mf11* después de 26 d de la transformación. Imágenes por contraste de fases (A, C, E) y fluorescencia (B, D, F). Las barras corresponden a: 30 μm en A y B, 20 μm en C y D y 25 μm en E y F.

E. Transformación de *Symbiodinium* spp. con pCB302-gfp-AtRACK1C mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

La transformación exitosa de diferentes organismos mediada por *A. tumefaciens* ha sido documentada en los últimos años. Este método ha demostrado ser uno de los más eficientes para transformar plantas [Birch, 1997] y otros organismos incluyendo microalgas como *C. reinhardtii* [Kumara *et al.* 2004]. Debido a esto, fue de gran interés conocer si *A. tumefaciens* podría transformar de manera más eficiente, comparado con el plásmido purificado, a la células de *Symbiodinium* spp. Para determinar si *A. tumefaciens* era capaz de transformar células de *Symbiodinium* spp., se siguió el método de transformación con perlas de vidrio y PEG, y en lugar de utilizar el plásmido purificado se co-incubó con *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCB302-gfp-AtRACK1C. Este método de transformación se aplicó a *S. KB8*, *S. Mf11*, y *S. kawagutii* (ver a continuación).

a. Transformación de *Symbiodinium* KB8 con pCB302-gfp-AtRACK1C mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

En las observaciones bajo el microscopio de las células de *S. KB8* transformadas mediante *A. tumefaciens* se detectó la presencia de células verdes fluorescentes sugiriendo la presencia de la GFP en estas células. De igual manera se pudo apreciar una selección adecuada de las células transformadas con el herbicida, observándose cada vez más células verde fluorescentes conforme avanzaba el

tiempo de incubación en el medio de selección (2, 5 y 15 d; Fig. 13 B, D y E, respectivamente).

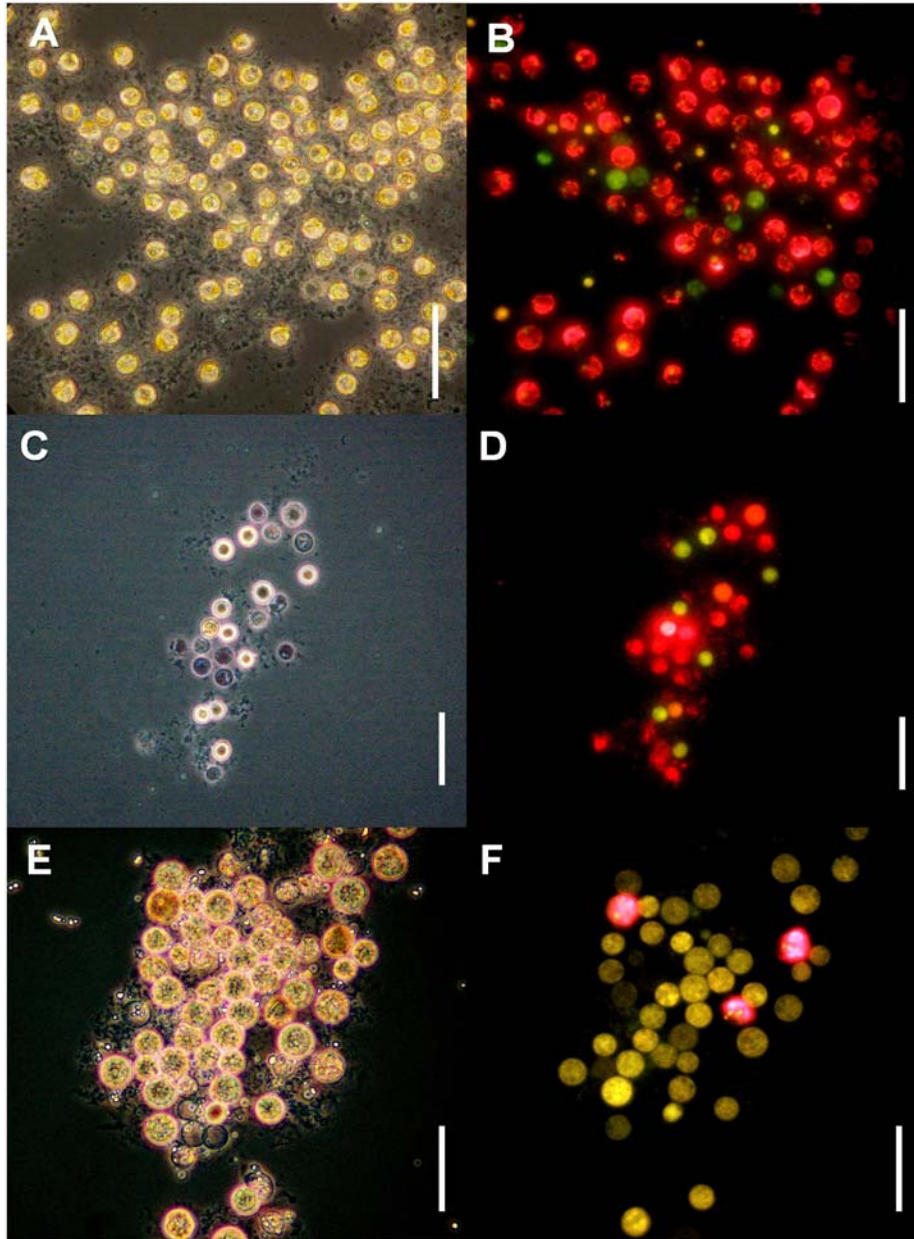


Figura 13. Células de *S. KB8* transformadas mediante *A. tumefaciens* que contenía la construcción pCB302-*gfp-AtRACK1C*. Células de *S. KB8* después de 2 d (A y B); 5 d (C y D) y 15 d (E y F) en medio de selección. Las imágenes fueron tomadas en contraste de fases (A, C, D) y bajo fluorescencia (B, D, F). Las barras de tamaño corresponden a 40 μm (A y B), 30 μm (C y D) y 20 μm (D y E).

b. Transformación de *Symbiodinium* Mf11 con pCB302-gfp-AtRACK1C mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

En los cultivos de *S. Mf11* incubados con *A. tumefaciens* se observaron células verdes fluorescentes a los 7, 11 y 14 días después de la transformación (Fig. 14 B, D y F, respectivamente).

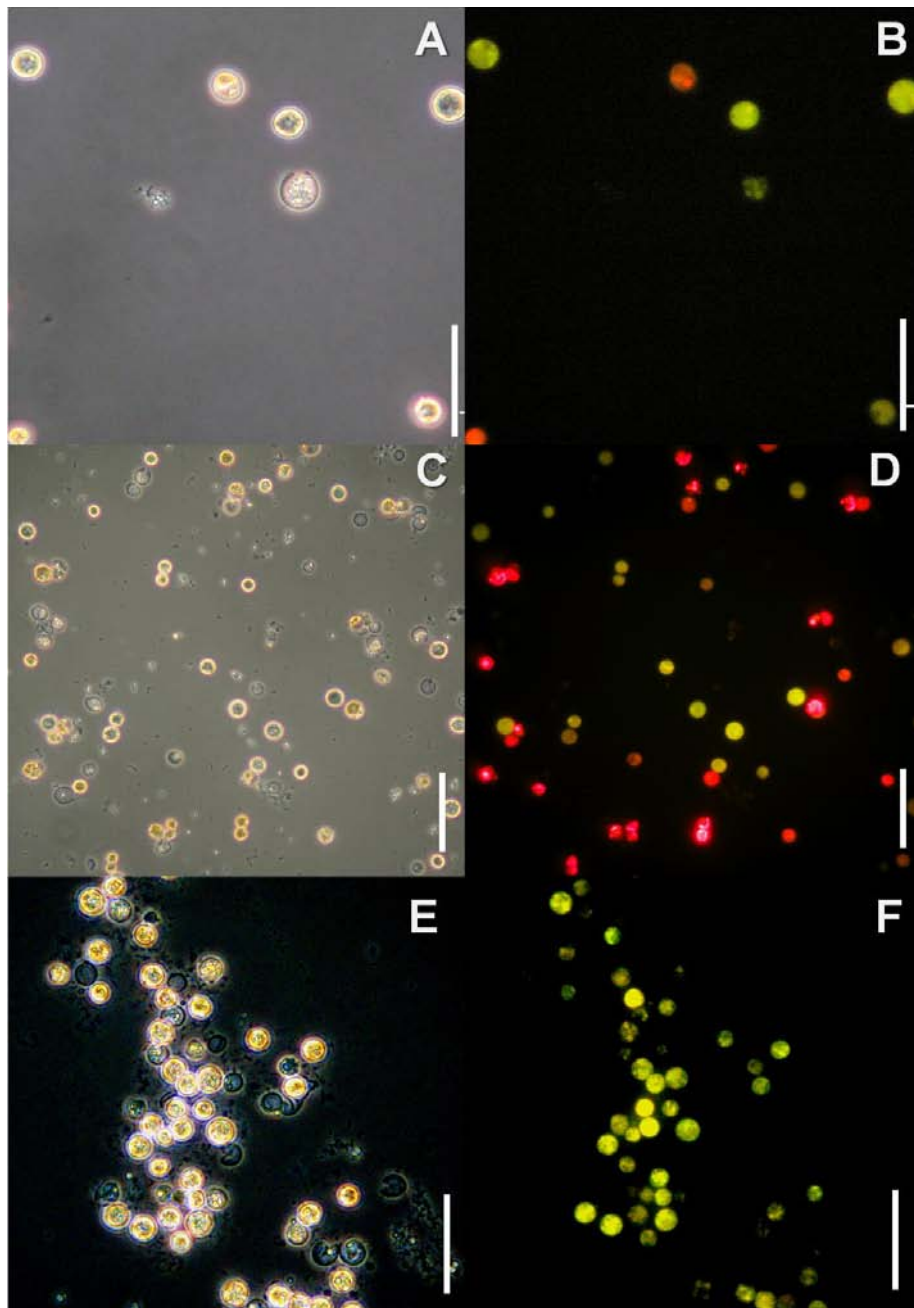


Figura 14. Células de *S. Mf11* transformadas mediante *A. tumefaciens* que contenía la construcción pCB302-gfp-AtRACK1C. Células de *S. Mf11* después de 7 d (A y B); 11 d (C y D) y 14 d (E y F) en medio de selección. Las imágenes fueron tomadas en contraste de fases (A, C, D) y bajo fluorescencia (B, D, F). Las barras de tamaño corresponden a 20 μm (A, B, E, F) y 40 μm (C y D).

c. Transformación de *Symbiodinium kawagutii* con pCB302-gfp-AtRACK1C mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Posterior a la transformación con *A. tumefaciens* se pudieron observar células de *S. kawagutii* que emitían fluorescencia verde (Fig. 15 B). En los días siguientes el número de células con fluorescencia verde se incrementó (Fig. 15 D), y para el día 26 la mayoría de las células observadas en el microscopio presentaban dicha fluorescencia (Fig. 15 F). En comparación con *S. KB8* y *S. Mf11*, las células de *S. kawagutii* tuvieron una eficiencia de transformación relativa mayor (Tabla 1).

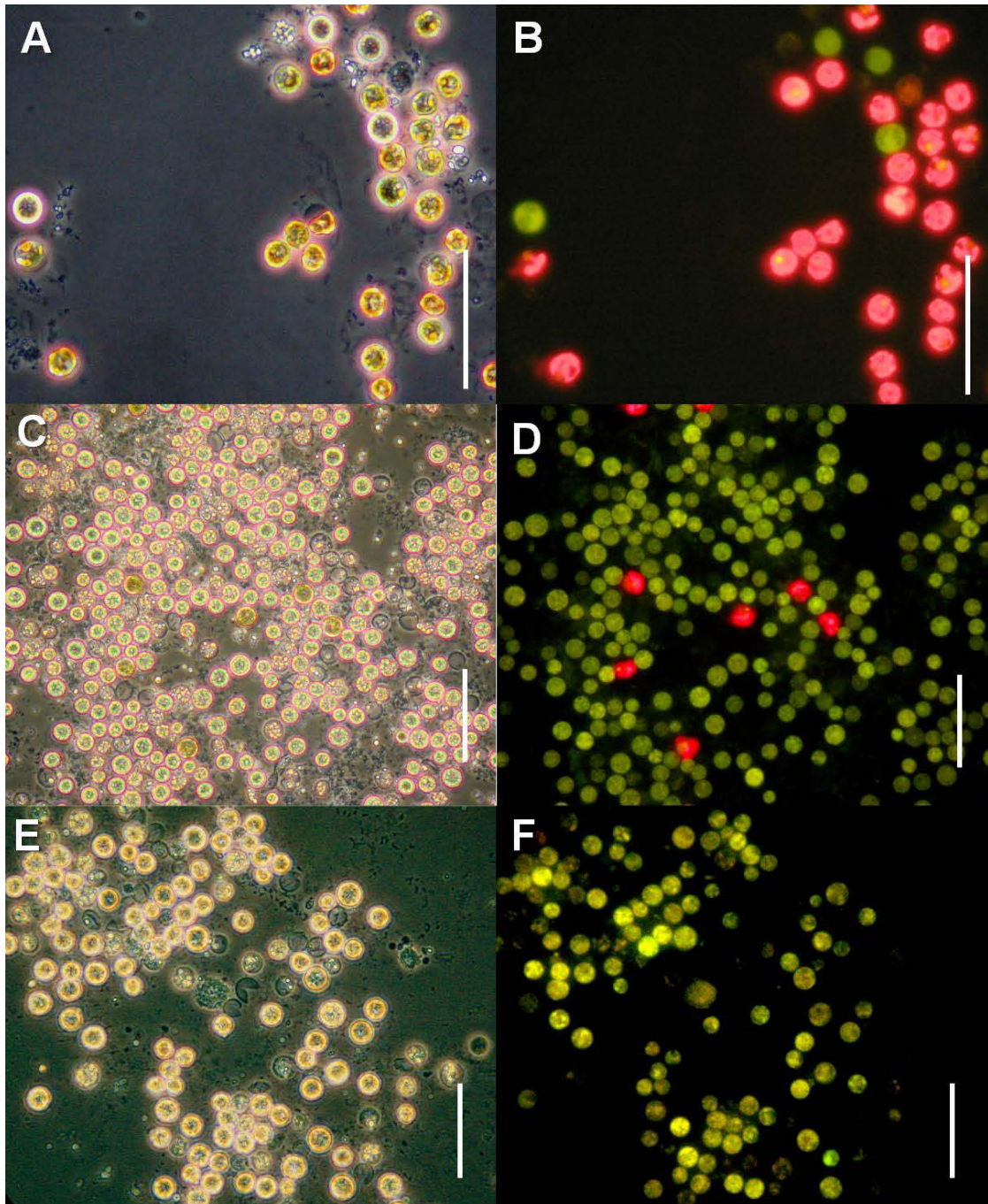


Figura 15. Células de *S. kawagutii* transformadas mediante *A. tumefaciens* que contenía la construcción pCB302-*gfp-AtRACK1C*. Células de *S. kawagutii* después de: 7 d (A y B); 11 d (C y D) y 26 d (E y F) en medio de selección. Las imágenes fueron tomadas en contraste de fases (A, C, D) y bajo fluorescencia (B, D, F). Las barras de tamaño corresponden a 40 μ m.

En las imágenes obtenidas bajo fluorescencia se observaron células aparentemente transformadas de *S. KB8*, *S. Mf11* y *S. kawagutii*, lo cual sugiere que *A. tumefaciens*, que contenía el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*, fue capaz de transformar a estos organismos en cultivo. Las transformaciones de los diferentes cultivos de *Symbiodinium* spp. mostraron algunas diferencias en la tasa de transformación (Tabla 1), siendo ésta mayor en *S. kawagutii* y menor en *S. Mf11*. Además, se observó que las células de *S. KB8* son más sensibles a los tratamientos utilizados para la transformación.

<i>Cepa de Symbiodinium</i>	TT plásmido	TT <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>S. KB8</i>	74 ± 8*	603 ± 8*
<i>S. Mf11</i>	65 ± 5*	448 ± 3*
<i>S. kawagutii</i>	107 ± 7*	812 ± 7*

* Tasa de Transformación (TT) por 10⁶ células; los datos se presentan como la media +/- error estándar).

Tabla 1. Comparación de la tasa de transformación de diferentes cultivos de *Symbiodinium* spp. usando plásmido purificado o co-incubación con *A. tumefaciens*.

F. Transformación de *Symbiodinium* spp. con otros vectores que contienen GFP

Para asegurar que este método de transformación mediado por *A. tumefaciens* es reproducible y confiable, se realizaron transformaciones de células en cultivo de *Symbiodinium* spp. con dos nuevas construcciones que contenían GFP como gen reportero. Los plásmidos pCB302-*gfp-MBD* (en *Agrobacterium*) con la secuencia que codifica para un dominio de unión a microtúbulos (MBD) y pCB302-*gfp-FABD2* (en *Agrobacterium*), que contiene un gen que codifica para el dominio 2 de unión a actina de la fimbrina (FABD2).

Las células de los cultivos de *Symbiodinium* spp. fueron observadas en el microscopio a los 20 d posteriores a la transformación con la construcción pCB302-*gfp-MBD* (Fig. 16). Tanto en las células de *S. Mf11* (Fig. 16 A y B), como en las de *S. kawagutii* (Fig. 16 C y D) se pudieron observar células con fluorescencia verde (Fig. 16 B y D, respectivamente). De igual manera, en las células de *S. Mf11* y *S. kawagutii* transformadas con la construcción pCB302-*gfp-FABD2* se observó la presencia de células con fluorescencia verde (Fig. 17 B y D, respectivamente). Las imágenes corresponden a los 23 d después de la transformación.

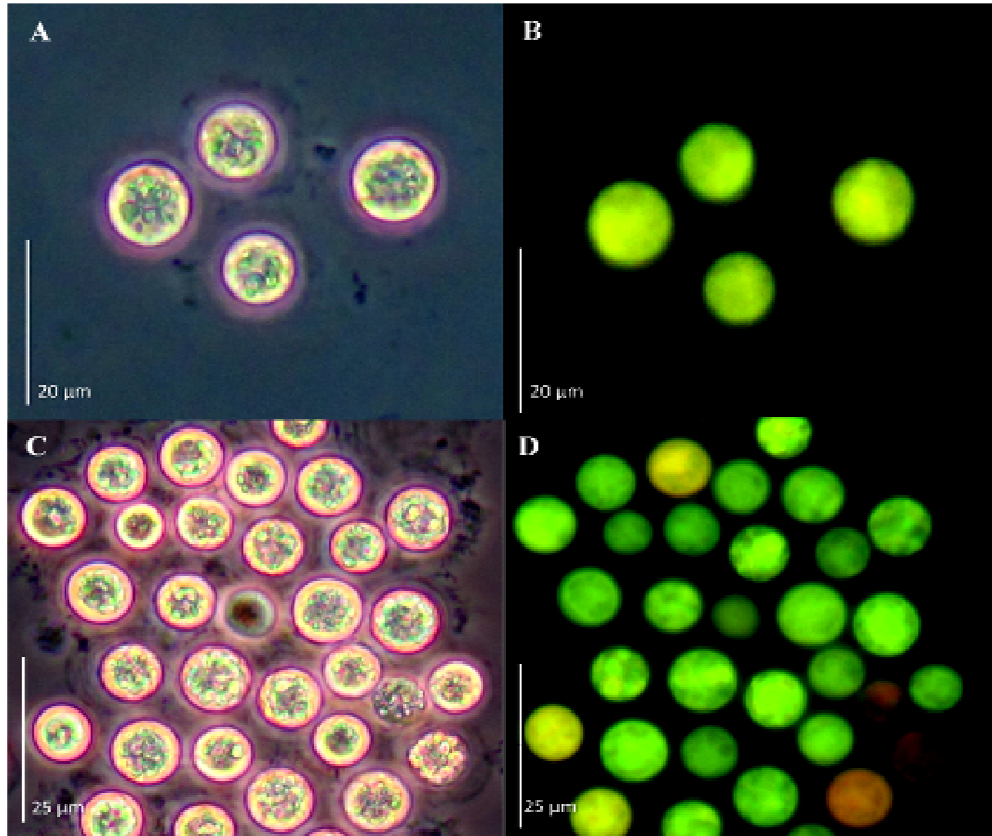


Figura 16. Transformación de *Symbiodinium* spp. mediada por *A. tumefaciens* con pCB302-*gfp-MBD*. Células de *S. Mf11* (A y B) y *S. kawagutii* (C y D) transformadas mediante *A. tumefaciens* que contenía la construcción pCB302-*gfp-MBD*. Imágenes adquiridas después de 20 d en medio de selección y observadas por contraste de fases (A y C) y su correspondiente campo bajo fluorescencia (B y D). Las barras de tamaño corresponden a 20 μm (A y B,) y 25 μm (C y D).

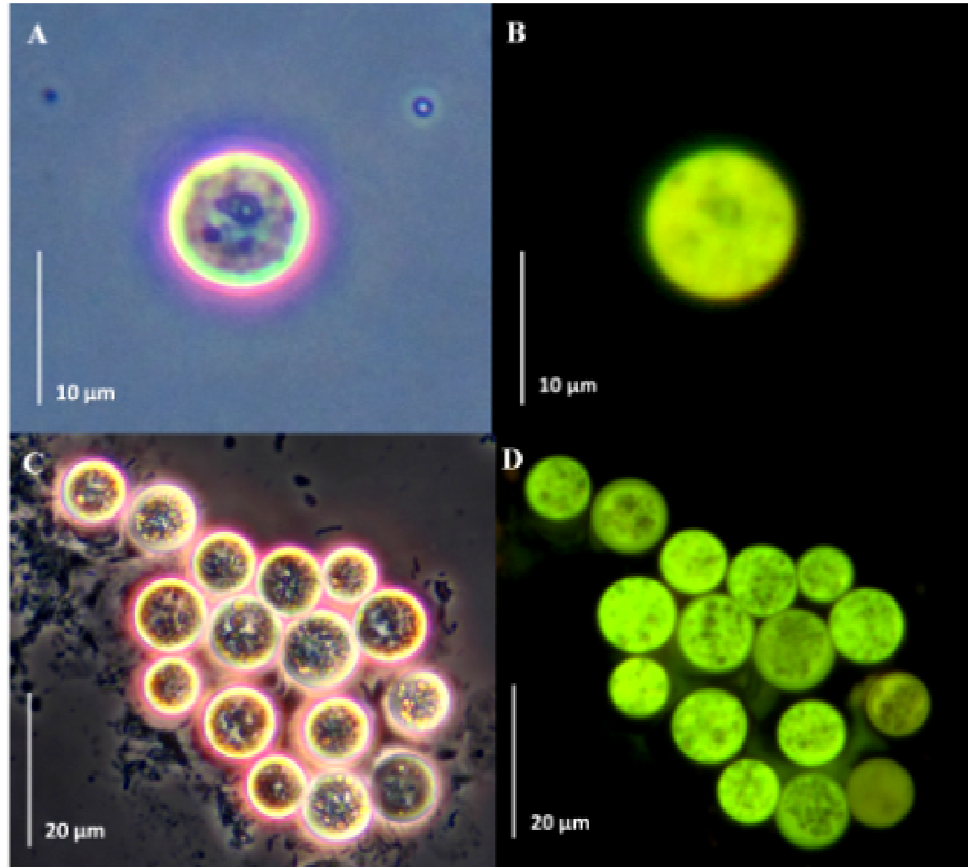


Figura 17. Transformación de *Symbiodinium* spp. mediada por *A. tumefaciens* con pCB302-*gfp-FABD2*. Células de *S. Mf11* (A y B) y *S. kawagutii* (C y D) transformadas mediante *A. tumefaciens* que contenía la construcción pCB302-*gfp-FABD2*. Imágenes adquiridas después de 23 d en medio de selección, observadas por contraste de fases (A y C) y su correspondiente campo bajo fluorescencia (B y D). Las barras de tamaño corresponden a 10 μm (A y B) y 20 μm (C y D).

G. Ensayos para determinar la incorporación de ADN foráneo al genoma de *Symbiodinium* spp.

a. PCR Inverso

El ADN genómico extraído de los cultivos de *S. KB8*, *S. Mf11* y *S. kawagutii*, transformados mediante *A. tumefaciens* con los plásmidos pCB302-*gfp-AtRACK1C*, pCB302-*gfp-MBD* o pCB302-*gfp-FABD2* se usó como templado en las reacciones de amplificación usando distintos pares de oligos. En cada reacción se esperaba amplificar parte de la secuencia del gen *bar* (presente en los plásmidos utilizados para transformar), conjuntamente con la secuencia desconocida contigua a la inserción de éste gen en el ADN de *Symbiodinium* spp. Sin embargo, en ningún caso fue posible amplificar algún producto con las condiciones experimentales empleadas.

b. PCR Genómico

i. Amplificación de una parte de la secuencia codificante de *AtRACK1C* usando ADN genómico de cultivos de *Symbiodinium* spp. transformados mediante *Agrobacterium tumefaciens*

El ADN genómico proveniente de los cultivos de *S. KB8*, *S. Mf11* y *S. kawagutii* transformados con *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C* se utilizó como templado para amplificar fragmentos de la secuencia codificante de *AtRACK1C*. Mediante el uso de los oligos AtFw1- AtRv1, se

amplificaron productos de ≈ 1000 pb, (Fig. 18, carriles 3, 6 y 9); mientras que el uso de los oligos AtFw1- AtRv2 generó productos de ≈ 600 pb (Fig. 18, carriles 4, 7 y 10). En todos los casos el tamaño de los productos correspondió al tamaño esperado de 984 pb para Fw-Rv1 y 575 pb para Fw-Rv2, (Fig. 9 B). Por otra parte, cuando el ADN aislado de células normales de *S. KB8*, *S. Mf11* o *S. kawagutii* fue usado como templado, no hubo ningún producto amplificado (Fig. 18, carriles 2, 5 y 8). Los productos amplificados fueron purificados y enviados a secuenciar. Las secuencias resultantes correspondieron a la secuencia de *AtRACK1C*.

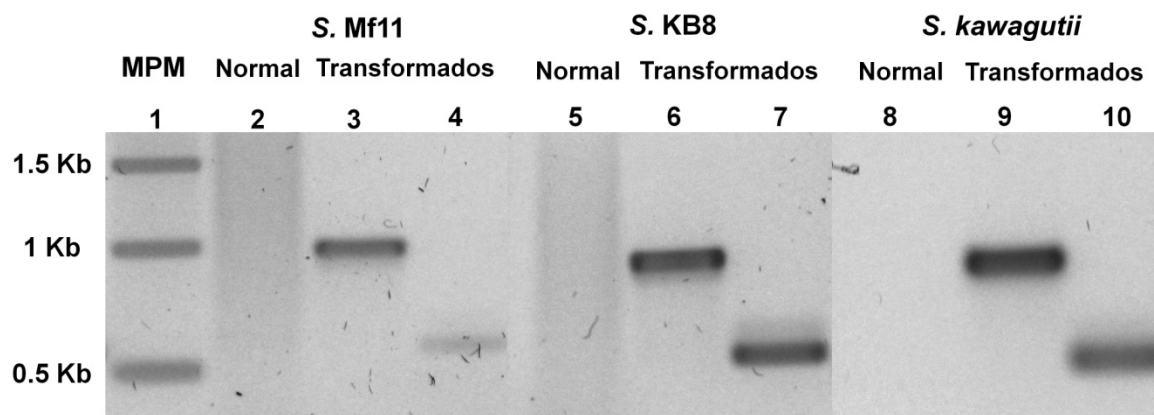


Figura 18. Amplificación de una parte de la secuencia codificante de *AtRACK1C* usando como templado el ADN genómico de cultivos de *Symbiodinium* spp. transformados con *pCB302-gfp-AtRACK1C*. Con el ADN genómico aislado de cultivos de *S. Mf11*, *S. KB8* y *S. kawagutii* transformados con *pCB302-gfp-AtRACK1C* y los oligos AtFw1-AtRv1 o AtFw1-AtRv2, se amplificaron productos de aproximadamente 1000 pb (tamaño esperado 984 pb) para *S. Mf11* (carril 3), *S. KB8* (carril 6), y *S. kawagutii* (carril 9); y otros de alrededor de 600 pb (tamaño esperado 575 pb) para *S. Mf11* (carril 4), *S. KB8* (carril 7), y *S. kawagutii* (carril 10). Cuando se utilizó el ADN genómico de cultivos normales de *S. Mf11*, *S. KB8* o *S. kawagutii* como templados no hubo productos de amplificación (carriles 2, 5 y 8, respectivamente). El primer carril muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

ii. Amplificación de un fragmento de la secuencia codificante del gen de *gfp* usando ADN de cultivos de *Symbiodinium* spp. transformados mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Utilizando como templado el ADN de los cultivos de *Symbiodinium* spp. transformados con las construcciones pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2*, se amplificó una parte de la secuencia codificante del gen de *gfp*. Como se muestra en la figura 19, un producto de ≈ 750 pb fue amplificado usando los oligos *gfp*Fw-*gfp*Rv y el ADN de *S. kawagutii* (carril 1), *S. Mf11* (carril 2) o *S. KB8* (carril 3) transformados con pCB302-*gfp-MBD*. Resultados idénticos se obtuvieron cuando se usó el ADN de cultivos de *S. kawagutii* (carril 4), *S. Mf11* (carril 5) o *S. KB8* (carril 6), transformados con pCB302-*gfp-FABD2*. Todos los productos amplificados correspondieron al tamaño esperado de 717 pb (Fig. 10, carriles 1 al 6). Posteriormente, éstos fueron purificados y enviados a secuenciar. Las secuencias resultantes correspondieron a la secuencia de *gfp*. Como control positivo de amplificación, se utilizó como templado el plásmido purificado pCB302-*gfp-AtRACK1C* (Fig. 19, carril 8).

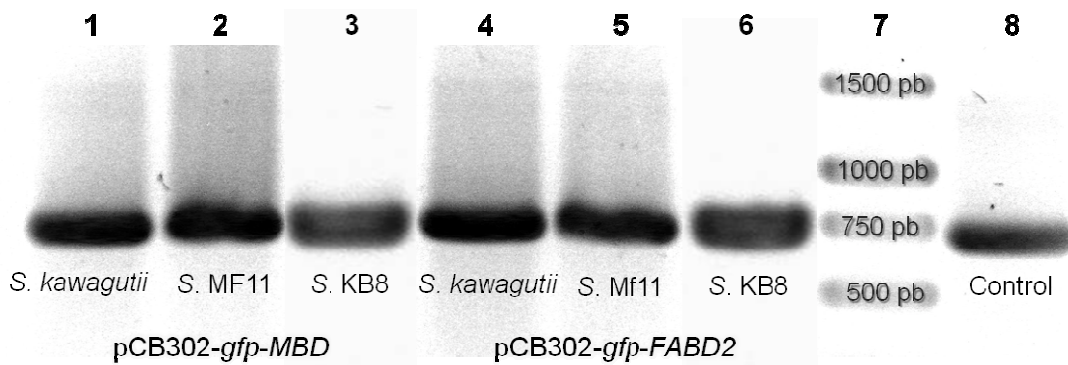


Figura 19. Amplificación de una parte de la secuencia codificante del gen de *gfp* en células de *Symbiodinium* spp. transformadas con pCB302-*gfp-MDB* o con pCB302-*gfp-FABD2*. Utilizando los oligos *gfpFw* y *gfpRv* (Fig. 10 A), se realizó la amplificación de una parte de la secuencia codificante del gen de *gfp* usando como templado el ADN genómico aislado de cultivos de *Symbiodinium* spp. transformados con *A. tumefaciens*. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden a los productos de la amplificación con ADN genómico de células transformadas con pCB302-*gfp-MDB* (*S. kawagutii* carril 1; *S. Mf11* carril 2; *S. KB8* carril 3). Por otra parte, los carriles 4, 5 y 6 corresponden a los productos amplificados de células transformadas con pCB302-*gfp-FABD2* (*S. kawagutii* carril 4; *S. Mf11* carril 5; *S. KB8* carril 6). En todos los casos el producto de amplificación fue de ≈ 750 pb (carriles 1 al 6) para un tamaño esperado de 717 pb (ver Fig. 10). Como control positivo se utilizó como templado el plásmido purificado pCB302-*gfp-AtRACK1C* (carril 8). El carril 7 muestra el marcador estándar de longitud. Las bandas se muestran en negativo.

H. Inmunodetección de la proteína híbrida GFP-AtRACK1C en extractos totales de proteínas de células de *Symbiodinium* spp. transformadas mediante *Agrobacterium tumefaciens*

El anticuerpo anti-GFP reconoció una proteína de ≈ 70 kDa en los extractos de proteínas de las células de *S. Mf11* transformadas mediante *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*. Este peso molecular corresponde al tamaño esperado de la fusión de GFP-AtRACK1C. Algo similar fue observado en los extractos de *S. kawagutii* y *S. KB8* transformados mediante *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*.

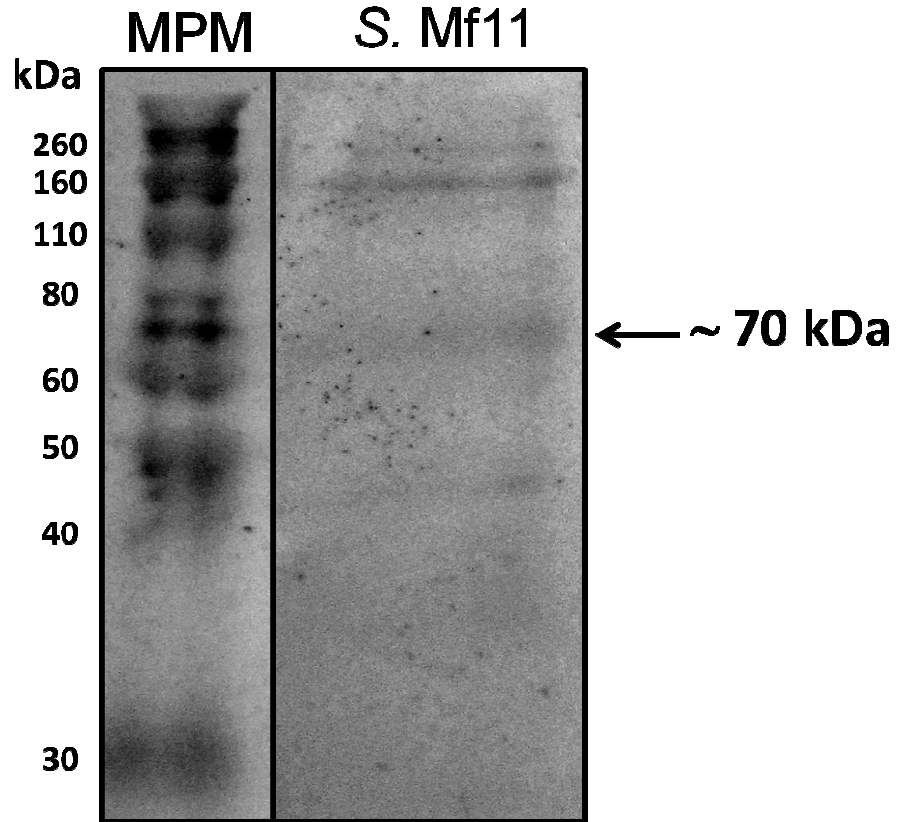


Figura 20. Inmunodetección de la proteína híbrida GFP-AtRACK1C en extractos totales de proteínas de células de *S. Mf11* transformadas mediante *A. tumefaciens* que contenía el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*. La inmunodetección de una banda de ≈ 70 kDa con un anticuerpo anti-GFP, sugiere la expresión de la proteína híbrida GFP-AtRACK1C en las células de *S. Mf11* transformadas mediante *A. tumefaciens*. La flecha indica la banda de ≈ 68 kDa que corresponde al tamaño esperado de la fusión de GFP-AtRACK1C. MPM: marcadores de peso molecular en kilodaltones (kDa).

I. Inoculación de pólipos de *Cassiopea xamachana* con *Symbiodinium* KB8

S. KB8 es el simbiote natural de la medusa tropical *Cassiopea xamachana*. El ciclo de vida de esta medusa incluye la reproducción sexual y asexual (Fig. 21). En la reproducción sexual se requiere de la producción de huevos y esperma, los cuales se fusionan y forman una plánula. Una vez adherida al sustrato ésta

plánula se diferencia en un pólipos llamado scifistoma, el cual puede reproducirse asexualmente por la germinación y liberación de un brote tipo plánula con capacidad natatoria. Es en esta fase de scifistoma que se puede adquirir el simbionte dinoflagelado (S. KB8), evento que se ha postulado como el disparador del proceso de la metamorfosis hacia una medusa diferenciada [Colley y Trench, 1983].

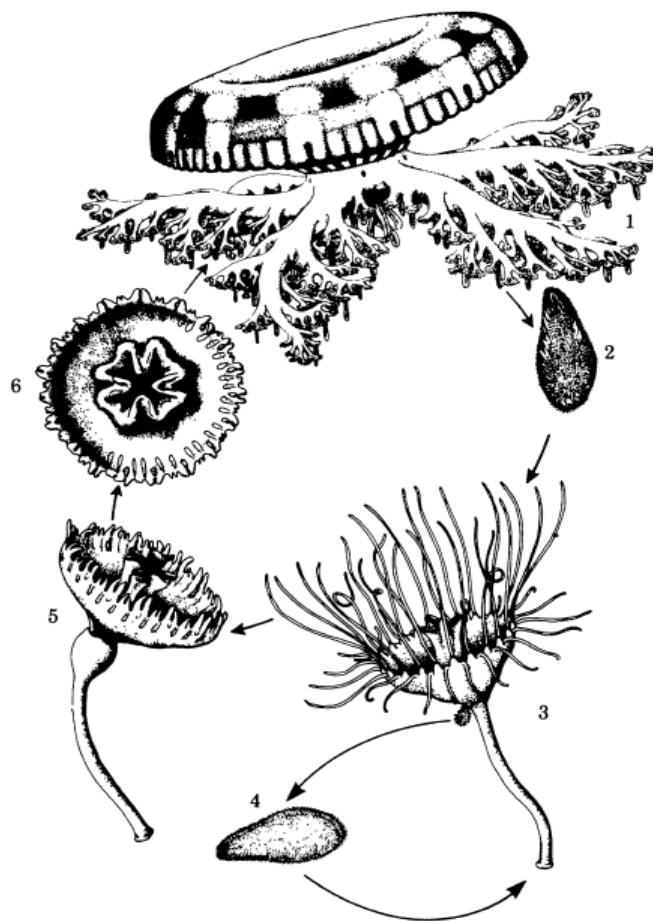


Figura 21. Ciclo de vida de la medusa *Cassiopea xamachana*. La medusa madura sexualmente (1) se reproduce por la producción de huevos y esperma los cuales se fusionan y forman una plánula aposimbótica (2). Una vez adherida al sustrato la plánula se diferencia en un pólipo aposimbótico (scifistoma) (3), el cual puede reproducirse asexualmente por la germinación y liberación de un brote tipo plánula con capacidad natatoria (4). Una vez adquirido el dinoflagelado simbionte, el scifistoma estrobila (5) y libera una éfira (6) [Colley y Trench, 1983].

Ya que la división de los pólipos es constante y pueden ser cultivados en condiciones de laboratorio (Fig. 22, paneles A al F), se procedió a realizar un experimento para determinar si las células transformadas de *S. KB8* son capaces de infectar a los pólipos de *C. xamachana*. Después de 5 días de co-incubación, se determinó si los pólipos presentaban algún cambio en su morfología que pudiera deberse a la adquisición del simbiote dinoflagelado. Los cambios visibles abarcan: una coloración café, tentáculos contraídos, comienzo de la estrobilación, entre otros (Fig. 22, paneles G al J).

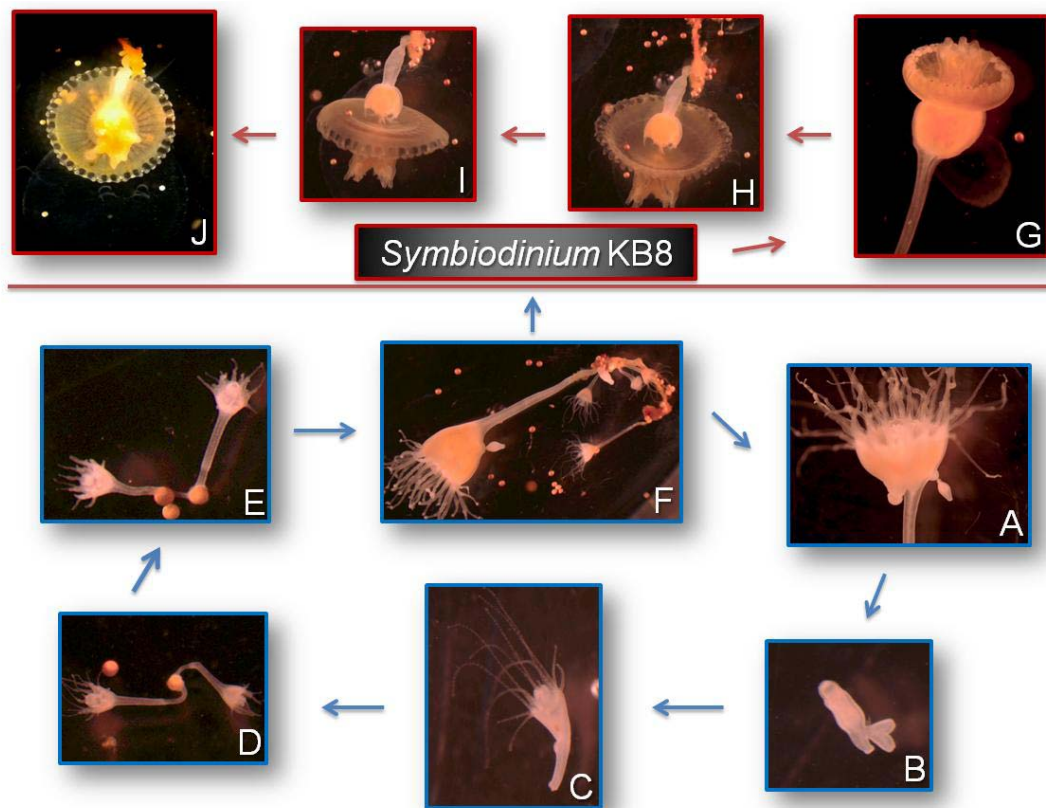


Figura 22. Diferentes etapas en el ciclo de vida de la medusa *Cassiopea xamachana*. Las imágenes muestran las diferentes etapas y los cambios morfológicos visibles en el ciclo de vida de *C. xamachana*. Paneles A-F, muestran las diferentes fases en estado de pólipo. Paneles G-J,

muestran los cambios morfológicos del pólipo una vez adquirido el simbionte dinoflagelado (estrobilación y la liberación de una éfira). A. Pólipo aposimbiótico (scifistoma) con brotes germinando. B. Liberación de un brote tipo plánula con capacidad natatoria. C-D. Desarrollo y crecimiento de pólipos aposimbióticos. F. Pólipo aposimbiótico reproduciéndose asexualmente por la germinación de brotes. Una vez adquirido el simbionte dinoflagelado *Symbiodinium* KB8, el scifistoma estrobila (G) y libera una éfira (H-J).

Las observaciones en el microscopio mostraron que algunos pólipos co-incubados con su simbionte natural (S. KB8) presentaron una coloración café intensa y aparentemente uno de ellos comenzó a estrobilar (Fig. 23, panel C marcado con una flecha). Por otra parte, los pólipos co-incubados con S. Mf1.05b, el cual no establece simbiosis con esta medusa, (Fig. 23, panel A) y los pólipos incubados sólo con medio ASP-8A (control, Fig. 23, panel B,) no mostraron ningún cambio aparente. De igual forma, los pólipos co-incubados con células de S. KB8 transformadas con pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2* tampoco mostraron cambios visibles en su morfología (Fig. 23, paneles D y E, respectivamente).

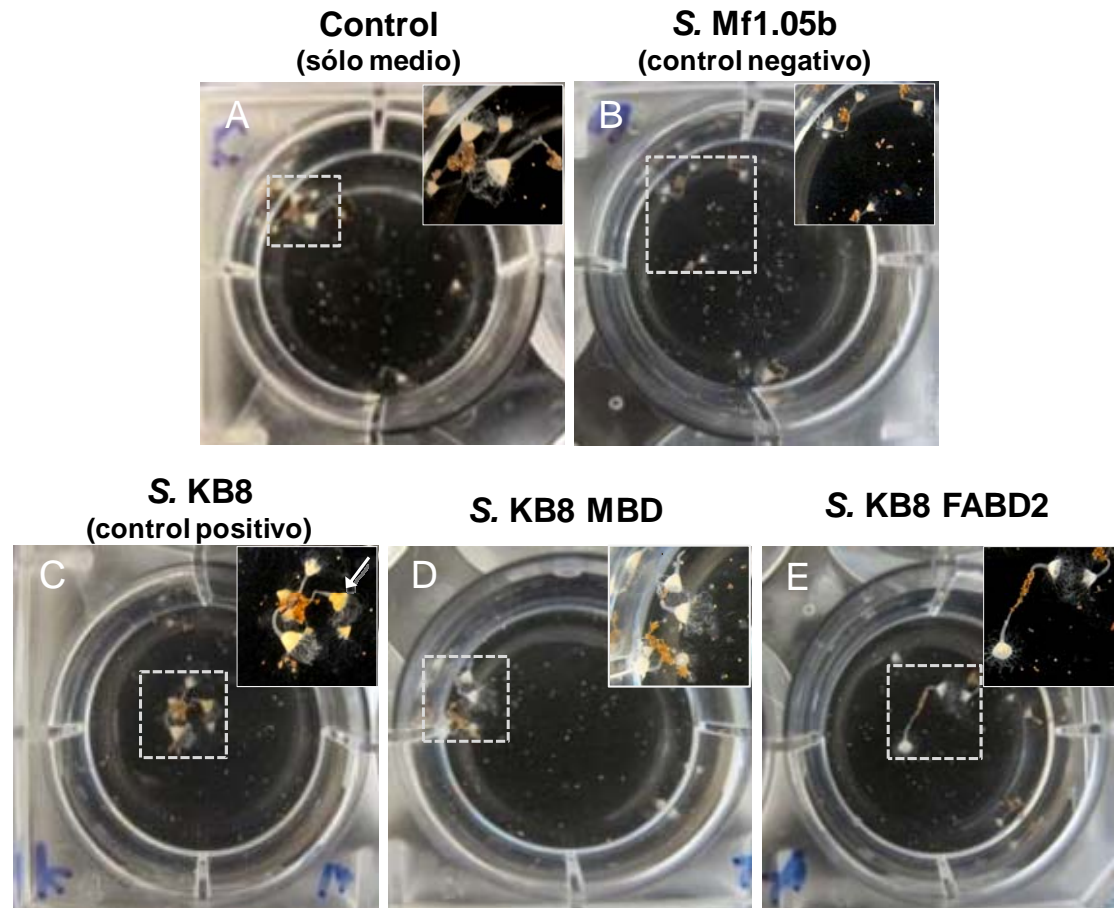


Figura 23. Incubación de pólipos de la medusa *Cassiopea xamachana* con células de *Symbiodinium* KB8 transformadas. Después de 5 días de co-incubación los pólipos fueron observados para determinar si presentaban algún cambio morfológico. Algunos pólipos co-incubados con *S. KB8* mostraron una coloración café y un aparente cambio en su morfología (panel C, flecha blanca). En las demás co-incubaciones no hubo algún cambio visible. A. Pólipos a los que se les agregaron 150 μ l de medio ASP-8^a (Control, sólo medio); B. Pólipos incubados con 150 μ l de *S. Mf1.05b* (control negativo); C. Pólipos co-incubados con 150 μ l de *S. KB8* (control positivo); D. Pólipos co-incubados con 150 μ l de *S. KB8* transformado con la construcción pCB302-*gfp*-MBD (*S. KB8* MBD); E. Pólipos con 150 μ l de inóculo de *S. KB8* transformado con la construcción pCB302-*gfp*-FABD2 (*S. KB8* FABD2). Las áreas punteadas corresponden a la zona amplificada en los recuadros.

XII. DISCUSIÓN

Los dinoflagelados fotosintéticos marinos del género *Symbiodinium* son organismos esenciales en el ambiente acuático. Debido a su capacidad para establecer relaciones simbióticas representan una piedra angular para el mantenimiento del arrecife de coral. El avance en el conocimiento de su fisiología, así como de los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares involucrados en el establecimiento y funcionalidad de sus relaciones simbióticas es básico para el entendimiento de estos procesos y los efectos de cambios del ambiente.

La pared celular de estos dinoflagelados representa una barrera natural y es uno de los principales obstáculos para la aplicación de los métodos de transformación en estos organismos en cultivo. Esto en gran parte es debido al hecho de que a la fecha no se conoce ninguna enzima que sea capaz de digerir completamente su pared celular, lo cual ha impedido el uso de protocolos plenamente establecidos para transformación en protoplastos.

En este trabajo se desarrollaron dos protocolos de transformación genética para dinoflagelados del género *Symbiodinium* mediante: a) el uso de un plásmido purificado y b) la co-incubación con *A. tumefaciens*. En ambos casos el acceso a través de la pared celular se logró mediante la agitación con perlas de vidrio en presencia PEG, a diferencia del método de transformación reportado previamente por ten Lohuis y Miller [1998] en el cual utilizaron fibras de carburo de silicio (SiC) para producir la abrasión de la pared del dinoflagelado. Las perlas de vidrio produjeron el mismo efecto sin tener las

desventajas de las SiC como el riesgo a la salud que representa su uso [Dunahay *et al.* 1997]. Además de no ser tóxicas, las perlas de vidrio son baratas y no requieren del acceso a equipo especializado. Mediante estos dos protocolos se logró la introducción y expresión de genes heterólogos en tres diferentes subtipos de dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium*. Sin embargo, las tasas de transformación obtenidas con los dos métodos fueron diferentes. Para el método utilizando el plásmido purificado las tasas fueron de: 74 ± 8 , 65 ± 5 y de 107 ± 7 por cada 10^6 células de *S.* KB8, *S.* Mf11 y *S. kawagutii*, respectivamente. Por otra parte, cuando se utilizó el método de transformación mediado por *A. tumefaciens*, las tasas fueron de 603 ± 8 , 448 ± 3 y 812 ± 7 por cada 10^6 células de *S.* KB8, *S.* Mf11 y *S. kawagutii*, respectivamente, (Tabla 1). En contraste, en el método desarrollado por ten Lohuis y Miller [1998] se reporta una eficiencia de 5-24 transformantes por 10^7 células. La mayor eficiencia obtenida con *A. tumefaciens* en comparación con perlas de vidrio, concuerda con lo reportado para ambos métodos de transformación en *C. reinhardtii* [Kumara *et al.* 2004]. *A. tumefaciens* es ampliamente utilizado para la transformación en plantas; sin embargo, su uso no sólo está limitado a ellas, ya que cada vez es mayor la lista de organismos que han sido transformados con esta bacteria incluyendo a células humanas en cultivo [Kunik *et al.* 2001]. Tal es el caso de *Symbiodinium* spp., con el cual se logró una transformación exitosa y con una relativa alta eficiencia.

El uso de tres construcciones diferentes en tres cepas de *Symbiodinium* spp. sugiere que el método de transformación mediado por *A. tumefaciens* es reproducible. No obstante, la transformación de en los diferentes clados de *Symbiodinium* spp. mostró

diferencias en la tasa de transformación. Esto pudo ser debido a las diferencias morfológicas que existen entre ellos como grosor de la pared celular o diferencia en la sensibilidad al método de transformación. Esto se hizo evidente cuando se incubaron células de *Symbiodinium* spp. en presencia del herbicida con glufosinato de amonio, ya que *S. KB8* mostró ser más sensible, seguido de *S. Mf11* y finalmente *S. kawagutii* (Gráficas 1 y 2). De igual manera, la tasa de transformación más baja la tuvo *S. KB8* y la más alta, *S. kawagutii*. Esto debido probablemente a que *S. KB8* fue más sensible al rompimiento con perlas de vidrio comparado con *S. Mf11* y *S. kawagutii*. Sin embargo, a pesar de estas diferencias, las tasas de transformación obtenidas por los métodos empleados en este trabajo fueron mayores, en todos los casos, a las reportadas anteriormente por ten Lohuis y Miller [1998].

Con el ADN genómico extraído de las células transformadas de *Symbiodinium* spp. en cultivo, se amplificó una parte de la secuencia de *gfp*. Este producto fue amplificado en todas las reacciones donde se usó el ADN genómico proveniente de células transformadas mediante *A. tumefaciens* con las diferentes construcciones (pCB302-*gfp-AtRACK1C*, pCB302-*gfp-MBD* y pCB302-*gfp-FABD2*), y en todos los subtipos de *Symbiodinium* spp. (Figura 16). De igual manera, un fragmento de la secuencia de *AtRACK1C* fue amplificada en aquellas células transformadas con *A. tumefaciens* que contenían el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*. La secuenciación de estos productos demostró que las secuencias eran idénticas a las de los respectivos genes presentes en las construcciones. Por otro lado, como se muestra en la figura 20, mediante el uso de un anticuerpo anti-GFP se detectó una banda de ≈ 70 kDa en extractos totales de

proteínas de células de *S. Mf11* transformadas mediante *A. tumefaciens* con el plásmido pCB302-*gfp-AtRACK1C*, la cual corresponde al peso esperado de 68 kDa de la fusión de la GFP-AtRACK1C. Algo similar fue observado en los extractos de *S. KB8* y *S. kawagutii* transformado mediante *A. tumefaciens* con el mismo plásmido y usando el anticuerpo anti-GFP, sugiriendo que las proteínas híbridas fueron expresadas correctamente por las células transformadas. Estos resultados también sugieren que los genes presentes en las construcciones fueron incorporados al genoma de *Symbiodinium* spp., ya que los genes de la *gfp* y de *AtRACK1C* no se encuentran naturalmente en el genoma del dinoflagelado.

El uso del promotor heterólogo *CaMV35S* permitió la expresión de los genes presentes en las diferentes construcciones empleadas para transformar a *Symbiodinium* spp. Sin embargo, es posible que la expresión constitutiva de estos afectara de alguna forma a la clorofila presente en las células. Las células normales de *Symbiodinium* spp. observadas en un microscopio de fluorescencia emiten fluorescencia roja debido a la presencia de la clorofila; esto debió resultar en una emisión de fluorescencia de color amarillo en las células transformadas expresando GFP, ya que ésta emite fluorescencia verde. En nuestro caso, las células transformadas se mostraban verdes como si no tuvieran clorofila o ésta estuviera degradada. Esto sugiere la pérdida del pigmento por algún efecto pleiotrópico de la sobreexpresión de los genes transformados en la célula.

Por otra parte, se observó que las células transformadas tienen una tasa muy baja o nula de división celular y que la razón por la que emiten fluorescencia verde es porque al parecer, la síntesis de la clorofila y/o pigmentos fotosintéticos similares está abatida.

Esto debido probablemente a la sobre expresión de dichas proteínas. Este hecho no sería un efecto inusual en las células transformadas con *RACK1*, ya que al ser una proteína de andamiaje puede interactuar con una amplia gama de proteínas de señalización y regular los procesos celulares tales como la división celular, transducción de señales y rutas metabólicas [Revisado en Adams *et al.* 2011]. El efecto de la sobreexpresión *RACK1* heteróloga en *Symbiodinium* spp. y su posible implicación en fotosintéticos metabolismo pigmento requiere más investigación.

Una alternativa a este problema, sería el uso de promotores inducibles, o promotores endógenos acoplados a los genes de interés, evitando así los efectos adversos de la sobreexpresión de genes que están bajo el control de promotores fuertes como lo es *CaMV35S*.

El uso de la secuencia de *gfp* como gen reportero en las construcciones permitió la visualización y seguimiento *in vivo* de las células transformadas en el microscopio de fluorescencia. La GFP ha sido utilizada ampliamente para estos fines ya que puede ser fusionada a las secuencia de otros genes sin causar interferencia en su expresión y función [Chudakov *et al.* 2005]. Además, su maduración postranscripcional es autónoma y eficiente. La fácil visualización de células transformadas en el microscopio de fluorescencia es una de las grandes ventajas del uso de la GFP. De esta forma, fue evidente la diferencia entre las células no transformadas que emitían naturalmente fluorescencia roja y las células transformadas que emitían fluorescencia verde debido a la presencia de la GFP.

La selección de las células de *Symbiodinium* spp. transformadas se logró exitosamente mediante el uso de construcciones que contenían el gen *bar* el cual confiere resistencia a herbicidas que contienen glufosinato de amonio, como Basta[®] y Finale[®]. El glufosinato de amonio es un análogo del ácido glutámico. La bioconversión del ácido glutámico a glutamina es llevada a cabo por la enzima glutamina sintetasa. Este proceso es muy importante para la célula vegetal ya que permite la detoxificación del exceso de amonio y al mismo tiempo biosintetizar glutamina, el cual es un aminoácido muy importante para la síntesis de proteínas [Forde y Lea, 2007]. El glufosinato de amonio compite con el sustrato natural, el ácido glutámico, por el sitio activo de la enzima glutamina sintetasa. La interferencia de la unión del ácido glutámico con la enzima provoca la falta del aminoácido glutamina y, a su vez, la acumulación de compuestos aminados a niveles tóxicos lo que provoca finalmente la muerte celular [Tan *et al.* 2006; Dayan y Watson, 2011]. En efecto, las curvas de crecimiento de *Symbiodinium* spp. en presencia de herbicida con glufosinato de amonio (Finale[®]) mostraron su eficacia para matar a las células en cultivo, ya que en presencia de este compuesto se observó un decremento paulatino de células vivas de los tres diferentes subtipos de *Symbiodinium* spp. usados en el ensayo (Gráficas 1 y 2 líneas discontinuas).

El gen *bar* (*bialaphos resistance*) codifica para la enzima fosfinotricina acetil transferasa (PAT) [Thompson *et al.* 1987]. PAT acetila rápidamente al glufosinato produciendo el metabolito no tóxico N-acetyl-L-glufosinato [De Block *et al.* 1987]. Esta acetilación no permite la unión del glufosinato con la enzima glutamina sintetasa, eliminando así los efectos adversos y letales del herbicida en la célula [Tan *et al.* 2006]. La utilización del

gen *bar* y de herbicidas que contienen glufosinato de amonio como agentes de selección resultó adecuada para seleccionar a las células transformadas de *Symbiodinium* spp.

Los resultados del ensayo de la co-incubación de pólipos de la medusa *Cassiopea Xamachana* y células transformadas de S. KB8 mostraron que éstas no fueron capaces de desatar la metamorfosis en los pólipos. S. KB8 es el simbiote natural de la medusa *C. Xamachana* y el inicio de la relación simbiótica entre estos dos organismos se puede apreciar con el inicio de la metamorfosis del pólipo hacia medusa. En este ensayo, sólo se observó el inicio aparente de metamorfosis cuando los pólipos fueron co-incubados con S. KB8 normales (control, Fig. 23). En las co-incubaciones de células de S. KB8 transformadas (S. KB8 MBD y S. KB8 FABD2) y de S. MF1.05b (control negativo) no se observó algún cambio aparente en los pólipos (Fig. 23). Estos resultados sugieren que no se llevó a cabo el reconocimiento adecuado y no hubo el establecimiento de la relación simbiótica entre los dos organismos. Esto pudo deberse a que la transformación haya afectado al dinoflagelado de tal forma que el mecanismo de reconocimiento entre ambas especies se encuentre alterado. La pared celular de los simbioses del género *Symbiodinium* tiene un papel muy importante en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis. Diversos estudios han mostrado la presencia de glicanos en la pared celular de estos dinoflagelados que podrían mediar la interacción, el reconocimiento y persistencia con su hospedero [Jimbo *et al* 2000; Lin *et al.* 2000; Koike *et al* 2004; Wood-Charlson *et al.* 2006]. La presencia de α -manosa/ α -glucosa y α -galactosa en la pared celular de *Symbiodinium* C1f han mostrado ser

blancos potenciales para las lectinas de los cnidarios, ya que su modificación enzimática reduce significativamente la infección del simbiote a larvas del coral *Fungia scutaria* [Wood-Charlson *et al.* 2006] y cnidarios adultos [Lin *et al.* 2000]. Como se mencionó anteriormente, la sobreexpresión de las proteínas fusionadas a GFP debido al uso de un promotor constitutivo, además de provocar que las células transformadas no se dividan y que la síntesis de la clorofila y/o pigmentos fotosintéticos similares esté perturbada, también podría traer como consecuencia la afectación de las vías o los mecanismos de reconocimiento entre el simbiote y el hospedero, debido al resultado de alguna modificación en la estructura y/o composición de la pared celular del dinoflagelado. Sin embargo, no se tienen datos al respecto de estas observaciones y estos efectos merecen investigaciones posteriores.

El uso de un método de transformación mediado por *A. tumefaciens* aplicado a los dinoflagelados del género *Symbiodinium* es viable y reproducible. Sin embargo dicho método es aún perfectible y las mejoras en el mismo deberán incluir el uso de promotores y genes que no interfirieran con la viabilidad celular ni con su capacidad para establecer relaciones simbióticas con sus hospederos.

El uso de esta técnica y la transformación con diversos genes de interés acoplados a promotores inducibles o endógenos será de gran utilidad experimental y permitirá el avance en el entendimiento de la fisiología de *Symbiodinium* spp. y de los mecanismos involucrados en el establecimiento de su simbiosis con sus diversos organismos hospederos.

XIII. CONCLUSIONES

En este trabajo se lograron transformar diferentes clados de *Symbiodinium* spp. con diferentes construcciones de genes heterólogos con proteínas fluorescentes utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. La utilización de la secuencia codificante de la GFP como gen reportero demostró ser adecuado. El uso de plásmidos para transformación que conducen a la expresión del gen *bar* de resistencia al herbicida Basta[®] resultó ser adecuado para obtener un buen método de selección de las células transformadas. Finalmente, las evidencias apuntan a que el gen “transformante” se incorporó al genoma, aunque se requieren pruebas adicionales para corroborar inequívocamente esto último. Este trabajo demuestra que es posible transformar genéticamente a este dinoflagelado de una manera eficiente y reproducible.

XIV. PERSPECTIVAS

El conocimiento sobre la biología celular y fisiología de *Symbiodinium* spp. es fundamental debido a que este organismo es un componente indispensable para el arrecife de coral. Este hecho hace impostergable el desarrollo y aplicación de técnicas de manipulación genética que permitan avances importantes en la comprensión de la biología básica de este organismo. El desarrollo de una metodología confiable y reproducible para la transformación de *Symbiodinium* spp. permitirá la introducción de genes, y el análisis *in vivo* de su función y regulación. De igual manera, será factible la implementación de técnicas como el silenciamiento de genes mediante RNAi y la expresión de genes acoplados a promotores endógenos. Esto a su vez, permitirá profundizar en el conocimiento de la biología y fisiología de *Symbiodinium* spp., así como también, elucidar los procesos de interacción y establecimiento de su simbiosis con otros organismos.

XV. LITERATURA CITADA

Adams DR, Ron D, Kiely PA. **RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function.** *Cell Communication and Signaling* 2011, 9:22.

Asad S, Mukhtar Z, Nazir F, Hashmi JA, Mansoor S, Zafar Y, Arshad, M. **Silicon carbide whisker-mediated embryogenic callus transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and regeneration of salt tolerant plants.** *Molecular Biotechnology* 2008, 40:161-169.

Baldauf SL. **The deep roots of eukaryotes.** *Science* 2003, 300:1703-1706.

Bayer T, Aranda M, Sunagawa S, Yum LK, DeSalvo MK, Lindquist E, Coffroth MA, Voolstra CR, Medina M. ***Symbiodinium* transcriptomes: genome insights into the dinoflagellate symbionts of reef-building corals.** *PLoS ONE* 2012, 7:e35269

Birch RG. **Plant transformation: problems and strategies for practical application.** *Annual Review of Plant Biology* 1997, 48:297-326.

Blank RJ. **Cell architecture of the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. inhabiting the Hawaiian stony coral *Montipora verrucosa*.** *Marine Biology* 1987, 94:143-155.

Blank RJ, Huss VAR, Kersten W. **Base composition of DNA from symbiotic dinoflagellates: a tool for phylogenetic classification.** *Archives of Microbiology* 1988, 149:515-520.

Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Hosler JP, Johnson AM, Jones AR, Randolph-Anderson BL, Robertson D, Klein TM, Shark KB, *et al.* **Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles.** *Science* 1988, 240:1534-1538.

Broothaerts W, Mitchell HJ, Weir B, Kaines S, Smith LM, Yang W, Mayer JE, Roa-Rodríguez C, Jefferson RA. **Gene transfer to plants by diverse species of bacteria.** *Nature* 2005, 433:629-633.

Bundock P, Dulk-Ras AD, Beijersbergen AGM, Hooykas PJJ. **Trans-kingdom gene transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*.** *The EMBO Journal* 1995, 14:3206-3214.

Capecchi MR. **High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.** *Cell* 1980, 22:479-488.

Castillo-Medina RE, Islas-Flores T, Thomé PE, Iglesias-Prieto R, Lin S, Zhang H, Villanueva MA. **The PsbO homolog from *Symbiodinium kawagutii* (Dinophyceae) characterized using biochemical and molecular methods.** *Photosynthesis Research* 2013, 115:167-178.

Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. **Fluorescent proteins as a toolkit for *in vivo* imaging.** *Trends in Biotechnology* 2005, 23:605-613.

Citovsky V, Kozlovsky SV, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, Tovkach A, Tzfira, T. **Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection.** *Cellular Microbiology* 2007, 9:9-20.

Coats DW. **Dinoflagellate life-cycle complexities.** *Journal of Phycology* 2002, 38:417-419.

Coffroth MA, Santos SR. **Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*.** *Protist* 2005, 156:19-34.

Colley NJ, Trench RK. **Selectivity in phagocytosis and persistence of symbiotic algae by the scyphistoma stage of the jellyfish *Cassiopeia xamachana*.** *Proceedings of the Royal Society of London part B* 1983, 219:61-82.

Dayan FE, Watson SB. **Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action.** *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2011, 101:182-190.

De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gossele V, Rao Movva N, Thompson C, Van Montagu M, Leemans, J. **Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme.** *The EMBO Journal*, 1987, 6:2513-2518.

de Groot MJA, Bundock P, Hooykas PJJ, Beijersbergen AGM. ***Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi.** *Nature Biotechnology* 1998, 16:839-842.

de la Espina SMD, Alverca E, Cuadrado A, Franca S. **Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: the amazing dinoflagellates.** *European Journal of Cell Biology* 2005, 84:137-149.

DeSalvo MK, Sunagawa S, Fisher PL, Voolstra CR, Iglesias-Prieto R, Medina M. **Coral host transcriptomic states are correlated with *Symbiodinium* genotypes.** *Molecular Ecology* 2010, 19:1174-1186.

Dunahay TG. **Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers.** *Biotechniques* 1993, 15:452-460.

Escobar MA, Dandekar AM. ***Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease.** *TRENDS in Plant Science* 2003, 8:380-386.

Feng S, Xue L, Liu H, Lu P. **Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method.** *Molecular Biology Reports* 2009, 36:1433-1439.

Fensome RA, Saldarriaga JF, Taylor FJRM. **Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies.** *Grana* 1999, 38:66-80.

Fitt WK, Gates RD, Hoegh-Guldberg O, Bythell JC, Jatkar A, Grottoli AG, Gomez M, Fisher P, Lajuenesse TC, Pantos O, Iglesias-Prieto R, Franklin DJ, Rodriguez LJ, Torregiani JM, van Woesik R, Lesser MP. **Response of two species of Indo-Pacific corals, *Porites cylindrica* and *Stylophora pistillata*, to short-term thermal stress: The host does matter in determining the tolerance of corals to bleaching.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2009, 373:102-110.

Forde BG, Lea PJ. **Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling.** *Journal of Experimental Botany* 2007, 58:2339-2358.

Freudenthal HD. ***Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella: Taxonomy, life cycle and morphology.** *Journal of Protozoology* 1962, 9:45-52.

Fromm M, Taylor LP, Walbot V. **Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1985, 82:5824-5828.

Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Ménoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, EJ Rebar, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. **Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases.** *Science* 2009, 325:433-434

Graham NAJ, Wilson SK, Jennings S, Polunin NVC, Bijoux JP, Robinson J. **Dynamic fragility of oceanic coral reef ecosystems.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2006, 103:8425-8429.

Griesbach RJ. **Chromosome-mediated transformation via microinjection.** *Plant Science* 1987, 50:69-77.

Griffith F. **The significance of pneumococcal types.** *Journal of Hygiene* 1928, 27:113-159.

Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. **Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection.** *Nature* 1985, 315:680-683.

Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell DC, Sale P, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A, Hatziolos M. **Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification.** *Science* 2007, 318:1737-1742.

Hou Y, Lin S. **Distinct gene number-genome size relationships for eukaryotes and non-eukaryotes: gene content estimation for dinoflagellate genomes.** *PLoS ONE* 2009, 4:e6978-e6978.

Jimbo M, Yanohara T, Koike K, Sakai R, Muramoto K, Kamiya H. **The D-galactose-binding lectin of the octocoral *Sinularia lochmodes*: characterization and possible relationship to the symbiotic dinoflagellates.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2000, 125:227-236.

Jones-Villeneuve E, Huang B, Prudhomme I, Bird S, Kemble R, Hattori J, Miki B. **Assessment of microinjection for introducing DNA into uninuclear microspores of rapeseed.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1995, 40:97-100.

Kaeppeler H, Gu W, Somers DA, Rines HW, Cockburn AF. **Silicon carbide fiber-mediated DNA delivery into plant cells.** *Plant Cell Reports* 1990, 9:415-418.

Kaeppler H, Somers DA, Rines HW, Cockburn AF. **Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells.** *Theoretical and Applied Genetics* 1992, 84:560-566.

Kindle KL. **High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1990, 87: 1228-1232.

Koike K, Jimbo M, Sakai R, Kaeriyama M, Muramoto K, Ogata T, Maruyama T, Kamiya, H. **Octocoral chemical signaling selects and controls dinoflagellate symbionts.** *Biological Bulletin* 2004, 207:80-86.

Kumara SV, Misquitta RW, Reddy VS, Raob BJ, Rajama MV. **Genetic transformation of the green alga-*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*.** *Plant Science* 2004, 166: 731-738.

Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C, Citovsky V. **Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2001, 98: 1871-1876.

Laemmli UK. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, 227, 680-685.

Lajeunesse TC. **“Species” radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition.** *Molecular and Biological Evolution* 2005, 22:570-581.

LaJeunesse T, Parkinson JE, Trench RK. **Symbiodinium**. Version 04 July 2012. <http://tolweb.org/Symbiodinium/126705/2012.07.04> in The Tree of Life Web Project, <http://tolweb.org/>.

Leggat W, Hoegh-Guldberg O, Dove S, Yellowlees D. **Analysis of an EST library from the dinoflagellate (*Symbiodinium* sp.) symbiont of reef-building corals.** *Journal of Phycology* 2007, 43:1010-1021.

Lin KL, Wang JT, Fang LS. **Participation of glycoproteins on zooxanthellal cell walls in the establishment of a symbiotic relationship with the sea anemone, *Aiptasia pulchella*.** *Zoological Studies* 2000, 39:172-178.

Lin S, Zhang H, Zhuang Y, Tran B, Gill J. **Spliced leader-based metatranscriptomic analyses lead to recognition of hidden genomic features in dinoflagellates.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2010, 107:20033-20038.

Lin S. **Genomic understanding of dinoflagellates.** *Research in Microbiology* 2011, 162:551-569.

Lörz H, Paszkowski J, Dierks-Ventling C, Potrykus I. **Isolation and characterization of cytoplasts and mini protoplasts derived from protoplasts of cultured cells.** *Physiologia Plantarum* 1981; 53:385-391.

Maráz A. **Impact of yeast genetics and molecular biology on traditional and new biotechnology.** *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 1999, 46:289-295.

Marc J, Granger CL, Brincat J, Fisher DD, Kao T, McCubbin AG, Cyr R. **A GFP-MAP4 reporter gene for visualising cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells.** *Plant Cell* 1998, 10:1927-1939.

McCullen CA, Binns AN. ***Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2006, 22:101-127.

Miller DJ, Ball EE, Foret S, Satoh N. **Coral genomics and transcriptomics-Ushering in a new era in coral biology.** *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2011, 408:114-119.

Muscatine L, Porter J. **Reef corals: Mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments.** *BioScience* 1977, 27:454-460.

Newell CA. **Plant transformation technology.** *Molecular Biotechnology* 2000, 16: 53-65.

Ortiz-Matamoros MF, Villanueva MA, Islas-Flores T. **Transient transformation of cultured photosynthetic dinoflagellates *Symbiodinium* spp. with plant-targeted vectors.** *Ciencias Marinas* 2015a, 41:21-32.

Ortiz-Matamoros MF, Islas-Flores T, Voigt B, Menzel D, Baluska F, Villanueva MA. **Transformation of cultured photosynthetic dinoflagellates *Symbiodinium* spp. with plant-targeted vectors.** *PLoS ONE* 2015b, Sometido.

Pawlowski J, Holzmann M, Fahrni JF, Pochon X, Lee JJ. **Molecular identification of algal endosymbionts in large miliolid Foraminifera: 2 dinoflagellates.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 2001, 48:368-373.

Pearse VB, Muscatine L. **Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification.** *Biological Bulletin* 1971, 141:350-363.

Pochon X, LaJeunesse TC, Pawlowski J. **Biogeographic partitioning and host specialization among foraminiferan dinoflagellate symbionts (*Symbiodinium*; *Dinophyta*).** *Marine Biology* 2004, 146:17-27.

Pochon X, Gates RD. **A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawaii.** *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2010, 56:492-497.

Rao AQ, Bakhsh A, Kiani S, Shahzad K, Ali Shahid A, Husnain T, Riazuddin S. **The myth of plant transformation.** *Biotechnology Advances* 2009, 27:753-763.

Rae PMM. **Hydroxymethyluracil in eukaryote DNA: A natural feature of the pyrophyta (Dinoflagellates).** *Science* 1976, 194:1062-1064.

Rakoczy-Trojanowska M. **Alternative methods of plant transformation.** *Cellular and Molecular Biology Letters* 2002, 7:849-858.

Rivera AL, Gómez-Lim M, Fernández F, Loske AM. **Physical methods for genetic plant transformation.** *Physics of Life Reviews* 2012, 9:308-345.

Rizzo PJ. **The enigma of the dinoflagellate chromosome.** *Journal of Protozoology* 1991, 38:246-252.

Rowan R, Powers DA. **A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses.** *Science* 1991, 251:1348-1351.

Sanford JC, Klein TM, Wolf ED, Allen N. **Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process.** *Particulate Science and Technology* 1987, 5:27-37.

Sanford JC. **Biolistic plant transformation.** *Physiologia Plantarum* 1990, 79:206-209.

Sanford JC, Smith FD, Russell JA. **Optimizing the biolistic process for different biological applications.** *Methods in Enzymology* 1993, 217:483-509.

Sawahel WA, Cove DJ. **Gene transfer strategies in plants.** *Biotechnology Advances* 1992, 10:393-412.

Schnitzler CE, Weis VM. **Coral larvae exhibit few measurable transcriptional changes during the onset of coral-dinoflagellate endosymbiosis.** *Marine Genomics* 2010, 3:107-116.

Schoenberg DA, Trench RK. **Genetic variation in *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* Freudenthal, and its specificity in its symbiosis with marine invertebrates. II. Morphological variation in *Symbiodinium microadriaticum*.** *Proceedings of the Royal Society B* 1980, 207:429-444.

Scholthof HB, Scholthof KBG, Jackson AO. **Plant virus gene vectors for transient expression of foreign proteins in plants.** *Annual Review of Phytopathology* 1996, 34:299-323.

Shoguchi E, Shinzato C, Kawashima T, Gyoja F, Mungpakdee S, Koyanagi R, Takeuchi T, Hisata K, Tanaka M, Fujiwara M, Hamada M, Seidi A, Fujie M, Usami T, Goto H, Yamasaki S, Arakaki N, Suzuki Y, Sugano S, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Medina M, Coffroth MA, Bhattacharya D, Satoh N. **Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure.** *Current Biology* 2013, 23:1399-1408.

Songstad DD, Somers DA, Griesbach RJ. **Advances in alternative DNA delivery techniques.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1995, 40:1-15.

Stanley Jr GD. **Photosymbiosis and the evolution of modern coral reefs.** *Science* 2006, 312:857-858.

Stanley Jr GD, Swart PK. **Evolution of the coral-zooxanthellae symbiosis during the Triassic: a geochemical approach** *Paleobiology* 1995, 21:179-199.

Stanley GD, Helmle KP. **Middle Triassic coral growth bands and their implication for photosymbiosis.** *Palaios* 2010, 25:754-763.

Stat M, Carter D, Hoegh-Guldberg O. **The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts-Symbiosis, diversity, and the effect of climate change.** *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 2006, 8:23-43.

Tan S, Evans R, Singh B. **Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops.** *Amino Acids* 2006, 30:195-204.

ten Lohuis MR, Miller DJ. **Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs.** *The Plant Journal* 1998, 13:427-435.

Terpe K. **Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 72: 211-222.

Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. **Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy.** *Nature Reviews Genetics* 2003, 4:346-358.

Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Cramer R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J. **Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*.** *The EMBO Journal* 1987, 6:2519-2523.

Trench RK. **The cell biology of plant–animal symbiosis.** *Annual Review of Plant Physiology* 1979, 30:485:531.

Trench RK, Blank RJ. ***Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, *Symbiodinium goreauii* Sp-Nov, *Symbiodinium kawagutii* Sp-Nov and *Symbiodinium pilosum* Sp-Nov—Gymnodinioid dinoflagellate symbionts of marine-invertebrates.** *Journal of Phycology* 1987, 23:469-481.

Tzfira T, Citovsky V. **The *Agrobacterium*-plant cell interaction. Taking biology lessons from a bug.** *Plant physiology* 2003, 133:943-947.

Udy JW, Hinde R, Vesik M. **Chromosomes and DNA in *Symbiodinium* from Australian hosts.** *Journal of Phycology* 1993, 29:314-320.

van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur11 LAJ, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhivotovsky B, Bozhkov PV. **Morphological classification of plant cell deaths.** *Cell Death and Differentiation* 2011, 18:1241-1246.

Vaughan GL, Jordan J, Karr S. **The toxicity, *in Vitro*, of silicon carbide whiskers.** *Environmental Research* 1991, 56:57-67.

Veldhuis MJW, Cucci TL, Sieracki ME. **Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications.** *Journal of Phycology* 1997, 33:527-541.

Venn AA, Loram JE, Douglas AE. **Photosynthetic symbioses in animals.** *Journal of Experimental Botany* 2008, 59:1069-1080.

Villanueva, M.A. **Electrotransfer of proteins in an environmentally friendly methanol-free transfer buffer.** *Analytical Biochemistry* 2008, 373:377-379.

Voigt B, Timmers AC, Šamaj J, Müller J, Baluška F, Menzel D. **GFP-FABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings.** *European Journal of Cell Biology*. 2005, 84:595-608.

Voolstra CR, Schwarz JA, Schnetzer J, Sunagawa S, DeSalvo MK, Szmant AM, Coffroth MA, Medina M. **The host transcriptome remains unaltered during the establishment of coral-algal symbioses.** *Molecular Ecology* 2009a, 18:1823-1833.

Voolstra CR, Sunagawa S, Schwarz JA, Coffroth MA, Yellowlees D, Leggat W, Medina M. **Evolutionary analysis of orthologous cDNA sequences from cultured and symbiotic dinoflagellate symbionts of reef-building corals (Dinophyceae: *Symbiodinium*).** *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* 2009b, 4:67-74.

Wakefield TS, Kempf SC. **Development of host- and symbiont-specific monoclonal antibodies and confirmation of the origin of the symbiosome membrane in a cnidarian-dinoflagellate symbiosis.** *Biological Bulletin* 2001, 200:127-143.

Wang K, Drayton P, Frame B, Dunwell J, Thompson J. **Whisker-mediated plant transformation: an alternative technology.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 1995, 31:101-104.

Weaver JC, Chizmadzhev Y. **Theory of electroporation: a review.** *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1996, 41:135-160.

Weis VM. **Cellular mechanisms of cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis.** *Journal of Experimental Biology* 2008, 211:3059-3066.

Wood-Charlson EM, Hollingsworth LL, Krupp DA, Weis VM. **Lectin/glycan interactions play a role in recognition in a coral/dinoflagellate symbiosis.** *Cellular Microbiology* 2006, 8:1985-1993.

Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K, Oliver DJ. **A mini binary vector series for plant transformation.** *Plant Molecular Biology* 1999, 40:711-717.

Yellowlees D, Rees TA, Leggart W. **Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts.** *Plant, Cell and Environment* 2008 31:679-694.

Yuyama I, Watanabe T, Takei Y. **Profiling differential gene expression of symbiotic and aposymbiotic corals using a high coverage gene expression profiling (HiCEP) analysis.** *Marine Biotechnology* 2011, 13:32-40.