



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

VARIABILIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE *Symbiodinium fitti* (*in hospite*)
EN *Acropora palmata* COMO RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
CHRISTIAN FELIPE NIETO PANQUEVA

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. ANASTAZIA BANASZAK
(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMyL, UNAM)

COMITÉ TUTORAL:
DR. XAVIER CHIAPPA CARRARA
(UNIDAD ACADÉMICA CIENCIAS Y TECNOLOGÍA SISAL, UNAM)
DRA. PATRICIA THOMÉ ORTIZ
(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMyL, UNAM)
DRA. SUSANA ENRÍQUEZ DOMÍNGUEZ
(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, ICMyL, UNAM)
DR. EUGENIO CARPIZO ITUARTE
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS, UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA)

MAYO 2017

CD.MX.



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.



VARIABILIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE *Symbiodinium fitti* (*in hospite*)
EN *Acropora palmata* COMO RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

CHRISTIAN FELIPE NIETO PANQUEVA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ANASTAZIA BANASZAK

COMITÉ TUTORAL: DR. XAVIER CHIAPPA CARRARA
DRA. PATRICIA THOMÉ ORTIZ
DRA. SUSANA ENRÍQUEZ DOMÍNGUEZ
DR. EUGENIO CARPIZO ITUARTE

MÉXICO, D. F. MAYO 2017

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 4 |
| JUSTIFICACIÓN | 7 |
| ANTECEDENTES | 12 |
| II. HIPÓTESIS | 17 |
| III. OBJETIVOS | 18 |
| GENERAL..... | 18 |
| ESPECÍFICOS | |
| IV. MATERIALES Y MÉTODOS | 19 |
| ÁREA DE ESTUDIO | 19 |
| COLECCIÓN DE FRAGMENTOS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES | 20 |
| EVALUACIÓN DE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS | 22 |
| Determinaciones de Fluorescencia..... | 22 |
| Determinación de las Propiedades Espectroscópicas del Coral..... | 23 |
| Determinaciones ópticas..... | 25 |
| Coeficiente específico de absorción de la clorofila a, a* | 26 |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 27 |
| V. RESULTADOS | 29 |
| PARTE I..... | 29 |
| DETERMINACIONES ÓPTICAS Y MORFOLÓGICAS EN CONDICIONES NATURALES | 29 |
| PARTE II..... | 30 |
| VARIACIÓN DE PROPIEDADES ÓPTICAS EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA | 30 |
| Fluorescencia de la clorofila..... | 31 |
| Propiedades espectroscópicas del coral..... | 34 |
| Determinaciones ópticas..... | 37 |
| Coeficiente específico de absorción de la clorofila a (a*)..... | 41 |
| PARTE III | 44 |
| COMPARACIÓN DE EFICIENCIA FOTOQUÍMICA ENTRE CEPAS DE SIMBIONTES | 44 |
| VI. DISCUSIÓN | 46 |
| VII. CONCLUSIONES | 51 |
| VIII. REFERENCIAS | 53 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. UBICACIÓN DEL SITIO DE ESTUDIO. UNIDAD ARRECIFAL “LIMONES” AL NORTE DEL PARQUE NACIONAL ARRECIFE DE PUERTO MORELOS (MODIFICADO DE GOOGLE EARTH, 2015). | 19 |
| FIGURA 2. DISPOSICIÓN DE LOS ORGANISMOS EN LOS ESTANQUES UTILIZADOS DURANTE EL EXPERIMENTO. LOS CUATRO TONOS DE COLORES REPRESENTAN UNA IDENTIDAD GENÉTICA DEL SIMBIONTE DISTINTA. | 21 |
| FIGURA 3. (A) EXPOSICIÓN DE LUZ, Y (B) TEMPERATURA DEL AGUA BAJO LA CUAL ESTUVIERON SOMETIDOS LOS ORGANISMOS A LO LARGO DEL EXPERIMENTO. PUNTOS ROJOS INDICAN EL COMPORTAMIENTO DE LA LUZ EN EL ESTANQUE TRATAMIENTO Y PUNTOS AZULES PARA EL ESTANQUE CONTROL. | 31 |
| FIGURA 4. EFICIENCIA FOTOQUÍMICA MÁXIMA (F_v/F_m). COMPARACIÓN ENTRE CONTROL Y TRATAMIENTO. CAJAS DE COLOR AZUL INDICAN ORGANISMOS CONTROL Y CAJAS ROJAS INDICAN ORGANISMOS TRATAMIENTO TEMPERATURA. LÍNEAS EN MITAD DE CAJAS REPRESENTAN MEDIAS; PUNTOS REPRESENTAN DATOS..... | 32 |
| FIGURA 5. VARIACIONES DEPENDIENTES DE TEMPERATURA DEL PARÁMETRO Q_m , PRESIÓN DE EXCITACIÓN SOBRE EL FOTOSISTEMA II A LO LARGO DEL EXPERIMENTO. CAJAS DE COLOR AZUL INDICAN ORGANISMOS CONTROL Y CAJAS ROJAS INDICAN ORGANISMOS TRATAMIENTO TEMPERATURA. LÍNEAS EN MITAD DE CAJAS REPRESENTAN MEDIAS; PUNTOS REPRESENTAN DATOS..... | 33 |
| FIGURA 6. ASOCIACIÓN LINEAL ENTRE LAS DETERMINACIONES DE FLUORESCENCIA: EFICIENCIA FOTOQUÍMICA MÁXIMA Y PRESIÓN DE EXCITACIÓN SOBRE EL FOTOSISTEMA II PARA LOS ORGANISMOS CONTROL A LO LARGO DEL EXPERIMENTO ($R^2 = 0.7665$). 34 | |
| FIGURA 7. ESPECTRO DE REFLECTANCIA DE LUZ POR PIGMENTOS PARA LOS ORGANISMOS EXPERIMENTALES EN CADA FASE DEL EXPERIMENTO TRANSFORMADO COMO $\log(1/R)$. CON LETRAS DEL MISMO COLOR SE SEÑALAN LA CONDICIÓN O FASE DEL EXPERIMENTO BAJO LA CUAL SE ENCONTRABAN. | 35 |
| FIGURA 8. VARIACIÓN DE LA ABSORPTANCIA A LO LARGO DEL EXPERIMENTO A) REGIÓN FOTOSINTÉTICAMENTE ACTIVA (PAR) B) REGIÓN DEL ROJO DE LA CLOROFILA A A 675 NM. CAJAS DE COLOR AZUL INDICAN ORGANISMOS CONTROL Y CAJAS ROJAS INDICAN ORGANISMOS TRATAMIENTO TEMPERATURA. LÍNEAS EN MITAD DE DIAGRAMAS DE BOX REPRESENTAN MEDIAS; PUNTOS REPRESENTAN DATOS..... | 36 |
| FIGURA 9. VARIACIÓN DEL NÚMERO DE SIMBIONTES POR UNIDAD DE ÁREA EN CADA ETAPA DEL EXPERIMENTO. CAJAS DE COLOR AZUL INDICAN ORGANISMOS CONTROL Y CAJAS ROJAS INDICAN ORGANISMOS TRATAMIENTO TEMPERATURA. LÍNEAS EN MITAD DE CAJAS REPRESENTAN MEDIAS; PUNTOS REPRESENTAN DATOS..... | 37 |
| FIGURA 10. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE PIGMENTO POR UNIDAD DE ÁREA. CAJAS DE COLOR AZUL INDICAN ORGANISMOS CONTROL Y CAJAS ROJAS INDICAN ORGANISMOS TRATAMIENTO TEMPERATURA. LÍNEAS EN MITAD DE CAJAS REPRESENTAN MEDIAS; PUNTOS REPRESENTAN DATOS..... | 39 |
| FIGURA 11. ASOCIACIÓN NO LINEAL ENTRE LA ABSORPTANCIA DE LUZ Y LA CONCENTRACIÓN DE PIGMENTO POR UNIDAD DE ÁREA (A_{675} : $R^2 = 0.9297$; A_{PAR} : $R^2 = 0.9262$). LOS CÍRCULOS Y LA LÍNEA DE COLOR VERDE REPRESENTAN LA ABSORPTANCIA DE LA CLOROFILA A (675 NM), MIENTRAS QUE LOS CÍRCULOS Y LA | |

LÍNEA DE COLOR ESCARLATA REPRESENTAN LA ABSORPTANCIA DE PIGMENTOS EN TODO EL ESPECTRO PAR (400 - 700 NM). LOS CÍRCULOS CON FONDO CLARO REPRESENTAN ORGANISMOS CONTROL Y LOS CÍRCULOS CON FONDO OSCURO REPRESENTAN LOS ORGANISMOS SOMETIDOS AL TRATAMIENTO TEMPERATURA. 40

FIGURA 12. VARIACIÓN DEL COEFICIENTE ESPECIFICO DE ABSORCIÓN A* DE LA CLOROFILA A LO LARGO DEL EXPERIMENTO. CAJAS DE COLOR AZUL INDICAN ORGANISMOS CONTROL Y CAJAS ROJAS INDICAN ORGANISMOS TRATAMIENTO TEMPERATURA.

LÍNEAS EN MITAD DE CAJAS REPRESENTAS MEDIAS; PUNTOS REPRESENTAN DATOS. 42

FIGURA 13. ASOCIACIÓN NO LINEAL ENTRE EL COEFICIENTE DE ABSORCIÓN ESPECIFICO Y LA DENSIDAD DE CLOROFILA A POR UNIDAD DE ÁREA ($R^2= 0.907$). CÍRCULOS DE COLOR AZUL REPRESENTAN ORGANISMOS CONTROL Y CÍRCULOS DE COLOR ROJO REPRESENTAN ORGANISMOS TRATAMIENTO TEMPERATURA. LA LÍNEA REPRESENTA LA CURVA DE AJUSTE..... 43

FIGURA 14. VARIACIÓN EN LA PROPORCIÓN DE CADA RANGO DE VALORES PRESENTADOS PARA EL PARÁMETRO Q_M EN CUATRO DIFERENTES CEPAS DE SYMBIODINIUM FITTI. EN EL EJE HORIZONTAL, SE DENOTAN CADA UNA DE LAS ETAPAS DEL EXPERIMENTO. LETRA N DE COLOR ESCARLATA EN LA PARTE INFERIOR IZQUIERDA REPRESENTA LA MUESTRA NATURAL. 44

VARIABILIDAD ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE *Symbiodinium fitti* (*in hospite*) EN *Acropora palmata* COMO RESPUESTA AL ESTRÉS TÉRMICO

RESUMEN

La prevalencia espacio-temporal de la simbiosis entre corales escleractíneos y dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium*, ha demostrado estar regida por las condiciones ambientales del medio en el que ocurre. Particularmente, la temperatura ha tenido un papel determinante en la ruptura de tal asociación dada la intensidad del calentamiento global durante el último siglo, desencadenando eventos de blanqueamiento caracterizados por afectar los procesos de transferencia de energía y recursos entre las dos partes de la simbiosis, que conllevan a una pérdida de simbiontes, y que finalmente repercuten en la disminución de la supervivencia del coral. En este estudio, se describió la variación que presentan componentes como la fotoquímica, la variabilidad de la capacidad y eficiencia de absorción de luz, a partir de la caracterización de las propiedades ópticas del coral *Acropora palmata* antes, durante y después de un evento de estrés térmico, evaluando adicionalmente la fotoquímica *in hospite* de cuatro posibles combinaciones holobionticas de *Symbiodinium fitti* con el coral. Una reducción en el número de simbiontes entre el 70 y 77 por ciento existió, tras una y dos semanas de estrés, que generó una disminución entre 16 y 20 miligramos de pigmento por unidad de área en el coral. A nivel del holobionte esto correspondió a entre un 14 y 38 por ciento de disminución de Fv/Fm, y su capacidad de absorción se redujo hasta entre un 58 y 34 por ciento durante el mismo periodo. Un modelo de ajuste no lineal, permitió determinar que existe una fuerte dependencia en la eficiencia de absorción de luz por pigmento en función de la densidad del mismo. La comparación del desempeño fotoquímico, de cada combinación holobiontica confirmó que no existen diferencias funcionales a nivel intraespecífico, y los resultados se encuentran contenidos en un rango de respuestas exhibidas por *A. palmata* que no repercuten en una variedad funcional que exprese mayor o menor resistencia al estrés térmico.

I. INTRODUCCIÓN

Justificación

Los arrecifes de coral son ecosistemas que proliferan gracias a la fijación de carbono inorgánico mediante la relación simbiótica entre corales escleractineos y dinoflagelados fotosintéticos del género *Symbiodinium* spp. En esta relación, la translocación de los productos de la fotosíntesis y la asimilación de amonio, nitrato y nitrógeno (Jackson et al., 1989; Muscatine et al., 2005) contribuyen significativamente a la formación del tejido de coral y su esqueleto de carbonato de calcio (Muscatine y Cernichiari, 1969; Pearse y Muscatine, 1971), garantizando su supervivencia en un ambiente que presenta una limitación de nutrientes por naturaleza. El éxito de los corales en este tipo de ambientes se atribuye a su excepcional eficiencia de colección de luz, pues son varias las propiedades del coral que crean un ambiente lumínico particular en el que yace la simbiosis coral-alga. Cada componente estructural del coral; desde la capa de mucus hasta el esqueleto de carbonato de calcio, puede influenciar la propagación de la luz a través del coral, hasta que esta alcanza el simbiote (Wangpraseurt et al., 2014). Así pues, la luz pueda ser dispersada, absorbida o re emitida como fluorescencia por varios componentes del coral y los simbioses (Enríquez et al., 2005; Kaniewska et al., 2011; Salih et al., 2000).

El coral produce un esqueleto de tipo extracelular altamente reflectivo que mejora el campo lumínico que percibe *Symbiodinium* spp. e incrementa su absorción (Enríquez et al., 2005). La microestructura del esqueleto crea un esparcimiento múltiple de la luz, que resulta en niveles de 3-20 veces más luz dentro del coral que dentro de la columna de agua adyacente (Kuhl et al., 1995; Enriquez et al., 2005; Marcelino et al., 2013). Si los fotones no son absorbidos por el coral o sus simbioses como luz incidente, el esqueleto dispersa la luz como reflectancia difusa y da mayor oportunidad a que estos sean absorbidos posteriormente.

La alta irradiancia solar que se presenta a poca profundidad, requiere que en la simbiosis exista un equilibrio entre el mantenimiento de las altas tasas de fotosíntesis y la fotoprotección ante el exceso de radiación visible y ultravioleta (Fleischmann, 1989), las cuales pueden ser notablemente perjudiciales para los organismos fotosintéticos y sus hospederos. Debido a la naturaleza altamente dinámica de la luz solar, el aparato fotosintético a veces recibe más luz de la que puede ser procesada a través de la fotoquímica y el exceso de luz debe ser desviado de la asimilación de carbono utilizando otras vías para minimizar el daño fotooxidativo (Müller et al., 2001). La energía de excitación absorbida puede también luego ser re-emitida como fluorescencia de la clorofila, disipada como calor, a lo que se denomina rendimiento no fotoquímico (NPQ, por sus siglas en inglés) ó degradada a través del triple estado de la clorofila en el cual son producidas las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) (Müller et al., 2001). Estos productos intermedios altamente reactivos y subproductos inevitablemente generados durante la fotosíntesis, pueden causar daño foto-oxidativo al aparato fotosintético (Niyogi, 1999). Si la tasa de daño excede la tasa de reparación, se producirá una reducción en la eficiencia fotosintética y la tasa máxima de fotosíntesis, lo cual es denominado fotoinhibición (Niyogi, 1999). El daño oxidativo puede disminuir el flujo de fotones, lo cual intensifica el problema a través del incremento en la producción de ROS. Consecuentemente, los organismos fotosintéticos tienen numerosas estrategias fotoprotectoras dentro de las que se encuentran; ajustar el tamaño del complejo colector de luz, capacidad fotosintética, y la capacidad NPQ.

Las tasas de las reacciones fotoquímicas son sensibles a cambios de temperatura, de la misma manera que las bajas temperaturas pueden causar desbalances de energía y sobre-excitación del fotosistema II (Huner et al., 1998). Adicionalmente, los incrementos de temperatura pueden cambiar la tasa de reparación de las proteínas fotosintéticas y por ende afectar la salida de energía desde el aparato fotosintético (Takahashi et al., 2004; M. E. Warner et al., 1999). Los cambios en la temperatura también pueden generar perturbaciones en la fluidez de la membrana

y disminuir la salida de energía a través del aparato fotosintético mediante el desacoplamiento de la transducción de energía fotosintética y la reducción en la asimilación del carbono de los fotones que no son captados y generar consecuentemente una disminución en la producción de ATP (Tchernov et al., 2004). Otros procesos fotoprotectores incluyen fotorespiración, el ciclo agua-agua de la fotosíntesis, los sistemas antioxidante, y la síntesis y reparación de proteínas (Niyogi, 1999). Los organismos fotosintéticos balancean la luz que entra y excita el aparato fotosintético para maximizar la fotosíntesis bajo las condiciones en las que el organismo vive previniendo el daño oxidativo. En cuanto a la radiación ultravioleta, la más común y mejor conocida respuesta fotoprotectora está caracterizada por la producción de compuestos absorbentes a esta longitud de onda (100 – 400 nm), conocidos como *aminoácidos tipo micosporina* (MAAs), los cuales han sido caracterizados tanto en hospederos (Ito y Hirata, 1977; Dunlap et al., 1986; Stochaj et al., 1994; Dunlap y Shick, 1998) como en simbioses (Banaszak y Trench, 1995; Lesser, 1996; Banaszak et al., 2000; Banaszak et al., 2006).

El aparato fotosintético es una máquina molecular flexible que es altamente conservada entre eucariotas (Eberhard et al., 2008; Falkowski and Raven, 2007). Sin embargo, la fotosíntesis de *Symbiodinium* ocurre dentro de una célula animal creando complejidades adicionales. Durante el día, *Symbiodinium* spp. genera altas cantidades de oxígeno como un producto de la fotosíntesis. A pesar de que el coral absorbe el oxígeno durante la respiración, la célula coralina se vuelve hiperóxica e incluso puede producir burbujas de oxígeno (Crossland and Barnes, 1977; D'Aoust et al., 1976; Kuhl et al., 1995). El exceso de oxígeno hace que tanto el coral como su simbiote sean susceptibles al estrés oxidativo (Lesser, 2006).

La ventaja para el simbiote es múltiple y ha sido convencionalmente explicada en términos de un ambiente estable, protegido y definido para el alga, y una fuente de carbono utilizada en su fotosíntesis (aunque también puede ser adquirido en una mínima proporción del bicarbonato del agua de mar (HCO_3) y convertido a CO_2 por

acción catalítica de la enzima anhidrasa carbónica, lo cual explica su existencia en vida libre), además de nitratos, fosfatos y otros nutrientes inorgánicos que las algas necesitan para crecer (Weis, 1991). Gracias a un estricto reciclaje de nutrientes, todos los productos de desecho de los corales son utilizados por las algas, en lugar de dispersarse en el agua (i.e. las algas absorben el amonio emitido como desecho por los pólipos en la matriz orgánica y brindan aminoácidos en retorno). A través de este intercambio, el coral ahorra energía que de otra manera necesitaría para eliminar el dióxido de carbono y el amonio como desecho metabólico (Wang y Douglas, 1998).

Recientemente, se ha demostrado que la persistencia en espacio y tiempo de ciertas asociaciones simbióticas depende de factores relacionados con la especificidad tanto del simbiote como del hospedero, la variación estacional y la historia ambiental de ambas partes (Baums et al., 2014; Csaszar et al., 2010; Thornhill et al., 2014). Esta última, ha jugado un papel determinante en la ruptura de tal asociación, dada la intensidad del calentamiento global (Hoegh-Guldberg y Jones, 1999; Anthony et al., 2008; Wolff et al., 2015), desencadenando un evento conocido como blanqueamiento. Este es un término que se ha acuñado coloquialmente al descoloramiento del tejido del coral, donde este se vuelve traslúcido y revela el esqueleto de carbonato de calcio subyacente (Glynn, 1993; 1984). Esta respuesta está caracterizada por la pérdida progresiva del *Symbiodinium* spp. que habita los tejidos del coral y la fotoinhibición severa de los simbioses que quedan restantes (Jones et al., 1998; Smith et al., 2005).

Las explicaciones al proceso de fotoinhibición postuladas para *Symbiodinium* spp. (Iglesias-Prieto et al., 1992; Fitt y Warner, 1995; Warner et al., 1996; Jones et al., 1998), indican que una gran cantidad de luz puede limitar la adquisición y asimilación de CO₂, dado que la tasa de excitación (captura de luz) excede la tasa de utilización de luz en la fotosíntesis. Algo del exceso de esta energía puede disiparse como calor a través de la conversión de la xantófila diadinoxantina a diatoxantina (Brown et al., 1999; Venn et al., 2006), pero la energía remanente es

transferida al oxígeno causando un aumento de ROS. En circunstancias normales el impacto de estas especies es minimizado por la actividad de enzimas catalizadoras de ROS, sin embargo, cuando existe una sobreproducción asociada a la gran cantidad de energía en el sistema, las proteínas se desnaturalizan y el aparato fotosintético se destruye.

El potencial de los corales para resistir y recuperarse a eventos de blanqueamiento es una cuestión que ha sido objeto de debate intenso durante los últimos años. Mientras que el coral mismo puede estar sometido a cierto grado de aclimatación para limitar el estrés (Berkelmans y Willis, 1999), gran atención ha sido enfocada en la diversidad simbiótica. Se ha inferido que a través de ésta se puede determinar qué tan susceptible o resiliente resultaría ser un coral (Baker, 2003). La diversidad de simbioses ha ayudado a explicar por qué algunas colonias de coral son más propensas al blanqueamiento que otras y, en casos donde el blanqueamiento se ha dado por parches dentro de una misma colonia, atribuirlo a la existencia de múltiples tipos de algas en diferentes proporciones. (Warner et al., 2006; Green et al., 2014; Kemp et al., 2014; Bongaerts et al., 2015).

Antecedentes

Algunos simbiosomas se asocian con un amplio rango de hospederos, mientras que otros exhiben asociaciones específicas en un ambiente y locación geográfica determinada (LaJeunesse et al., 2010). En el Caribe, un ejemplo concreto de esta especificidad se da con el coral cuerno de alce, *Acropora palmata* (LaJeunesse, 2002). Su morfología ramificada, alta tasa de crecimiento y formación de un denso esqueleto basal, son factores que en conjunto hacen que este coral se constituya como uno de los mayores constructores de arrecifes de coral en el Caribe (Darwin y Stoddart, 1962; Milliman, 1969; Bruckner, 2002;). *A. palmata* es la única especie de coral escleractíneo del caribe que puede crecer exitosamente en la cresta del arrecife y arrecifes poco profundos expuestos y protegidos. La estructura tridimensional creada por los soportes de la ramificación de *A. palmata* desempeña un papel de gran importancia en la moderación de la fuerza de las olas entrantes, y por lo tanto, el entorno de arrecifes de poca profundidad es adecuado para el crecimiento de muchas otras especies (Reyes-Bonilla y Jordán-Dahlgren, 2017).

Un análisis de la respuesta del coral *Acropora palmata*, expuesto a un aumento de temperatura (+3 °C) durante dos días por Desalvo et al., (2010), reveló que este presenta una alta sensibilidad al aumento de temperatura, dada las reducciones del número de simbiosomas de entre el 50% y 70% tras 24 y 48 horas de calentamiento respectivamente. Por su parte Fitt et al. (2000), llevaron a cabo el primer monitoreo estacional de dinoflagelados simbióticos de *Acropora palmata* durante un lapso de 4 años a distintas profundidades en las Bahamas, encontrando que valores menores en número de simbiosomas y densidad de clorofila *a* son característicos de los períodos de más calor en verano y otoño, mientras que una mayor cantidad de simbiosomas y densidad de pigmento ocurre durante el invierno. Paralelamente identificaron que una mayor biomasa de tejido es alcanzada durante la primavera, lo que implica la existencia de una relación funcional entre estos parámetros y el crecimiento del coral. Estos resultados llevaron a inferir que estos regímenes de cambio son impulsados por cambios

estacionales en la luz y temperatura que perciben los holobiontes. Más aun, al hacer una comparación entre corales de aguas someras (1-4 m) y de mayor profundidad (13 m), los autores determinaron que existían valores mayores en todos los parámetros medidos para los más profundos, excepto en la densidad de clorofila *a* cuya tendencia fue la opuesta, haciendo referencia a que en cuanto mayor sea la profundidad y por ende menor la incidencia de luz, menor será la densidad de pigmento. A pesar de esta distinción, todos los corales monitoreados sin importar su profundidad exhibieron blanqueamiento durante el verano de cada año, lo cual fue cuantificado a través de las determinaciones de densidad de simbiontes, contenido de pigmentos y biomasa del tejido coralino.

Por su parte, Scheufen et al., (2017), caracterizaron dos diferentes fenotipos en corales constructores arrecifales en función de la variabilidad estacional al estrés térmico, estos fueron denominados como holobiontes de verano e invierno. Los primeros, caracterizados por presentar una baja pigmentación y alta productividad, pero mayor disposición a la pérdida de actividad fotosintética en condiciones de estrés térmico y los holobiontes de invierno caracterizados por una alta pigmentación y con una alta capacidad de fotoaclimatación a la predisposición de estrés térmico seguida del estrés lumínico. Este estudio resalta la importancia de la respuesta de fotoaclimatación a alta luminosidad del *Symbiodinium* spp., si se busca determinar la susceptibilidad del holobionte al estrés térmico, en vez de basarla exclusivamente en la variabilidad genética y funcional de la población simbiótica, con cuyo enfoque se han abordado estudios previos.

Algunos estudios como los realizados por Lundgren and Hillis-Starr, (2008) y Miller et al., (2011), que buscaron caracterizar la respuesta de *Acropora palmata* frente al estrés térmico, utilizan metodologías basadas en fotografías digitales y escalas visuales. Este tipo de información, resulta poco relevante si se tienen en cuenta las diferentes intensidades de pérdida de color que los corales pueden llegar a presentar durante el estrés térmico (unos con mayor o menor pigmentación). El blanqueamiento visual como indicador del límite térmico de un coral, es un

concepto artificial y arbitrario, ya que la mayoría de corales que experimentan un estrés fisiológico, reducen la biomasa de su tejido y pierden la mitad o más de sus simbiontes para el momento en que los humanos son capaces de detectar una coloración más clara (Fitt et al., 2001; Scheufen et al., 2017). Más aun, la situación opuesta también se ha presentado en ocasiones donde el blanqueamiento ha sido categorizado visualmente como severo, describiendo colonias como blancas o casi blancas, mientras el coral aun retenía entre el 20–50% de su población de simbiontes original (Porter et al., 1989; Brown et al., 1995).

Por su parte, Thornhill et al., (2006), examinaron la identidad genética del *Symbiodinium* spp. presente en *Acropora palmata*, al norte del mar Caribe durante cinco años. Los simbiontes fueron identificados a través de la genotipificación del espaciador transcrito interno de la región 2 (ITS2) del ARN ribosomal, mostrando que no existe ninguna diferencia en el simbionte dominante de *Acropora palmata*, cuya simbiosis fue siempre con *Symbiodinium* del tipo A3 (denominado tentativamente *Symbiodinium "fitti", nomen nudum*), a pesar del hecho que las larvas tengan que adquirir el simbionte del ambiente. Este patrón de estabilidad persistió en los corales analizados tras el evento de blanqueamiento masivo ocurrido entre 1997 – 1998 y posteriormente hasta el 2004. Dentro de las posibles opciones que ayudan a explicar tal estabilidad, los autores resaltan que la fuente de variación de esta asociación podría tener su origen en un nivel filogenético más bajo que el clado (intraespecifico) para *Symbiodinium* spp., estando esta modulada por las diferencias físicas en el ambiente.

Una variación en la respuesta al estrés observada entre colonias adyacentes de la misma especie de coral albergando el mismo tipo de *Symbiodinium* spp. (Csaszar et al., 2010; LaJeunesse et al., 2010) ha sugerido que la variación en la respuesta al estrés a nivel de subespecie existe. De aquí que el desarrollo y análisis de marcadores microsatélites de genética de poblaciones de mayor resolución, ha sido establecido como una herramienta fundamental para la exploración de tal

diversidad (Andras et al., 2011; Pettay et al., 2011; Pinzón et al., 2011; Thornhill et al., 2014), con consecuencias potencialmente funcionales.

De una manera mas amplia, Baums et al., 2014, manifiestan que los emparejamientos de únicos genotipos huésped-simbionte producen holobiontes que pueden, exhibir distintas combinaciones fenotípicas. Con el propósito de caracterizar la diversidad funcional que puede llegar a existir entre estos únicos emparejamientos holobionticos entre *Acropora palmata* y *Symbiodinium "fitti"*, Parkinson et al. (2015) identificaron a través del uso de marcadores microsatélites, seis colonias genotípicamente distintas del hospedero que compartían todas la misma cepa clonal del simbiote, que posteriormente serían expuestas a un choque de temperatura frio (20 °C). Encontrando, que el cambio en la presión de excitación sobre el fotosistema II (Q_m) originado por el estrés térmico exhibido por el simbiote, tuvo una variación de hasta 3.6 veces, según la identidad genética del hospedero. Postulando, que el genotipo del hospedero determinaría la respuesta fotoquímica del residente simbiótico bajo tal condición de estrés, dado el carácter monoespecífico de tal asociación.

Se ha asumido que las ventajas fisiológicas alcanzadas por la asociación con simbiotes funcionalmente diversos solamente están disponibles para los corales que forman asociaciones con múltiples clados de simbiotes, pasando por alto la variabilidad funcional que existe entre poblaciones del mismo clado de *Symbiodinium*. Aunque Howells et al. (2011), buscaron ligar la tolerancia térmica presentada por el coral *Acropora tenuis* a la identidad genética del simbiote, su trabajo carece de rigor metodológico, pues hay varias suposiciones que no debieron haberse pasado por alto, como la particularidad de haber trabajado con juveniles en vez de adultos sin considerar la expresión diferencial de genes entre los dos estadios, la obtención de los dos grupos de simbiotes en dos arrecifes diferentes y los juveniles en un tercer arrecife y la diversidad microbiana asociada a cada ambiente, donde además ha de tenerse en cuenta que un control estricto

de parámetros fisicoquímicos distintos a la temperatura, no pudo ser asegurado para cada locación, previo a su experimento.

Acropora palmata es un coral que se caracteriza por liberar gametos aposimbióticos al medio exterior, por lo que las células de *S. fitti*, deben ser adquiridas del ambiente en cada generación. Ya maduro, dentro de los tejidos del coral, el simbionte haploide tiene un modo de propagación principalmente asexual a través de división celular, lo que implica que cada coral puede ser visto como un medio de cultivo para cada cepa particular de *S. fitti* (Parkinson y Baums, 2014).

En el arrecife de Puerto Morelos, se ha determinado la diversidad y especificidad de las poblaciones de *Symbiodinium fitti* en las poblaciones de *Acropora palmata*, utilizando genotipos multilocus a través de microsatélites polimórficos (Gómez-Campo, datos sin publicar). Para *S. fitti* concretamente, se han identificado trece microsatélites polimórficos con motivos di, tri y tetranucleótido (ANEXO 1). Diez de estos fueron caracterizados por Pinzón et al., (2011) y tres por Baums et al., (2014), siendo extraídos de poblaciones de *A. palmata* en el caribe y *Tridacna máxima* en el indopacífico, cuyo polimorfismo tiene una variación de tres a ocho alelos para cada locus haploide. El éxito de estos marcadores como herramientas versátiles y accesibles para estudios de genética de poblaciones se debe a la naturaleza polimórfica de la matriz de loci que se logra al utilizar múltiples microsatélites, donde los cambios de longitud, se pueden detectar fácilmente mediante electroforesis en gel, marcando las variantes únicas (es decir, alelos). Usualmente las muestras que presentan el mismo genotipo en todos los loci empleados (en este caso diez, para *S. fitti*), a lo que se denomina genotipo multilocus, se consideran clones que pertenecen al mismo individuo genético (cepa) (Arnaud-Haond et al., 2007; Baums et al., 2014).

II. HIPÓTESIS

Las propiedades espectroscópicas del coral *Acropora palmata* y los descriptores fotoquímicos y ópticos de su asociado simbiote, *Symbiodinium fitti*, van a presentar una respuesta diferencial a lo largo de un evento de estrés térmico.

- i. Las propiedades espectroscópicas del coral, (capacidad y eficiencia de absorción de luz), se verán afectados de forma negativa durante y después de un evento de estrés térmico.
- ii. Los descriptores fotoquímicos del simbiote como cantidad celular y densidad de pigmento van a ser afectados de forma diferencial durante y después de un evento de estrés.
- iii. La presión de excitación sobre el fotosistema II (Q_m), de fragmentos provenientes de colonias clonales de *A. palmata* pero con cuatro diferentes cepas de *S. fitti* genotipificados (MLGs) previamente (Gómez-Campo, datos sin publicar) va a ser variable una vez que estas son sometidas como producto del estrés térmico.

III. OBJETIVOS

General

Describir algunas respuestas al estrés que presenta el holobionte *Acropora palmata* - *Symbiodinium fitti* al ser sometido a un aumento de temperatura.

Específicos

- Realizar una caracterización de los descriptores fotoquímicos y ópticos de *Symbiodinium fitti* y las propiedades espectroscópicas que presenta *A. palmata* en corales recién extraídos de su medio natural.
- Evaluar cambios en la fotoquímica, así como, en la capacidad y eficiencia de absorción de luz a partir de la determinación de las propiedades ópticas *in hospite* del dinoflagelado *Symbiodinium fitti* en el coral *Acropora palmata* durante y después del aumento de temperatura, respecto a los valores que presenten los corales recién extraídos de su medio natural.
- Comparar el desempeño funcional *in hospite* mediante el seguimiento diario de la presión de excitación sobre el fotosistema II (Q_m), de cuatro morfotipos diferentes de *S. fitti* (previamente identificados genéticamente) sometidos a un aumento de temperatura.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

La parte norte del Sistema Arrecifal Mesoamericano en el Caribe Mexicano, es un área mixta formada por arrecifes bordeantes y de barrera caracterizados por la presencia de comunidades coralinas dominadas por *Acropora palmata*, específicamente en sus crestas arrecifales (Jordan-Dahlgren, 1993).

La cresta arrecifal donde se llevó a cabo el presente estudio, se encuentra localizada a los 20°59'18.711" latitud norte y 86°47'49.5054" longitud oeste, en la localidad conocida como Unidad Arrecifal "Limonos" (Fig. 1). En este sitio se cuenta con un registro de colonias marcadas de *Acropora palmata*, las cuales en una investigación previa (Gómez-Campo, 2015), habían sido genotípificadas a nivel de subespecie, situación que ha permitido determinar la estructura poblacional que presenta tanto el coral como su simbiote *Symbiodinium fitti* (Gómez-Campo, datos sin publicar), en el área.



Figura. 1. Ubicación del sitio de estudio. Unidad Arrecifal "Limonos" al Norte del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos (Modificado de Google Earth, 2015).

Colección de fragmentos y condiciones experimentales

Teniendo en cuenta el registro previamente descrito y usando parcelas con coordenadas polares, basadas en áreas concéntricas con un radio de 15 m, se seleccionaron cuatro colonias clonales de *A. palmata*, cada una con una cepa de *Symbiodinium fitti* distinta, cuya profundidad no excedió ~1.5 m bajo la columna de agua. Mediante buceo autónomo y con la ayuda de pinzas pico de loro, fragmentos de aproximadamente 5 cm² fueron colectados y dispuestos en bolsas herméticas con abundante agua de mar, para luego ser transportados hasta la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en Puerto Morelos. Allí fueron ubicados, haciendo distinciones por cepas (Fig. 2), en estanques rectangulares con capacidad volumétrica de 380 litros, con un flujo de agua de mar constante de 1,4 L min⁻¹ y oscurecidos con capas de malla de polipropileno negro para remover por lo menos hasta un 50% de las condiciones de iluminación naturales. Aunque la primera parte del trabajo se presenta como un reporte general sobre la respuesta del organismo al estrés térmico (Resultados: PARTE I y PARTE II), esta distinción fue fundamental para llevar a cabo la caracterización de la variación de la respuesta fotosintética que se describe en el tercer objetivo específico (Resultados: PARTE III).

El experimento se llevó a cabo en condiciones de verano, durante días soleados con coberturas de nubes intermitentes. Además de la temperatura, parámetros como el pH y la irradiancia superficial fueron monitoreados diariamente, cada 5 minutos durante los 38 días de experimento, mediante termógrafos HOBO[®] data loggers, sondas multiparamétricas y sensores Odyssey[®] PAR loggers, respectivamente. Dada la variabilidad en el campo de luz a la cual estuvieron sujetos los organismos como producto de la ubicación espacial de los estanques respecto a la incidencia de luz solar en Puerto Morelos durante el día, los organismos fueron mantenidos bajo un sistema de rotación diaria basado en un diseño por bloques (Fig. 2).

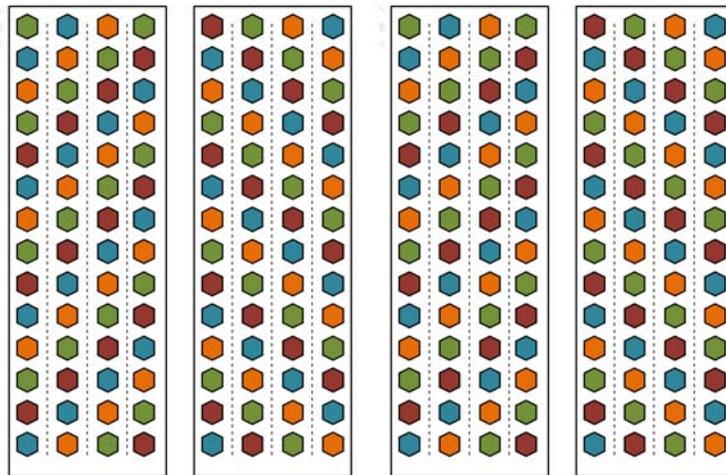


Figura 2. Disposición de los organismos en los estanques utilizados durante el experimento. Los cuatro colores representan una identidad genética distinta del simbionte.

Todos los organismos cumplieron con un periodo de aclimatación de 14 días, que se estimó teniendo en cuenta que los valores del parámetro F_v/F_m (descrito más adelante en la sección de determinaciones de fluorescencia), fueran constantes entre ellos y no presentasen diferencias significativas respecto a los naturales.

Posteriormente, la mitad de estos, fueron sometidos a un aumento de temperatura de 3° C aproximadamente, que se llevó a cabo de forma gradual a lo largo la noche, y cuyo propósito fue evitar la interacción de la temperatura y la luz durante el día, como factores sinérgicos de estrés en el coral. El límite de temperatura fue establecido de acuerdo a los registros de tolerancia térmica documentados previamente para *Acropora palmata* (Randall y Szmant, 2009).

De 9-12 organismos fueron dispuestos por cada estanque y lapso de tiempo, en una línea temporal establecida como subsigue: 1) mediciones naturales (0Nat) ; 2) 14 días de aclimatación en estanques (14Acl); 3) 14 días de aumento de temperatura (21T); 4) siete días de recuperación (38Rec). Los días de recuperación fueron estimados teniendo en cuenta el mismo criterio respecto a los valores de F_v/F_m , que para el periodo de aclimatación.

Con el propósito de evaluar la dinámica de la variación en los parámetros fisiológicos que en el siguiente aparte se describen, se realizaron mediciones en cada una de estas etapas, describiendo adicionalmente una muestra intermedia durante el estrés térmico (28T+).

La ausencia de diferencias en los parámetros revisados que a continuación se describen, entre los organismos control en los estanques y los mismos en su condición natural, indica que ni el régimen lumínico ni el pH, ni la temperatura ambiental, fueran factores que indujera una respuesta determinante sobre el resultado del experimento.

Evaluación de Parámetros Fisiológicos

Determinaciones de Fluorescencia

- Eficiencia Fotoquímica Máxima (F_v/F_m) y Presión de Excitación sobre el Fotosistema II (Q_m).

La medición de la señal de la fluorescencia de la clorofila *a*, se considera como un método no invasivo que se usa para hacer un seguimiento de la actividad fotosintética y su evolución en el tiempo, comprobando la cantidad de fotodaño y fotoprotección que contribuye a la variabilidad de la eficiencia fotoquímica del fotosistema II en organismos fotosintéticos.

El parámetro F_v/F_m es un descriptor de la eficiencia máxima del fotosistema II para transformar químicamente la energía lumínica que llega a los centros de reacción, el cual es calculado según los criterios que se describen a continuación. Dado que en oscuridad los centros de reacción se encuentran abiertos u oxidados, se puede determinar una fluorescencia mínima (F_0) por medio de un tenue estímulo que es insuficiente para producir cualquier reacción en el fotosistema II. Una vez se suministra un pulso de luz saturante ($> 5000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con una duración de, por ejemplo, 0.8 segundos, se produce una reducción de los centros

de reacción, que promueven una fluorescencia máxima en el sistema (F_m). F_v va a ser igual a la diferencia del valor de la fluorescencia máxima en el sistema (F_m), respecto a la fluorescencia mínima (F_0).

Por otra parte, bajo ciertas condiciones de luz -en este caso el medio día solar-, la fluorescencia normal que presente el organismo según el estado de sus centros de reacción se define como (F), mientras que la fluorescencia máxima que puede exhibir el mismo organismo fotoadaptado a las mismas condiciones tras un pulso de luz saturante, es denominada como el rendimiento máximo de la fluorescencia (F'_m). ΔF va a ser igual a la diferencia del valor (F'_m), respecto al valor de (F).

La eficiencia fotoquímica máxima (F_v/F_m) y la eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F'_m$) fueron evaluadas diariamente, durante el medio día solar (± 20 min) y el anochecer astronómico (+15 min) respectivamente, usando un fluorómetro sumergible de amplitud modulada (Diving-PAM, WALZ GmbH, Effeltrich, Alemania). A partir de estos dos parámetros, se determinó la máxima presión de excitación sobre el fotosistema II, definida por Iglesias-Prieto et al., (2004) como:

$$Q_m = 1 - [(\Delta F/F'_m)/(F_v/F_m)]$$

Que es igual a la máxima reducción dependiente de luz al medio día en días despejados relativa a su máximo al anochecer, donde se suprime la influencia de las fluctuaciones diarias en la radiación solar entre días despejados y nublados del factor que se está evaluando (en este caso la temperatura). Este coeficiente abarca desde 0, donde los procesos fotoquímicos son limitados por luz a 1, que indica completa foto inhibición. Generalmente, efectos negativos sobre la eficiencia fotoquímica efectiva del fotosistema II empiezan a ser observados con valores de presión mayores a 0.6. (R. Iglesias-Prieto, comunicación personal).

Determinación de las Propiedades Espectroscópicas del Coral

– Reflectancia y Estimación de la Absorptancia

Se efectuaron determinaciones de reflectancia (R) en la región visible del espectro electromagnético, entre 400 y 700 nm con una resolución de 0,3 nm, como fue establecido por Enríquez et al. (2005). Al igual que las determinaciones de fluorescencia, este es un método no invasivo, donde los organismos fueron sumergidos en agua de mar en un contenedor de plástico con fondo negro, al mismo tiempo que una fuente de iluminación homogénea fue proveída por una lámpara de luz incandescente ubicada a ~15 cm sobre la superficie del tejido. La porción de luz reflejada fue colectada por una fibra óptica (300 μm^2) colocada bajo el agua a ~1 cm de distancia del organismo, también en un ángulo de 45° con respecto a su superficie y adyacentes a la fuente de luz conectada a un espectrómetro (USB2000+ Ocean Optics). Los datos fueron capturados mediante el software SpectraSuite 2.0[®]. La reflectancia fue expresada como la proporción de la radiancia obtenida de la superficie de los fragmentos en relación con la radiancia de una superficie blanca difusora, que en este caso fue un esqueleto blanqueado e inerte del mismo coral.

La calidad de los espectros obtenidos fue verificada con el valor registrado a 750 nm, buscando que este se encontrara por encima del 90%. Este valor fue usado como referencia dado que a esta longitud de onda la absorción de luz por pigmentos u otras partes del organismo es muy reducida y un aumento o disminución en su valor evidencia pérdidas de luz debidas a dispersión residual. El resultado de estas determinaciones fue transformado siguiendo la relación $D_e = \log(1/R)$, de acuerdo a lo establecido por Shibata, (1969) y Enríquez et al. (2005).

La capacidad de absorción de luz en los organismos, absorptancia (A), fue calculada empleando la ecuación:

$$A = 1-R$$

donde R es la reflectancia medida, dado que la transmitancia a través de los esqueletos de coral es despreciable (Vásquez-Elizondo et al., 2017).

Determinaciones ópticas

Durante cada una de las fases del experimento mencionadas previamente se sustrajeron de 9-12 organismos del experimento por vez.

El tejido de cada uno de estos, fue extraído con agua de mar filtrada (0.45 μm) y enfriada que fue propulsada a presión por un aerógrafo comercial de acción doble (Paasche, USA). El blastato resultante fue uniformizado con un homogeneizador de tejidos, sometido a vortex y centrifugado a 5000 rpm durante 5 minutos. El precipitado resultante fue resuspendido en 3 ml de agua de mar y dividido en dos porciones para determinar su densidad de simbioses y contenido de pigmentos (Shirur et al., 2014).

– Número de Simbioses

Alícuotas de 1 ml de las suspensiones obtenidas, fueron fijadas en 40 μl de solución de Lugol. Conteos por repetición de cada alícuota fueron realizados mediante un microscopio compuesto, usando un hemocitómetro (Bright-Line, USA) de 0.1 mm de profundidad, con dos cámaras de Neubauer mejoradas; cada una con un arreglo “tipo 3x3” de nueve cuadrados de 1 mm^2 . De 8-10 conteos fueron realizados en cada cámara por cada alícuota, teniendo en cuenta que un número constante de células fuera alcanzado por muestra (distribución Poisson).

Cada cámara cuenta con un área total de 500 mm^2 y una capacidad volumétrica de 0.05 ml, si se tiene en cuenta que la profundidad del hemocitómetro es de 0.1 mm. Dado lo anterior, si el número promedio de células en un mililitro es Q , entonces la densidad d , de una suspensión en la cámara va a estar dado por la relación:

$$d = 10^4 \times Q \text{ células} \cdot \text{ml}^{-1}$$

– Densidad de clorofila *a*

Con la porción restante del precipitado, se realizaron extracciones de clorofila basadas en el método que a continuación se describe. Cada muestra fue dispuesta en un tubo de 1.5 ml (eppendorf®, USA), homogenizada mediante vortex y luego centrifugada con un pulso de 13000 rpm, para luego descartar el sobrenadante. El precipitado resultante fue centrifugado por el mismo tiempo y revoluciones, con 1 ml de agua destilada para eliminar sales y residuos y luego fue secado con pequeños trozos de papel. En ausencia de luz, 50 μ L de DMSO fueron agregados y homogenizados con la muestra. Posteriormente, se agregó 950 μ L de acetona a 4 °C, y se centrifugó con un pulso a 13000 rpm. (Iglesias-Prieto et al., 1992). Cada tubo se envolvió en papel aluminio para protegerle de la incidencia de luz y se almacenó durante 24 horas a 4 °C. Al cabo de este tiempo, cada tubo se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones para homogenizar su contenido.

Las determinaciones de absorbancia se realizaron usando un espectroradiómetro (USB4000+ Ocean Optics) conectado a un montaje de un porta-cubetas a través de sondas de fibra óptica (300 μ m²). El contenido de la muestra se dispuso en una cubeta de cuarzo de 1 cm², que fue colocada en el porta-cubetas. La concentración de clorofila *a* se determinó por medio de las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975).

El número de simbioses y concentración de clorofila *a* fue normalizado en relación al área superficial del organismo, la cual fue determinada mediante el método del papel aluminio (Marsh, 1970).

Coeficiente específico de absorción de la clorofila *a*, *a**

La eficiencia de absorción de luz se cuantificó usando como descriptor el coeficiente específico de absorción de la clorofila *a*, ($a^*_{680 \text{ nm}}$), a través de la relación:

$$a^* \text{ Chl } a = (D / \rho) \ln 10$$

donde *D* es la absorción de luz a determinada longitud de onda (680 nm puntualmente) y ρ es la sección transversal de pigmentos (mg m^{-2}), de acuerdo a lo establecido por Enríquez et al., (2005).

Dado que la clorofila *a* es un componente fundamental de los organismos que llevan a cabo la fotosíntesis, la estimación de su coeficiente específico de absorción es un indicador general cuantitativo que permite establecer comparaciones con otros organismos fotosintéticos (Vasquez-Elizondo et al., 2017).

Análisis Estadístico

Para aislar el efecto de la temperatura de cualquier otro posible factor que afectase el experimento, cada uno de los parámetros fue medido en organismos control que se mantuvieron en estanques bajo las mismas condiciones de pH y luz y cuya temperatura fue monitoreada para que no ascendiera por encima del óptimo fisiológico ($>28 \text{ }^\circ\text{C}$) y de esta manera poder realizar comparaciones en cada fase del experimento. Las comparaciones de los organismos control entre cada etapa del experimento (factores de comparación), se realizaron para cada parámetro a través de un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA).

Los promedios de cada parámetro determinado en organismos control y organismos tratamiento, por cada punto temporal fueron comparados por medio de un análisis de varianzas de dos vías (two-way ANOVA). Dado que existiera un efecto significativo del tratamiento, comparaciones entre factores de este análisis fueron sometidas a una prueba *post hoc* de comprobación de hipótesis múltiples

de Tukey con un intervalo de confianza del 95%. Diferencias estadísticas de $P < 0.05$ fueron tomados como significativas.

El análisis de los resultados para la comparación de la presión de excitación sobre el fotosistema II de las cuatro diferentes cepas de *S. fitti* (Resultados: PARTE III), se realizó a través de un análisis de varianza de dos vías (two-way ANOVA). La presentación gráfica de los resultados se hizo agrupando los datos por categorías que fueron rangos entre (0.3 – 0.4); (0.4 – 0.5); (0.5 – 0,6); (0.6 – 0.7).

V. RESULTADOS

PARTE I

Determinaciones ópticas y morfológicas en condiciones naturales

Los resultados descritos a continuación corresponden a las determinaciones de los parámetros fisiológicos revisados en este estudio que se hicieron a corales en su condición natural, previo a su disposición para el experimento (Tabla I).

Tabla I. Parámetros determinados para *Symbiodinium fitti* -in hospite- con *Acropora palmata* durante el verano en la barrera arrecifal de Puerto Morelos en Julio 2015. N = número de organismos medidos. Unidades de parámetros: densidad de clorofila a ($\text{mg Chl } a \text{ m}^{-2}$); densidad celular (células m^{-2}); concentración de clorofila a por célula ($\text{pg Chl } a \text{ célula}^{-1}$); coeficiente específico de absorción de la clorofila a ($\text{m}^2 \text{ mg Chl } a^{-1}$).

| Parámetro | Media | Desviación Estándar | Rango | N |
|-------------------------------|--------|---------------------|-----------------|-----|
| Eficiencia fotoquímica máxima | 0.595 | 0.047 | 0.484 ~ 0.749 | 173 |
| Absorptancia clorofila a | 0.880 | 0.086 | 0.715 ~ 0.952 | 160 |
| Absorptancia PAR | 0.796 | 0.058 | 0.590 ~ 0.897 | 160 |
| Densidad de clorofila a | 38.847 | 5.145 | 30.932 ~ 49.529 | 36 |

| | | | | |
|---|-------|-------|---------------|----|
| Densidad celular | 2.489 | 0.302 | 2.073 ~ 3.073 | 36 |
| Contenido de clorofila a por célula | 1.434 | 0.410 | 0.776 ~ 2.235 | 90 |
| Coefficiente específico de absorción de la clorofila a en el rojo | 0.026 | 0.005 | 0.018 ~ 0.035 | 90 |

PARTE II

Respuesta general del organismo. Efecto del estrés térmico sobre las propiedades ópticas de *A. palmata*

Condiciones Experimentales

Los valores máximos de irradiancia en superficie del lugar de colección de las muestras se encontraron cercanos a $1500 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que en los estanques donde se dispusieron los organismos, este valor no superó los $610 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ al medio día solar (40% del régimen lumínico de su hábitat natural).

La variación diurna de irradiancia fue integrada en un valor diario, presentando un valor promedio de $36.1 \pm 3.4 \text{ mol quanta m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ (Fig. 3A).

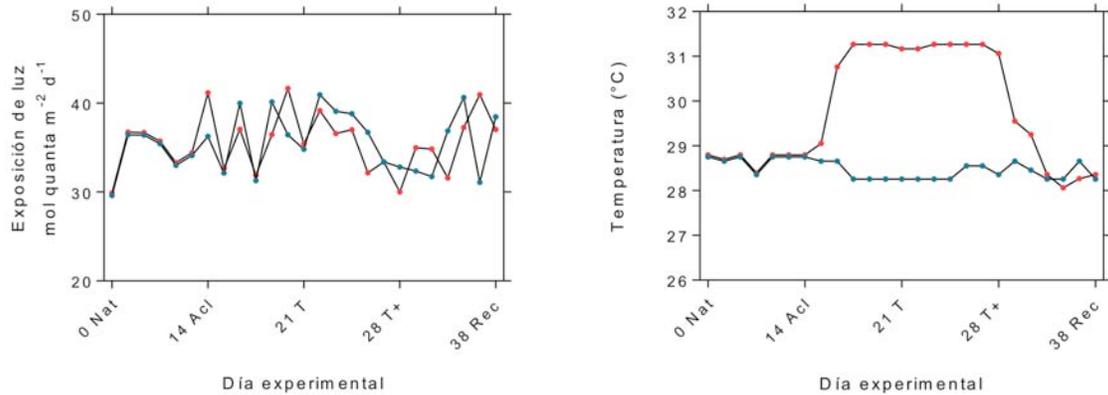


Figura 3. (A) Exposición de luz, y **(B)** Temperatura del agua bajo la cual estuvieron sometidos los organismos a lo largo del experimento. Puntos rojos indican el comportamiento de la luz en el estanque tratamiento y puntos azules para el estanque control.

El pH promedio fue de 8.04 ± 0.03 a lo largo del experimento, con valores mínimos y máximos de 8.01 y 8.08, respectivamente. La oscilación de la temperatura en los estanques control y tratamiento no superó los 0.2 y 0.5 °C, respectivamente (Fig. 3B).

Fluorescencia de la clorofila a

Eficiencia fotoquímica máxima (Fv/Fm)

El parámetro Fv/Fm presentó un valor promedio de 0.56 ± 0.04 (D.E.) para los organismos control (Fig. 4), y su variación no mostró diferencias significativas dentro de los mismos entre cada etapa del experimento ($P > 0.05$ ANOVA), lo que indica que las características del régimen lumínico bajo las que estuvieron los organismos, no fueron de la magnitud para interferir en el resultado del experimento, pero si lo suficiente para inducir una presión homogénea sobre su aparato fotosintético. Cuando la fotosíntesis trabaja más eficientemente, los valores de F_v/F_m medidos con el PAM, se encuentran típicamente en el rango de 0.50 - 0.70, valores por debajo de este rango indican una acumulación de fotodaño.

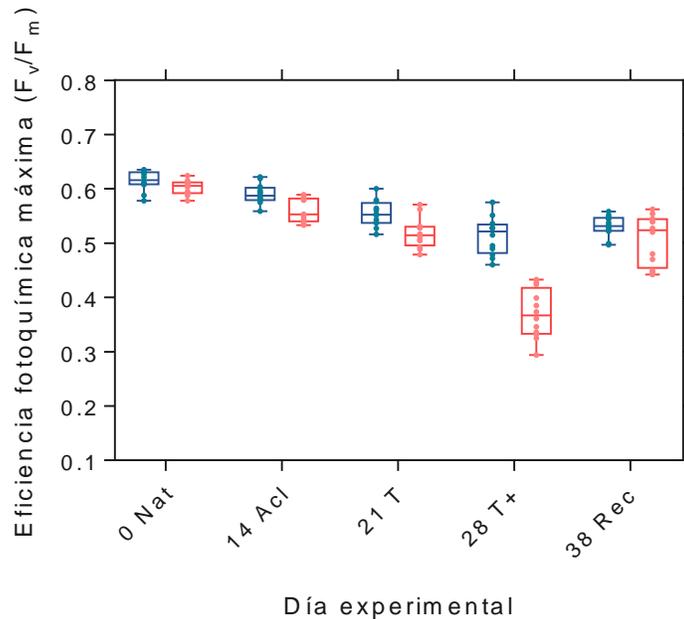


Figura 4. Eficiencia fotoquímica máxima (F_v/F_m). Comparación entre Control y Tratamiento. Cajas de color azul indican organismos control y cajas rojas indican organismos tratamiento temperatura. Líneas en mitad de cajas representan medias; puntos representan datos.

Por su parte, los organismos que fueron expuestos al incremento de temperatura presentaron un valor promedio de F_v/F_m de 0.44 ± 0.08 (D.E.). Una disminución en los valores de este parámetro empieza a ser notoria tras el primer día de calentamiento del agua, sin embargo, alcanza su valor más bajo durante los últimos días del estrés térmico (0.37 ± 0.04 (D.E.)).

Diferencias significativas fueron observadas en los organismos tratamiento entre las diferentes fases del experimento ($P < 0.05$ ANOVA 2 vías, Tukey post-hoc, $P < 0.05$) excepto entre la determinación natural respecto a la determinación aclimatación (0Nat vs. 14Acl Fig. 7) y de la primera parte del estrés térmico respecto a la recuperación (21T vs. 38Rec), esta última, en parte se puede atribuir a la alta variabilidad en la respuesta que exhibieron los organismos tras el estrés, en el momento de la recuperación (Mín.: 0.47, Máx.: 0.662).

El cálculo de la razón de cambio porcentual entre las etapas del experimento que presentaron diferencias indica que cuando han transcurrido 7 días en que los organismos se encuentran bajo una temperatura de 31° C, exhiben un ~14% más de acumulación de fotodaño que organismos a una temperatura control, y que éste puede alcanzar hasta un ~38% más cuando el calentamiento persiste durante 7 días más.

Presión de excitación sobre el fotosistema II (Q_m)

El parámetro Q_m , presenta una media para los organismos control de 0.38 ± 0.02 (D.E.) a lo largo del experimento (Fig. 5), donde no existieron diferencias significativas entre etapas ($P > 0.05$ ANOVA). Los organismos tratamiento exhibieron un pronunciado aumento en los valores de este parámetro como consecuencia de la temperatura, donde se presentaron diferencias significativas entre etapas ($P < 0.05$ ANOVA), mismas que se describen a continuación.

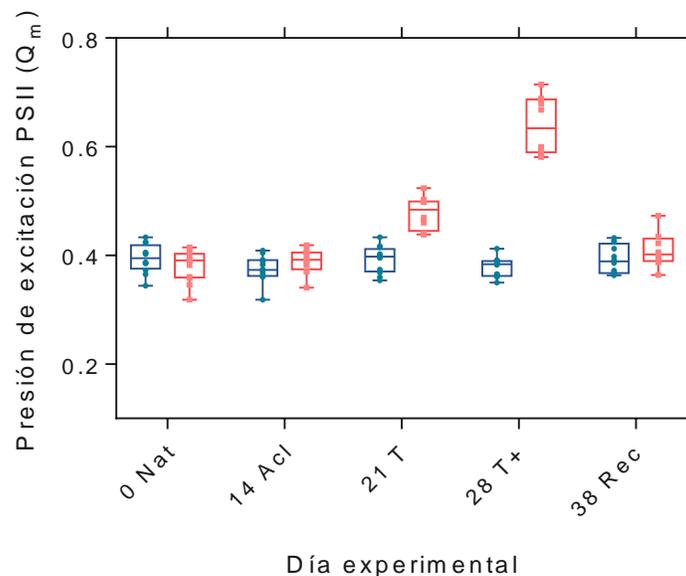


Figura 5. Variaciones dependientes de temperatura del parámetro Q_m , presión de excitación sobre el fotosistema II a lo largo del experimento. Cajas de color azul indican organismos control y cajas rojas indican organismos tratamiento temperatura. Líneas en mitad de cajas representan medias; puntos representan datos.

Las diferencias se presentaron para las etapas de aclimatación y primera parte del estrés térmico y aclimatación y segunda parte de estrés térmico (14Acl vs. 21T y 14Acl vs. 28T+) ($P < 0.05$ ANOVA 2 vías, Tukey post-hoc, $P < 0.05$), donde se presentaron presiones de excitación 0.48 ± 0.02 (D.E.) para la primera y 0.64 ± 0.05 (D.E.) para la segunda etapa del estrés térmico. No se encontraron diferencias significativas en el status de los organismos entre el momento de la aclimatación y la recuperación (Tukey post-hoc, $P > 0.05$).

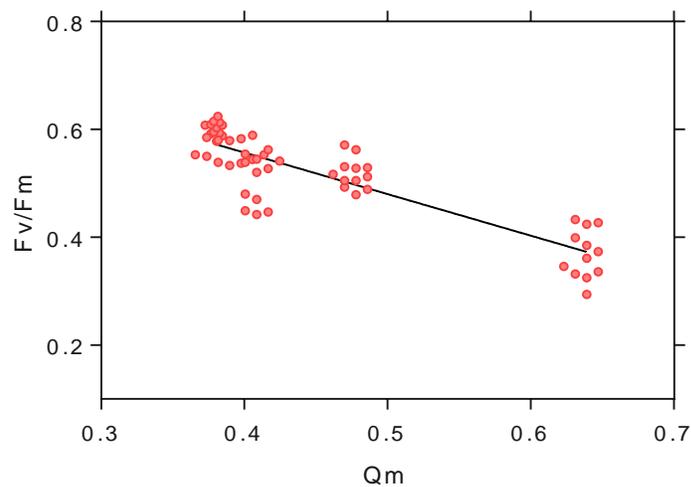


Figura 6. Asociación lineal entre las determinaciones de fluorescencia: eficiencia fotoquímica máxima y presión de excitación sobre el fotosistema II para los organismos control a lo largo del experimento ($R^2 = 0.7665$).

Un análisis de la asociación entre la eficiencia fotoquímica máxima y la presión de excitación sobre el fotosistema II ($R^2 = 0.7665$), revelaría que no se presenta una similitud en el comportamiento a lo largo del experimento entre estas dos variables (Fig. 6).

Propiedades ópticas del coral

Reflectancia, absorptancia y estimación de los espectros de absorción de luz de *A. palmata*

Una comparación inicial de los espectros de reflectancia a través de su transformación $\log(1/R)$ indica que la capacidad de absorción de luz de los

organismos dispuestos en los estanques varía en función del aumento temperatura. No se presentaron diferencias significativas entre los organismos control ($P > 0.05$ ANOVA), pero si para los organismos tratamiento entre todas las etapas diferentes del experimento, excepto entre los organismos de condición natural y los organismos aclimatados ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.05$). En la figura 7., se muestran los espectros de reflectancia (R) de las estructuras completas (simbiontes y esqueleto de carbonato) con diferentes densidades de clorofila, de manera que se pueda establecer una comparación entre las diferentes etapas del experimento. Los espectros se presentan con densidades de clorofila (resultados descritos dos apartes más adelante) para cada una de las siguientes etapas: Natural: 37.95 ± 5.05 mg Chl a m^{-2} ; Aclimatación: 32.14 ± 6.25 mg Chl a m^{-2} ; Primera parte del estrés térmico: 21.24 ± 6.03 mg Chl a m^{-2} ; Segunda parte del estrés térmico: 17.68 ± 4.32 mg Chl a m^{-2} .

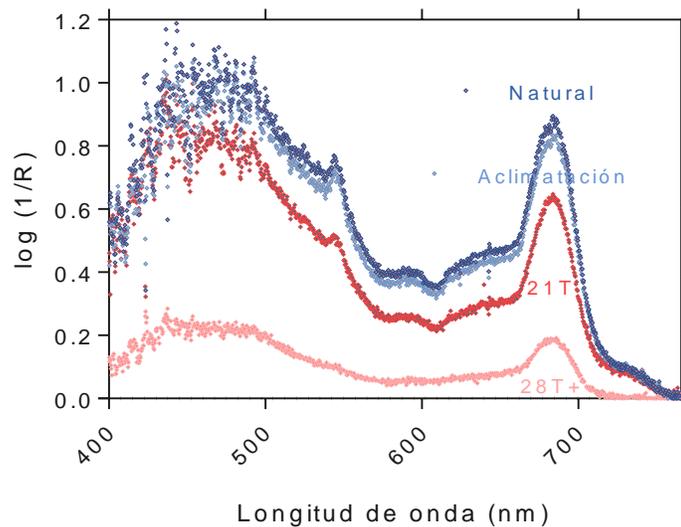


Figura 7. Espectro de reflectancia de luz por pigmentos para los organismos experimentales en cada fase del experimento transformado como $\log(1/R)$. Con letras del mismo color se señalan la condición o fase del experimento bajo la cual se encontraban.

Derivados de las determinaciones iniciales de reflectancia (R), los cálculos de la absorptancia (A) para la región PAR (Fig. 8A), presentaron un valor promedio de 0.768 ± 0.03 (D.E.) para los organismos control, donde no se presentaron

diferencias significativas a lo largo del experimento ($P > 0.05$ ANOVA). Los organismos tratamiento presentaron diferencias significativas únicamente entre las etapas de estrés térmico inicial, final y recuperación. La etapa de recuperación fue significativamente diferente a la muestra natural (0Nat vs. 38Rec), lo cual indica que, aunque hubo un aumento en este parámetro posterior al estrés, una recuperación total no fue posible ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.05$). Durante la última fase de estrés térmico, se presentaron los valores más bajos para este parámetro, los cuales tuvieron un promedio de 0.334 ± 0.04 (D.E.)

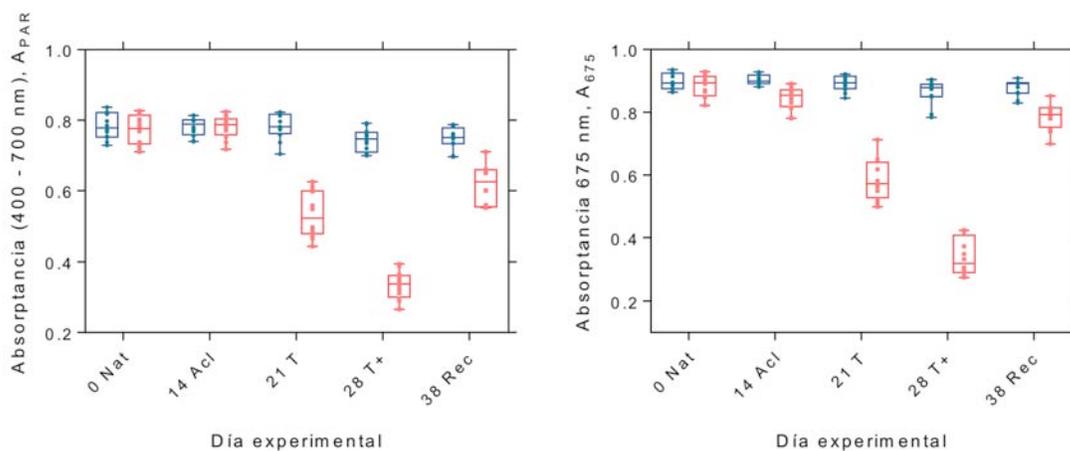


Figura 8. Variación de la absorptancia a lo largo del experimento **A)** región fotosintéticamente activa (PAR) **B)** región del rojo de la clorofila a a 675 nm. Cajas de color azul indican organismos control y cajas rojas indican organismos tratamiento temperatura. Líneas en mitad de cajas representan medias; puntos representan datos.

La absorptancia A_{675} (Fig. 8B), presentó un valor de 0.887 ± 0.03 (D.E.) para los organismos control, los cuales de igual manera no presentaron diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$ ANOVA). Los organismos tratamiento fueron sustancialmente diferentes entre sí a lo largo de todas las etapas del experimento, excepto entre la muestra natural y aclimatada (0Nat vs. 14Acl) ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.05$). Su capacidad de absorción de luz varió entre las etapas de la siguiente forma: Natural: 88.4% (absorptancia= 0.88); Aclimatación: 84.4%; Primera parte del estrés térmico: 58.08%; Segunda parte del estrés térmico: 33.90% y Recuperación: 78.63%. La absorción de irradiancia incidente en el rojo

de la clorofila *a* presentó un valor relevantemente mayor ($A= 0.887$) que el presentado para todo el PAR ($A= 0.768$).

Determinaciones ópticas

Densidad de simbioses

El número de simbioses presentado por los organismos control tuvo un valor promedio de $2.16 \pm 0.34 \times 10^{10}$ células m^{-2} a lo largo del experimento y aunque se dio una ligera reducción en este parámetro (Fig. 9) luego de que los organismos fueran extraídos de su hábitat natural, no se presentaron diferencias significativas entre cada etapa del experimento ($P>0.05$, ANOVA).

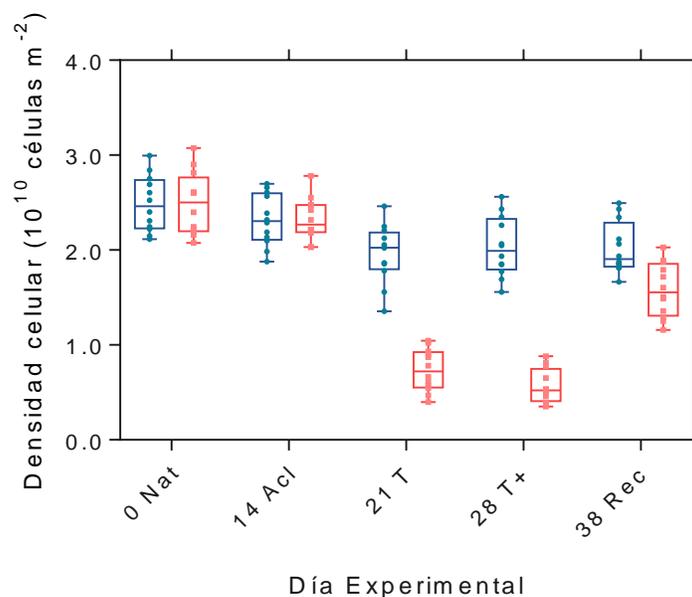


Figura 9. Variación del número de simbioses por unidad de área en cada etapa del experimento. Cajas de color azul indican organismos control y cajas rojas indican organismos tratamiento temperatura. Líneas en mitad de cajas representas medias; puntos representan datos.

Los organismos tratamiento presentaron una considerable reducción del número de sus simbioses durante el aumento de temperatura. Tan solo durante los siete primeros días de estrés térmico el contenido celular disminuyó a un $0.65 \pm 0.21 \times 10^{10}$ células m^{-2} , mientras que al cabo de 14 días de estrés térmico este se

mantuvo relativamente estable alrededor de $0.56 \pm 0.17 \times 10^{10}$ células m^{-2} . Diferencias significativas se presentaron entre las demás etapas del experimento, excepto entre estas dos (21T vs. 28T+) y la muestra natural y la aclimatación (0Nat. vs 14Acl). ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey post-hoc, $P > 0.05$).

Sobre estas observaciones se indica que la disposición de los organismos en los estanques no fue determinante sobre la reducción del número de simbiontes (6.62%), y que una vez que la densidad celular se vio severamente disminuida como producto del calentamiento (70.51%), esta se mantuvo relativamente constante hasta el término de la condición (77.27%), y aunque durante la recuperación existió un repoblamiento celular, este aún presentaba una reducción respecto a la condición natural (36%), donde se presentó una cantidad de $1.579 \pm 0.28 \times 10^{10}$ células m^{-2} .

Densidad de clorofila a

La sección transversal de la clorofila a, se caracterizó por presentar muy poca variabilidad entre sí, teniendo un valor promedio de 34.986 ± 5.03 mg Chl a m^{-2} (D.E.) para los organismos control y 26.513 ± 10.14 mg Chl a m^{-2} (D.E.) para los organismos tratamiento (Fig. 10). Los organismos extraídos del medio natural presentaron la mayor densidad de pigmento promedio (38.183 ± 4.98 mg Chl a m^{-2}), la cual en ninguna etapa siguiente del experimento llegó a presentar valores similares. Un posterior análisis de varianza y subsecuentemente de comparaciones múltiples revelaría que existieron diferencias significativas entre la condiciones de temperatura optimas (0Nat y 14Acl) y condiciones de estrés (21T y 28T+), pero no entre las dos etapas de estrés ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.05$).

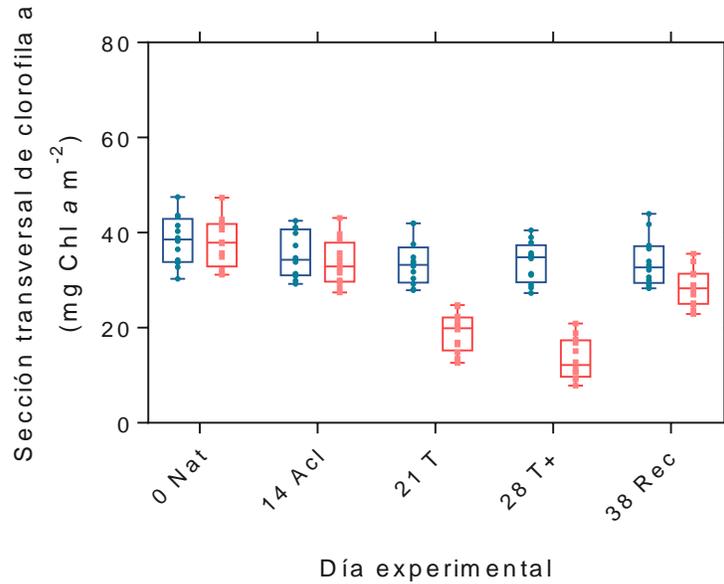


Figura 10. Variación del contenido de pigmento por unidad de área. Cajas de color azul indican organismos control y cajas rojas indican organismos tratamiento temperatura. Líneas en mitad de cajas representas medias; puntos representan datos.

Estos resultados son consistentes con las determinaciones de las densidades celulares; ya que se consigue describir que la aclimatación de los organismos tuvo un efecto menor al 10% sobre la densidad de pigmento, posteriormente el calentamiento generaría una disminución de pigmento entre el 50% - 70% durante la condición de estrés, la cual para el periodo de recuperación aún se encontraba en un reducción del 25% respecto a su estado natural.

Los resultados de las determinaciones anteriores se cotejaron en conjunto con los valores de absorptancia (A) previamente calculados, buscando establecer un modelo de asociación no lineal entre ambos parámetros (Fig. 11).

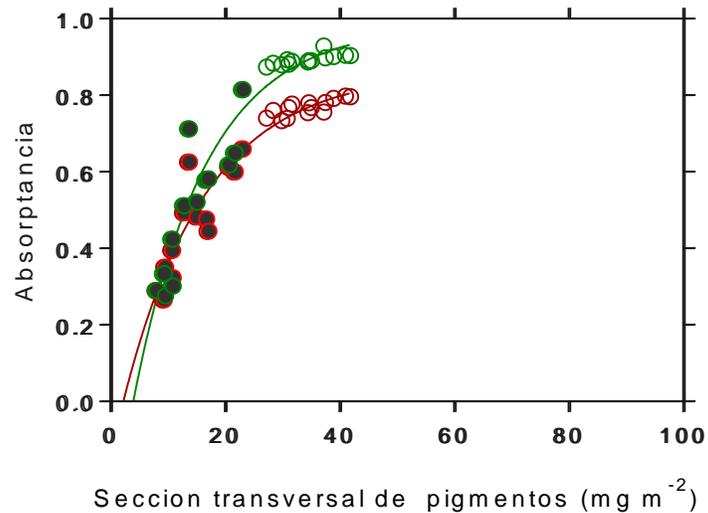


Figura 11. Asociación no lineal entre la absorptancia de luz y la concentración de pigmento por unidad de área (A_{675} : $R^2= 0.9297$; A_{PAR} : $R^2= 0.9262$). Los círculos y la línea de color verde representan la absorptancia de la clorofila a (675 nm), mientras que los círculos y la línea de color escarlata representan la absorptancia de pigmentos en todo el espectro PAR (400 - 700 nm). Los círculos con fondo claro representan organismos control y los círculos con fondo oscuro representan los organismos sometidos al tratamiento temperatura.

El modelo resultante y que se describe a continuación, es un modelo exponencial de saturación, que presenta las siguientes ecuaciones:

$$A_{PAR} = 0.8607 \pm 0.049 \times \text{Pigmentos}^{0.06928 \pm 0.01601}$$

$$A_{675} = 0.9822 \pm 0.049 \times \text{Chl } a^{0.07857 \pm 0.01613}$$

La asíntota de la ecuación, permite definir el valor donde el rango de respuesta en la absorptancia no tiene una mayor variación si el contenido de pigmento cambia, la cual en este caso fue de 62.476 ± 0.295 (D.E.) $\text{mg Chl } a \text{ m}^{-2}$. Cuando la densidad de pigmento se encuentra por debajo de este umbral, la capacidad de absorción decae abruptamente (Fig. 11).

Teniendo en cuenta la respuesta de los organismos control, se observa que existe una mayor absorptancia en presencia de una mayor densidad de pigmento.

Mientras estas condiciones persisten, existe una mínima variación de la absorptancia con respecto a la variación de la sección transversal del contenido de pigmentos. Una vez una condición de estrés es inducida, la absorptancia disminuye de forma no lineal cuando la densidad de clorofila baja y tiene una pendiente cada vez más pronunciada, conforme esta siga disminuyendo. Por otra parte, se observa también, que la capacidad de absorción de luz es generalmente mayor para la clorofila *a* que para los demás pigmentos en el rango de los 400 – 700 nm (secuencias verde y escarlata, respectivamente Fig. 11).

Coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* (*a*^{*})

La variación de la eficiencia de absorción de la clorofila *a* (Fig. 12) presentó un valor promedio de 0.0244 ± 0.0053 (D.E.) $\text{m}^{-2} \text{mg Chl } a^{-1}$, para los organismos control quienes no presentaron diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$, ANOVA). Este parámetro presentó una variación positiva en función del grado del estrés en el que los organismos se encontrasen. Mientras la temperatura se encontró en su óptimo fisiológico ($< 28 \text{ }^{\circ}\text{C}$), el parámetro *a*^{*} presentó los valores más bajos (0Nat: 0.0125) y una vez fue incrementada la temperatura alcanzó su máximo (28T+: 0.0787) (Fig. 12).

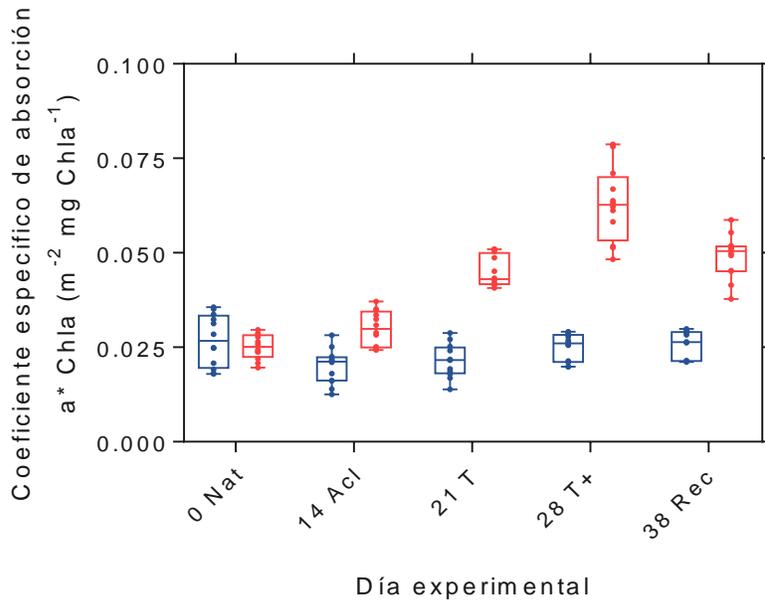


Figura 12. Variación del coeficiente específico de absorción a^* de la clorofila a lo largo del experimento. Cajas de color azul indican organismos control y cajas rojas indican organismos tratamiento temperatura. Líneas en mitad de cajas representas medias; puntos representan datos.

Diferencias significativas se presentaron entre todas las etapas del experimento para los organismos tratamiento ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey post-hoc, $P > 0.05$) excepto entre la muestra natural y los organismos aclimatados (0Nat. Vs 14Acl.) y entre los primeros días de estrés térmico y la recuperación (21T. Vs. Rec.) ($P < 0.05$ ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.05$). Esta última observación nos lleva a indicar que una eficiencia de absorción de luz similar a la expresada por el organismo durante el aumento de temperatura caracterizó al organismo aun durante la recuperación. Se destaca también el hecho de que durante la fase de mayor estrés térmico existió una mayor variación en la respuesta de los organismos.

Una asociación no lineal fue establecida entre este parámetro y la densidad de pigmento por unidad de área calculada previamente. Esta confirma que los valores más bajos de a^* , dada una concentración de clorofila a relativamente alta, son característicos de los organismos control cuando la temperatura se encuentra en su óptimo fisiológico. Una vez un aumento de temperatura es inducido, los valores

de a^* aumentan de forma exponencial a medida que la concentración de clorofila a se reduce (Fig. 13).

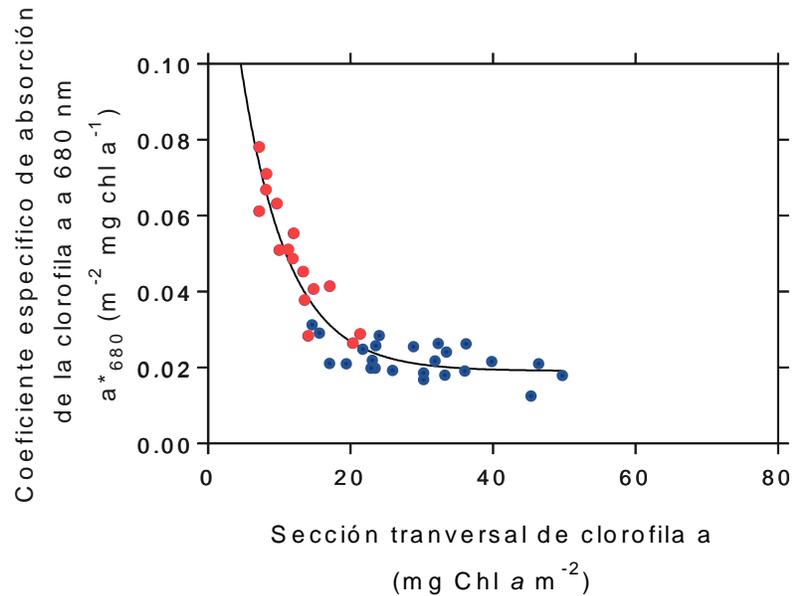


Figura 13. Asociación no lineal entre el coeficiente de absorción específico y la densidad de clorofila a por unidad de área ($R^2= 0.907$). Círculos de color azul representan organismos control y círculos de color rojo representan organismos tratamiento temperatura. La línea representa la curva de ajuste.

El decaimiento exponencial resultante, se describe mediante la ecuación:

$$a^*_{680} = 0.637 \pm 0.522 \times \text{Chl } a^{-0.1525 \pm 0.01742}$$

(\pm =SEM, $R^2= 0.907$, $p < 0.05$)

Dado el coeficiente de determinación obtenido, se puede indicar que los organismos mostraron una fuerte dependencia de la eficiencia de absorción de luz por pigmento en función de la variación de la densidad del mismo y esta variación es explicada hasta en un 90% a través del ajuste no lineal realizado.

PARTE III

Comparación de eficiencia fotoquímica entre cepas de simbios

Teniendo en cuenta que gran parte de la respuesta fotoadaptativa de los organismos puede ser explicada por las variaciones de los parámetros derivados de la fluorescencia de la clorofila *a*, las comparaciones entre los genotipos se evaluaron teniendo en cuenta las determinaciones de la presión de excitación sobre el fotosistema II, Q_m .

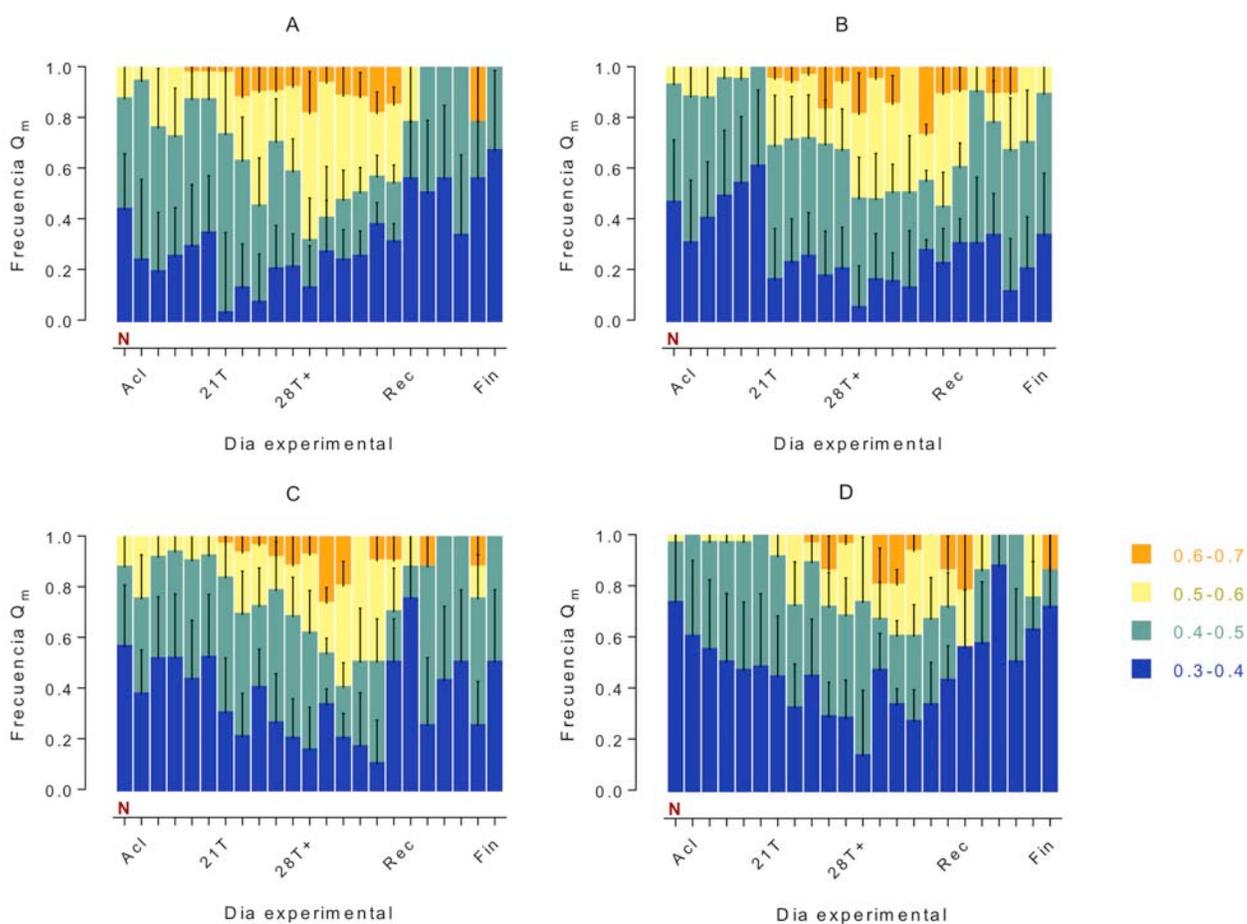


Figura 14. Variación en la proporción de cada rango de valores presentados para el parámetro Q_m en cuatro diferentes cepas (A,B,C,D) de *Symbiodinium fitti*. En el eje horizontal, se denotan cada una de las etapas del experimento. Letra N de color escarlata en la parte inferior izquierda representa la muestra natural. Solo son graficadas las barras de desviación estándar superiores.

A pesar de que el descoloramiento visual aparente de los organismos se dio de manera diferencial para cada cepa, una comparación de los valores de Q_m , confirmó que la forma en la cual cada una de estas percibe el estrés térmico no presenta diferencias significativas entre sí ($P > 0.05$, ANOVA).

Se realizó un análisis de varianza de dos vías para verificar la influencia de dos variables independientes: genotipo y día de exposición sobre el parámetro Q_m . La variable "genotipo" incluyó cuatro niveles (A; B; C; D), mientras que la variable "día" incluyó diez (5 tiempos [0 días; 14 días; 21 días; 28 días; 38 días] para un grupo control y un grupo tratamiento). Dado que el efecto de la variable "día" por sí solo, fue evidenciado al analizar la respuesta general del organismo (Resultados: PARTE II, parámetro Q_m), su resultado no se reporta nuevamente para esta parte de los resultados, sin embargo fue incluido en los parámetros del análisis para verificar la existencia de diferencias atribuidas a la interacción entre ambas variables ("genotipo*día").

Con un valor de significancia de alfa de 0.05, los resultados indican que no existe efecto de la variable "genotipo" sobre el parámetro Q_m , mismo que se evidenció obteniendo un estadístico de $F(3,80)=1,248$, y un p Value, $P=0.298$, lo que indica que no hay diferencias significativas entre los genotipos. De la misma manera, presentando un estadístico de $F(27,80)=0,9783$, $P=0.507$, se indica que no existe ningún efecto de la interacción "genotipo*día" sobre el parámetro Q_m .

VI. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente estudio muestran los efectos significativos que tiene el estrés por alta temperatura (+3 °C) sobre la fotoquímica de *Symbiodinium fitti* "in hospite" *Acropora palmata*. Estos efectos fueron evidenciados a través de la medición de la eficiencia fotoquímica máxima, presión de excitación sobre el fotosistema II, cambios en la densidad celular de los simbioses, capacidad de absorción de luz del holobionte, concentración de pigmento y su eficiencia de absorción. Por otra parte, la comparación de la presión de excitación sobre el fotosistema II, entre las cuatro cepas genótipicamente distintas de *S. fitti*, indicaron que no existen diferencias significativas en el desempeño funcional de *Acropora palmata* asociadas a la identidad del alga.

La detección del fotodaño acumulado y la presión de excitación en los centros de reacción del fotosistema II, determinada a través de los descriptores F_v/F_m y Q_m , mostró diferencias significativas en cada etapa del experimento, evidenciando que trascurridos 7 días, los organismos expuestos a 31° C exhiben ~14% de fotodaño con respecto al grupo control (28°C.). Paralelamente se determinó que cuando el calentamiento persiste durante 7 días más, el fotodaño puede ser el doble de lo exhibido por los organismos control alcanzando ~38%.

Según lo reportado por Heckathorn et al., (1997) y Warner et al. (1999), este tipo de fotodaño se presenta como una respuesta inicial que ocurre tras unas horas de incrementar la temperatura. Por su parte Butler, (1978) y Ludlow, (1987), indican que si el aumento de temperatura persiste a través de los días, el foto daño aumenta de forma progresiva, lo que puede conducir a la población de simbioses a un estado de fotoinhibición reversible o no reversible. Este resultado también es confirmado por el trabajo de Scheufen et al., (2017).

Los datos obtenidos mostraron que ambos parámetros (F_v/F_m y Q_m) no mantuvieron un patrón de comportamiento similar durante la recuperación de los individuos (Fig. 6.). Esto puede ser atribuído a que la disminución de la eficiencia

fotoquímica máxima no solamente esta funcionalmente ligada a procesos de fotoinhibición sino también de fotoprotección, donde normalmente existe una disminución de la transferencia de excitación a los centros de reacción (Franklin et al., 2003).

La disposición de los organismos en los estanques no presentó una reducción significativa en el número de simbioses (~5%), lo cual indica que la variación en el campo lumínico en los estanques no fue suficiente para inducir cambios significativos en el número de simbioses, sin embargo se observó que el estrés térmico causó una reducción de más del 70% de la densidad celular durante los primeros siete días tras el aumento de la temperatura. Aunque esta reducción no incrementó tras una semana más de estrés, la recuperación que el coral alcanzó para el final del experimento, no fue mayor al 34%. Pese a que la mayoría de corales escleractíneos presentan reducciones en el número de simbioses, asociadas al incremento de la temperatura del agua, que en el mar se da de manera estacional durante los meses de verano (Fitt et al., 2000), se ha reportado que prolongados periodos de calentamiento son responsables de pérdidas de simbioses generalmente mayores al 70%, donde niveles normales de luz pueden llevar a un estado de fotoinhibición reversible o no reversible, de los simbioses restantes dentro del coral (Sampayo et al., 2008; Kemp et al., 2014).

Posteriormente, se determinó que el estrés térmico modificó la capacidad de absorción de luz de toda la estructura (simbioses, coral y esqueleto carbonatado), la cual estuvo relacionado con la densidad de clorofila *a* ($\text{mg Chl } a \text{ m}^{-2}$). Estos dos parámetros fueron observables a través de la disminución del descriptor $\log(1/R)$. De esta manera, se presentó una capacidad de absorción de luz durante el proceso de aclimatación del 85% cuya concentración de clorofila fue aproximadamente de $34 \text{ mg Chl } a \text{ m}^{-2}$, seguido de un 30% de capacidad de absorción de luz con una concentración aproximada de $19 \text{ mg Chl } a \text{ m}^{-2}$ durante el estrés térmico y un 77% de capacidad de absorción de luz con una concentración aproximada de $28 \text{ mg Chl } a \text{ m}^{-2}$ durante la recuperación. Estos resultados fueron

comparados con el grupo control, el cual presento un 88% de capacidad de absorción de luz con una concentración aproximada de 38 mg Chl *a* m⁻².

Se ha reportado que debido al estrés térmico los corales experimentan pérdida de sus simbioses y reducción de clorofila, con lo cual disminuye su capacidad de absorción de luz. Esta capacidad de absorción de luz a su vez se ve modificada a causa del proceso de despigmentación que incrementa el campo lumínico en corales dada su alta complejidad tridimensional (Enríquez et al., 2005), como es el caso de *Acropora palmata*. De esta manera, la reducción de clorofila *a* que se presentó tras el aumento de temperatura, no solo modifica las propiedades ópticas del coral sino también el campo lumínico local de *Symbiodinium fitti*.

Debido a que el esqueleto de coral altamente reflectivo realza la luz dentro de la célula de coral, la pérdida de pigmentos fotosintéticos y simbioses a través del blanqueamiento de coral aumenta la irradiancia local y agrava los efectos negativos de las condiciones ambientales estresantes (Enríquez et al., 2005; Marcelino et al., 2013): el blanqueamiento puede resultar en un aumento de 150% en la irradiancia escalar dentro de los tejidos corales en comparación con un coral sano (Wangpraseurt et al., 2012). En algunos estudios se ha identificado que la capacidad de absorción de luz puede verse afectada tras un incremento de temperatura, la cual puede alterar proteínas como la D1 del fotosistema II (Warner et al., 1999; Hill et al., 2011), inducir inestabilidad en la membrana tilacoidal (Iglesias-Prieto et al., 1992; Tchernov et al., 2004; Díaz-Almeyda et al., 2011) y generar la pérdida de la actividad enzimática del RuBisCo (Jones et al., 1998; Lilley et al., 2010), que comprometen la densidad de clorofila *a* presente en los organismos. Un estudio reciente de *Symbiodinium* spp. en corales proporciona evidencia de que el estrés lumínico sin estrés térmico causa la fusión de lamelas tilacoidales de manera simultánea al daño foto-oxidativo, por su parte el estrés térmico sin estrés lumínico provoca la descomposición de estructuras tilacoides que consecuentemente genera estrés foto oxidativo, y finalmente la combinación de ambos tipos de estrés induce ambas patomorfologías (Downs et al., 2013).

Las variaciones en la densidad celular, junto con las determinaciones del contenido de pigmentos permiten explicar cómo varía la capacidad de absorción de luz (A) y su eficiencia de absorción (a^*) en el holobionte. Los corales en condiciones de estrés, que típicamente presentaron bajos contenidos de pigmento se caracterizaron por exhibir un mayor coeficiente de absorción (a^*) que los organismos control.

La alta eficiencia de absorción en los organismos tratamiento y la forma en que esta disminuye en función de la densidad de pigmento, indican que mientras los organismos se encuentran en una condición de estrés, son sensibles a presentar cambios en a^* con mínimas variaciones en su contenido de pigmento. Aunque, la capacidad de absorción de luz también está determinada por la complejidad tridimensional del esqueleto de *Acropora palmata*, la poca densidad de pigmento requerida para absorber tal cantidad de luz (e. g. tan solo 28 mg de Chl *a* m⁻² absorben 77% de la luz), conduciría a que cuando disminuyan el número de simbioses, las células que residen aun en el tejido estén expuestas a fuertes incrementos de luz que propicien su fotodaño. De este modo, un incremento de a^* explicaría la tasa de acumulación de fotodaño en el aparato fotosintético de los simbioses, el cual además es explicado a través de la reducción en los valores de la eficiencia fotoquímica máxima y el aumento de la presión de excitación sobre el fotosistema II, obtenidos previamente.

Una capa adicional de complejidad en la respuesta del coral ante el estrés térmico es la contribución de diferentes tipos de *Symbiodinium* spp. a la resistencia del coral ante el estrés. Dado que la separación taxonómica de *Symbiodinium* spp. se ha restringido a patrones fisiológicos (Blank Trench, 1986; Trench, 1997) y evolutivos (Rowan Powers, 1991; LaJeunesse, 2001), sus implicaciones ecológicas pueden estar limitadas si se considera que características similares (p.e.: termoadaptación, translocación de fotosintétatos) pudieron haber tenido orígenes simultáneos en diferentes taxa. Las características de resistencia

descritas hasta el momento, han estado enmarcadas en la influencia que simbiontes del clado D confieren a ciertos corales (Baker, 2001; Kemp et al., 2014; LaJeunesse et al., 2009). Investigaciones anteriores han mostrado solo un sutil efecto del genotipo de *Symbiodinium* spp. sobre la termotolerancia y los posibles patrones funcionales de que en los hospederos puedan derivarse de ello (Howells et al., 2011), sin embargo, esta tendencia no es concluyente. Los resultados de la presión de excitación sobre el fotosistema II (Q_m) de las diferentes cepas evaluadas (parte III resultados) obtenidos en el presente trabajo, revelan que no existen variantes funcionales a nivel de la termotolerancia del coral cuando existen asociaciones diferenciales de *Acropora palmata* con diferentes simbiontes.

VII. CONCLUSIONES

- El incremento de la temperatura del agua presentó efectos significativos sobre la fotoquímica de los simbioses “*in hospite*”, reflejados en la acumulación de fotodaño, aumento de la presión de excitación sobre el fotosistema II, cambios en la densidad celular de los simbioses, en la capacidad de absorción de luz, en la densidad de pigmento y su eficiencia de absorción en el coral *Acropora palmata*.
- La persistencia del calentamiento duplicó el fotodaño exhibido por *S. fitti* en una etapa inicial, ya que predispone el aparato fotosintético a un daño mayor por exceso de luz.
- La eficiencia fotoquímica máxima y presión de excitación sobre el fotosistema II durante la recuperación de *S. fitti*, no siguieron un patrón de comportamiento similar, ya que el primer parámetro no solo está ligado a procesos de fotoinhibición.
- El calentamiento generó una reducción del 70% de la densidad celular de *S. fitti*, misma que representó una disminución significativa de la capacidad de absorción de luz de *A. palmata*, pero a la vez un fuerte aumento de la eficiencia de absorción de la clorofila *a*.
- Este incremento en la eficiencia de absorción de luz en organismos de *A. palmata* fueron sometidos al calentamiento indica que los organismos que se encuentran en una condición de estrés, son muy sensibles a presentar cambios en a^* con mínimas variaciones del contenido de pigmento que presenta su simbiote *S. fitti*, confirmando trabajos realizados en otras especies (Enríquez et al., 2005; Scheufen et al., 2017).

- La comparación de la presión de excitación sobre el fotosistema II, sugiere que la asociación de *Acropora palmata* con diferentes cepas de *Symbiodinium fitti*. no implica una variedad funcional del holobionte como respuesta al estrés térmico.

I. REFERENCIAS

- ANDRAS, J. P., KIRK, N. L., & DREW HARVELL, C. (2011). Range-wide population genetic structure of Symbiodinium associated with the Caribbean Sea fan coral, *Gorgonia ventalina*. *Molecular Ecology*, *20*(12), 2525–2542. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05115.x>
- Anthony, K. R. N., Kline, D. I., Diaz-Pulido, G., Dove, S., & Hoegh-Guldberg, O. (2008). Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(45), 17442–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804478105>
- ARNAUD-HAOND, S., DUARTE, C. M., ALBERTO, F., & SERRÃO, E. A. (2007). Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology*, *16*(24), 5115–5139. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03535.x>
- Baker, A. C. (2001). Ecosystems: Reef corals bleach to survive change. *Nature*, *411*(6839), 765–766. <https://doi.org/10.1038/35081151>
- Baker, A. C. (2003). Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology, and biogeography of Symbiodinium. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *34*, 661–689. <https://doi.org/10.1146/132417>
- Banaszak, A., LaJeunesse, T. C., & Trench, R. K. (2000). The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAS) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *249*(2), 219–233. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00192-1](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00192-1)
- Banaszak, A. T., Barba Santos, M. G., LaJeunesse, T. C., & Lesser, M. P. (2006). The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *337*(2), 131–146. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.06.014>
- Banaszak, A. T., & Trench, R. K. (1995). Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima*

- and *Cassiopeia xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 194(2), 233–250. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00073-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00073-9)
- Baums, I. B., Devlin-Durante, M. K., & Lajeunesse, T. C. (2014). New insights into the dynamics between reef corals and their associated dinoflagellate endosymbionts from population genetic studies. *Molecular Ecology*, 4203–4215. <https://doi.org/10.1111/mec.12788>
- Berkelmans, R., & Willis, B. L. (1999). Seasonal and local spatial patterns in the upper thermal limits of corals on the inshore Central Great Barrier Reef. *Coral Reefs*, 18(3), 219–228. <https://doi.org/10.1007/s003380050186>
- Blank, R. J., & Trench, R. K. (1986). Nomenclature of Endosymbiotic Dinoflagellates. *Taxon*, 35(2), 286. <https://doi.org/10.2307/1221270>
- Bongaerts, P., Carmichael, M., Hay, K. B., Tonk, L., Frade, P. R., & Hoegh-Guldberg, O. (2015). Prevalent endosymbiont zonation shapes the depth distributions of scleractinian coral species. *Royal Society Open Science*, 2(2). Retrieved from <http://rsos.royalsocietypublishing.org/content/2/2/140297>
- Brown, B. E., Ambarsari, I., Warner, M. E., Fitt, W. K., Dunne, R. P., Gibb, S. W., & Cummings, D. G. (1999). Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: Evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs*, 18(2), 99–105. <https://doi.org/10.1007/s003380050163>
- Brown, B. E., Le Tissier, M. D. A., & Bythell, J. C. (1995). Mechanisms of bleaching deduced from histological studies of reef corals sampled during a natural bleaching event. *Marine Biology*, 122(4), 655–663. <https://doi.org/10.1007/BF00350687>
- Bruckner, A. W. (2002). Proceedings of the Caribbean Acropora Workshop: Potential Application of the U.S. Endangered Species Act as a Conservation Strategy. *Proceedings of the Caribbean Acropora Workshop*, (January), 199.
- Butler, W. L. (1978). Energy Distribution in the Photochemical Apparatus of Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, 29(1), 345–378. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.29.060178.002021>
- Crossland, C. J., & Barnes, D. J. (1977). Gas-exchange studies with the staghorn

- coral *Acropora acuminata* and its zooxanthellae. *Marine Biology*, 40(2), 185–194. <https://doi.org/10.1007/BF00396265>
- Csaszar, N. B. M., Ralph, P. J., Frankham, R., Berkelmans, R., & van Oppen, M. J. H. (2010). Estimating the potential for adaptation of corals to climate warming. *PloS One*, 5(3), e9751. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009751>
- D'Aoust, B. G., White, R., Wells, J. M., & Olsen, D. A. (1976). Coral-algal associations: capacity for producing and sustaining elevated oxygen tensions in situ. *Undersea Biomedical Research*, 3(1), 35–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1273983>
- Dahlgren, E. J. (1993). El Ecosistema Arrecifal Coralino del Atlantico Mexicano, (Xliv), 157–175.
- Darwin, C., & Stoddart, D. R. (1962). Coral Islands with introduction, map and remarks by D. R. Stoddart. *Atoll Research Bulletin*, 88, 1–20. <https://doi.org/10.5479/si.00775630.88.1>
- Desalvo, M. K., Sunagawa, S., Voolstra, C. R., & Medina, M. (2010). Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*, 402(2006), 97–113. <https://doi.org/10.3354/meps08372>
- Díaz-Almeyda, E., Thomé, P. E., El Hafidi, M., & Iglesias-Prieto, R. (2011). Differential stability of photosynthetic membranes and fatty acid composition at elevated temperature in *Symbiodinium*. *Coral Reefs*, 30(1), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0691-5>
- Dunlap, W. C., Chalker, B. E., & Oliver, J. K. (1986). Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia. III. UV-B absorbing compounds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 104(1–3), 239–248. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90108-5](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90108-5)
- Dunlap, W. C., & Shick, J. M. (1998). Ultraviolet Radiation-Absorbing Mycosporine-Like Amino Acids in Coral Reef Organisms: a Biochemical and Environmental Perspective. *Journal of Phycology*, 34(3), 418–430. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340418.x>
- Eberhard, S., Finazzi, G., & Wollman, F.-A. (2008). The Dynamics of

- Photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 463–515.
<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091452>
- Enríquez, S., Méndez, E. R., & Iglesias-Prieto, R. (2005). Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnology and Oceanography*, 50(4), 1025–1032. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.4.1025>
- Falkowski, P. G., & Raven, J. A. (2007). *Aquatic photosynthesis*.
- Fitt, W. K., Brown, B. E., Warner, M. E., & Dunne, R. P. (2001). Coral bleaching: Interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals. *Coral Reefs*, 20(1), 51–65. <https://doi.org/10.1007/s003380100146>
- Fitt, W. K., McFarland, F. K., Warner, M. E., & Chilcoat, G. C. (2000). Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnology and Oceanography*, 45(3), 677–685. <https://doi.org/10.4319/lo.2000.45.3.0677>
- Fitt, W. K., & Warner, M. E. (1995). Bleaching Patterns of Four Species of Caribbean Reef Corals. *The Biological Bulletin*, 189(3), 298–307.
<https://doi.org/10.2307/1542147>
- Fleischmann, E. M. (1989). The Measurement and Penetration of Ultraviolet Radiation Into Tropical Marine Water. *Limnology and Oceanography*, 34(8), 1623–1629. <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.8.1623>
- Franklin, L. A., Osmond, C. B., & Larkum, A. W. D. (2003). Photoinhibition, {UV-B} and Algal Photosynthesis. In *Photosynthesis in Algae* (pp. 351–384).
https://doi.org/10.1007/978-94-007-1038-2_16
- Glynn, P. W. (1984). Widespread Coral Mortality and the 1982–83 El Niño Warming Event. *Environmental Conservation*, 11(2), 133.
<https://doi.org/10.1017/S0376892900013825>
- Glynn, P. W. (1993). Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs*, 12(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF00303779>
- Gómez-Campo, K., & Banaszak, A. T. (2015). *Variabilidad Genética de Acropora palmata (LAMARCK, 1816) en el Caribe Mexicano*.
- Green, E. a., Davies, S. W., Matz, M. V., & Medina, M. (2014). Quantifying cryptic Symbiodinium diversity within *Orbicella faveolata* and *Orbicella franksi* at the

- Flower Garden Banks, Gulf of Mexico. *PeerJ*, 2, e386.
<https://doi.org/10.7717/peerj.386>
- Heckathorn, S. A., Coleman, J. S., & Hallberg, R. L. (1997). Recovery of net CO₂ assimilation after heat stress is correlated with recovery of oxygen-evolving-complex proteins in *Zea mays* L. *Photosynthetica*, 34(1), 13–20.
<https://doi.org/10.1023/A:1006899314677>
- Hill, R., Brown, C. M., DeZeeuw, K., Campbell, D. A., & Ralph, P. J. (2011). Increased rate of D1 repair in coral symbionts during bleaching is insufficient to counter accelerated photo-inactivation. *Limnology and Oceanography*, 56(1), 139–146. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.1.0139>
- Hoegh-Guldberg, O., & Jones, R. J. (1999). Photoinhibition and photoprotection in symbiotic dinoflagellates from reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 177(1–2), 1–12.
- Howells, E. J., Beltran, V. H., Larsen, N. W., Bay, L. K., Willis, B. L., & van Oppen, M. J. H. (2011). Coral thermal tolerance shaped by local adaptation of photosymbionts. *Nat. Clim. Chang.*, 2(February), 116–120.
<https://doi.org/10.1038/nclimate1330>
- Huner, N. P. ., Öquist, G., & Sarhan, F. (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, 3(6), 224–230.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01248-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01248-5)
- Iglesias-Prieto, R., Beltrán, V. H., LaJeunesse, T. C., Reyes-Bonilla, H., & Thomé, P. E. (2004). Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 271(1549), 1757–1763.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2757>
- Iglesias-Prieto, R., Matta, J. L., Robins, W. a, & Trench, R. K. (1992). Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(21), 10302–10305. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10302>
- Ito, S., & Hirata, Y. (1977). Isolation and structure of a mycosporine from the

zoanthid. *Tetrahedron Letters*, 18(28), 2429–2430.

[https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)83784-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)83784-9)

Jackson, a. E., Miller, D. J., & Yellowlees, D. (1989). Phosphorus Metabolism in the Coral-Zooxanthellae Symbiosis: Characterization and Possible Roles of Two Acid Phosphatases in the Algal Symbiont Symbiodinium sp. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 238(1291), 193–202.

<https://doi.org/10.1098/rspb.1989.0076>

Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiology Pflanz* 167: 191–194. *Biochemical Physiology Pflanzen*. [https://doi.org/10.1016/0022-2860\(75\)85046-0](https://doi.org/10.1016/0022-2860(75)85046-0)

Jones, R. J., Hoegh-Guldberg, O., Larkum, A. W. D., & Schreiber, U. (1998). Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO₂ fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell and Environment*, 21(12), 1219–1230. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00345.x>

Kaniewska, P., Magnusson, S. H., Anthony, K. R. N., Reef, R., Kühl, M., & Hoegh-Guldberg, O. (2011). IMPORTANCE OF MACRO- VERSUS MICROSTRUCTURE IN MODULATING LIGHT LEVELS INSIDE CORAL COLONIES1. *Journal of Phycology*, 47(4), 846–860.

<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01021.x>

Kemp, D. W., Hernandez-Pech, X., Iglesias-Prieto, R., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W. (2014). Community dynamics and physiology of Symbiodinium spp. before, during, and after a coral beaching event. *Limnology and Oceanography*, 59(3), 788–797. <https://doi.org/10.4319/lo.2014.59.3.0788>

Kühl, M., Cohen, Y., Dalsgaard, T., Barker Jergensen, B., & Peter Revsbech, N. (1995). Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied with microsensors for O₂, pH and light, 117, 159–172. Retrieved from <http://www.int-res.com/articles/meps/117/m117p159.pdf>

LaJeunesse, T. C. (2002). Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*, 141(2), 387–400.

<https://doi.org/10.1007/s00227-002-0829-2>

- LaJeunesse, T. C., Pettay, D. T., Sampayo, E. M., Phongsuwan, N., Brown, B., Obura, D. O., ... Fitt, W. K. (2010). Long-standing environmental conditions, geographic isolation and host-symbiont specificity influence the relative ecological dominance and genetic diversification of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Journal of Biogeography*, *37*(5), 785–800. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02273.x>
- LaJeunesse, T. C., Smith, R. T., Finney, J., & Oxenford, H. (2009). Outbreak and persistence of opportunistic symbiotic dinoflagellates during the 2005 Caribbean mass coral “bleaching” event. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. Retrieved from <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/early/2009/09/09/rspb.2009.1405>
- Lesser, M. P. (1996). Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and Oceanography*, *41*(2), 271–283. <https://doi.org/10.4319/lo.1996.41.2.0271>
- Lesser, M. P. (2006). OXIDATIVE STRESS IN MARINE ENVIRONMENTS: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, *68*(1), 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- LILLEY, R. M., RALPH, P. J., & LARKUM, A. W. D. (2010). The determination of activity of the enzyme Rubisco in cell extracts of the dinoflagellate alga *Symbiodinium* sp. by manganese chemiluminescence and its response to short-term thermal stress of the alga. *Plant, Cell & Environment*, *33*(6), 995–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02121.x>
- Lundgren, I., & Hillis-Starr, Z. (2008). Variation in *Acropora palmata* bleaching across benthic zones at Buck Island Reef National Monument (St. Croix, USVI) during the 2005 thermal stress event. *Bulletin of Marine Science*, *83*(3), 441–451.
- Marsh, J. J. (1970). Primary productivity of reef-building calcareous red algae. *Ecology*, *51*(2), 255–263. <https://doi.org/10.2307/1933661>
- Miller, M. W., Piniak, G. A., & Williams, D. E. (2011). Coral mass bleaching and reef temperatures at Navassa Island, 2006. *Estuarine, Coastal and Shelf*

- Science*, 91(1), 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.10.005>
- Milliman, J. D. (1969). Four Southwestern Caribbean Atolls: Courtown Cays, Albuquerque Cays, Roncador Bank and Serrana Bank. *Atoll Research Bulletin*, 129, 1–26. <https://doi.org/10.5479/si.00775630.129.1>
- MM. Ludlow. (1987). Light stress at high temperature. In D. J. Kyle, C. B. 1939-Osmond, & C. J. Arntzen (Eds.), *Photoinhibition*. Elsevier.
- Müller, P., Li, X.-P., & Niyogi, K. K. (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*, 125(4). Retrieved from <http://www.plantphysiol.org/content/125/4/1558>
- Muscatine, L., & Cernichiari, E. (1969). Assimilation of photosynthetic products of zooxanthellae by a reef coral. *Biol Bull*, 137(3), 506–523. <https://doi.org/10.2307/1540172>
- Muscatine, L., Goiran, C., Land, L., Jaubert, J., Cuif, J.-P., & Allemand, D. (2005). Stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of organic matrix from coral skeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(5), 1525–1530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408921102>
- Niyogi, K. K. (1999). PHOTOPROTECTION REVISITED: Genetic and Molecular Approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 333–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.333>
- Parkinson, J. E., Banaszak, A. T., Altman, N. S., LaJeunesse, T. C., & Baums, I. B. (2015). Intraspecific diversity among partners drives functional variation in coral symbioses. *Scientific Reports*, 5, 15667. <https://doi.org/10.1038/srep15667>
- Parkinson, J. E., & Baums, I. B. (2014). The extended phenotypes of marine symbioses: ecological and evolutionary consequences of intraspecific genetic diversity in coral–algal associations. *Frontiers in Microbiology*, 5(August), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00445>
- Pearse, V. B., & Muscatine, L. (1971). Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. *Biological Bulletin*, 141(2), 350–363. <https://doi.org/10.2307/1540123>
- Pettay, D. T., Wham, D. C., Pinzn, J. H., & Lajeunesse, T. C. (2011). Genotypic

diversity and spatial-temporal distribution of Symbiodinium clones in an abundant reef coral. *Molecular Ecology*, 20(24), 5197–5212.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05357.x>

Pinzón, J. H., Devlin-Durante, M. K., Weber, M. X., Baums, I. B., & LaJeunesse, T. C. (2011). Microsatellite loci for Symbiodinium A3 (*S. fitti*) a common algal symbiont among Caribbean *Acropora* (stony corals) and Indo-Pacific giant clams (*Tridacna*). *Conservation Genetics Resources*, 3(1), 45–47.

<https://doi.org/10.1007/s12686-010-9283-5>

Porter, J. W., Fitt, W. K., Spero, H. J., Rogers, C. S., & White, M. W. (1989). Bleaching in reef corals: Physiological and stable isotopic responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(23), 9342–6. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16594090>

Randall, C. J., & Szmant, A. M. (2009). Elevated temperature affects development, survivorship, and settlement of the elkhorn coral, *Acropora palmata* (Lamarck 1816). *Biological Bulletin*, 217(3), 269–282.

Reyes-Bonilla, H., & Jordán-Dahlgren, E. (2017). Caribbean Coral Reefs: Past, Present, and Insights into the Future. In *Marine Animal Forests* (pp. 1–42). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17001-5_2-1

Rowan, R., & Powers, D. (1991). Molecular genetic identification of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) . *Marine Ecology Progress Series*, 71, 65–73.

<https://doi.org/10.3354/meps071065>

Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Kühl, M., & Hoegh-Guldberg, O. (2000). Fluorescent pigments in corals are photoprotective. *Nature*, 408(6814), 850–853.

<https://doi.org/10.1038/35048564>

Sampayo, E. M., Ridgway, T., Bongaerts, P., & Hoegh-Guldberg, O. (2008). Bleaching susceptibility and mortality of corals are determined by fine-scale differences in symbiont type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(30), 10444–10449.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0708049105>

- Scheufen, T., Krämer, W. E., Iglesias-Prieto, R., & Enríquez, S. (2017). Seasonal variation modulates coral sensibility to heat-stress and explains annual changes in coral productivity. *Scientific Reports*, *7*(1), 4937. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04927-8>
- Shibata, K. (1969). Pigments and a UV-absorbing substance in corals and a blue-green alga living in the Great Barrier Reef. *Plant and Cell Physiology*, *10*, 325–335.
- Shirur, K. P., Ramsby, B. D., Iglesias-Prieto, R., & Goulet, T. L. (2014). Biochemical composition of Caribbean gorgonians: Implications for gorgonian — Symbiodinium symbiosis and ecology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *461*, 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.08.016>
- Smith, D. J., Suggett, D. J., & Baker, N. R. (2005). Is photoinhibition of zooxanthellae photosynthesis the primary cause of thermal bleaching in corals? *Global Change Biology*, *11*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2003.00895.x>
- Stochaj, W. R., Dunlap, W. C., & Shick, J. M. (1994). Two new UV-absorbing mycosporine-like amino acids from the sea anemone *Anthopleura elegantissima* and the effects of zooxanthellae and spectral irradiance on chemical composition and content. *Marine Biology*, *118*(1), 149–156. <https://doi.org/10.1007/BF00699229>
- Takahashi, S., Nakamura, T., Sakamizu, M., van Woesik, R., & Yamasaki, H. (2004). Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. *Plant & Cell Physiology*, *45*(2), 251–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14988497>
- Tchernov, D., Gorbunov, M. Y., de Vargas, C., Narayan Yadav, S., Milligan, A. J., Häggblom, M., & Falkowski, P. G. (2004). Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(37), 13531–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402907101>
- Thornhill, D. J., LaJeunesse, T. C., Kemp, D. W., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W.

- (2006). Multi-year, seasonal genotypic surveys of coral-algal symbioses reveal prevalent stability or post-bleaching reversion. *Marine Biology*, 148(4), 711–722. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-0114-2>
- Thornhill, D. J., Lewis, A. M., Wham, D. C., & Lajeunesse, T. C. (2014). Host-specialist lineages dominate the adaptive radiation of reef coral endosymbionts. *Evolution*, 68(2), 352–367. <https://doi.org/10.1111/evo.12270>
- Todd C. LaJeunesse. (2001). INVESTIGATING THE BIODIVERSITY, ECOLOGY, AND PHYLOGENY OF ENDOSYMBIOTIC DINOFLAGELLATES IN THE GENUS SYMBIODINIUM USING THE ITS REGION: IN SEARCH OF A “SPECIES” LEVEL MARKER, 880, 866–880.
- Trench, R. (1997). Diversity of symbiotic dinoflagellates and the evolution of microalgal-invertebrate symbioses. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium*.
- Vasquez-Elizondo, R. M., Legaria-Moreno, L., Perez-Castro, M. A., Kramer, W. E., Scheufen, T., Iglesias-Prieto, R., & Enriquez, S. (2017). Absorbance determinations on multicellular tissues. *Photosynthesis Research*, 132(3), 311–324. <https://doi.org/10.1007/s11120-017-0395-6>
- VENN, A. A., WILSON, M. A., TRAPIDO-ROSENTHAL, H. G., KEELY, B. J., & DOUGLAS, A. E. (2006). The impact of coral bleaching on the pigment profile of the symbiotic alga, Symbiodinium. *Plant, Cell and Environment*, 29(12), 2133–2142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.001587.x>
- Wang, & Douglas. (1998). Nitrogen recycling or nitrogen conservation in an alga-invertebrate symbiosis? *The Journal of Experimental Biology*, 2445–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9679106>
- Wangpraseurt, D., Larkum, A. W. D., Franklin, J., Szabó, M., Ralph, P. J., & Kühl, M. (2014). Lateral light transfer ensures efficient resource distribution in symbiont-bearing corals. *Journal of Experimental Biology*, 217(4). Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/217/4/489>
- Warner, M. E., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W. (1996). The Effects of Elevated Temperature On the Photosynthetic Efficiency of Zooxanthellae in Hospite From Four Different Species of Reef Coral - a Novel Approach. *Plant Cell &*

Environment, 19(3), 291–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00251.x>

Warner, M. E., Fitt, W. K., & Schmidt, G. W. (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 8007–8012. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8007>

Warner, M. E., LaJeunesse, T. C., Robison, J. D., & Thur, R. M. (2006). The ecological distribution and comparative photobiology of symbiotic dinoflagellates from reef corals in Belize: Potential implications for coral bleaching. *Limnology and Oceanography*, 51(4), 1887–1897. <https://doi.org/10.4319/lo.2006.51.4.1887>

Weis, V. M. (1991). The Induction of Carbonic Anhydrase in the Symbiotic Sea Anemone *Aiptasia pulchella*. *The Biological Bulletin*, 180(3), 496–504. <https://doi.org/10.2307/1542351>

Wolff, N. H., Donner, S. D., Cao, L., Iglesias-Prieto, R., Sale, P. F., & Mumby, P. J. (2015). Global inequities between polluters and the polluted: climate change impacts on coral reefs. *Global Change Biology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/gcb.13015>

ANEXO 1. Microsatelites loci para *Symbiodinium*, ITS2 tipo A3 (*S. 'fitti'*). Se reportan el nombre del locus, la referencia del tinte fluorescente, los primers, el motivo de repetición, la temperatura de anillamiento para la reacción en cadena de la polimerasa, y el numero de accesión Genbank. Algunas colas son añadidas a algunos primers, en cuyo caso son marcadas fluorescentemente a cambio del primer delantero. N alelos = numero de alelos diferentes. Colas (5' – 3'): T1 = GGCTAGGAAAGGTTAGTGGC, T2 = TCATACATGTCTCTCAGCGTAAAC, y T3 = ACCAACCTAGGAAACACAG, T4 = GACTATGGGCGTGAGTGCAT.

| Locus | Tinte | Primer (5' – 3') | Repetición | N alelos | Temp (°C) | Cola | Numero de Accesoión |
|-----------|-------|--|--|----------|-----------|------|---------------------|
| A3Sym_01* | VIC | F: AACATGACCTGAGAGAGTGGT R: TTGCGCAAAGGCTTGCAGAATCAC | (AG) _{9..20} bp..(AG) ₁₁ (AC) ₈ | 8 | 55 | T4 | HM802880 |
| A3Sym_03* | 6FAM | F: GTACCTGCTCCCATGGCGAT R: ACATGTCGCCAAGATGCCTGACCA | (CGT) ₈ | 4 | 56 | T2 | HM802881 |
| A3Sym_07* | NED | F: CCTGCTAACTTTGTTGCGGTAGG R: GCAGACGTCAAGAGCCACAGCT | (CTG) ₈ | 4 | 56 | T3 | HM802882 |
| A3Sym_09* | PET | F: TCAGATGCCAAGAGCCCAGAGT R: CACTGTTTGGTAGGATGCGCTGAA | (GAT) ₉ | 5 | 56 | T1 | HM802883 |
| A3Sym_18* | HEX | F: CGATCACGACAACACCAGAAAGC R: TGAAGTGAAGCGATTACTGTCCAGG | (AAC) ₄ | 4 | 55 | NA | HM802884 |
| A3Sym_27* | NED | F: AACACAGCTAAGATGCCTGCT R: GTGTTTTTGTGGTGGTGTGTCG | (ACA) _{5..11} bp..(AGC) ₃ | 2 | 60 | NA | HM802885 |
| A3Sym_28* | PET | F: CGAGCCCGCCAAAGCTTCGAGGTT R: TGACCCAGAGTTATCAGTGATCG | (GAT) 6 | 5 | 52 | NA | HM802887 |
| A3Sym_31* | HEX | F: GTGGTATAGTGTAGTGCGCTGG R: GACCGCATTGACAGTTAGGCT | (GGCAGC) 3 (AGC) 4..10 bp..(CAG) 10 | 3 | 52 | NA | HM802888 |
| A3Sym_32* | 6FAM | F: GGTGCGAGTGGCAGTGGCAGTA R: ACTGACTGCTGCGCACAAAGG | (AGTAGC) ₅ | 14 | 55 | NA | HM802889 |
| A3Sym_41* | 6FAM | F: CACCACTACACTGAATGGCGAC | (CAC) 5 | 5 | 52 | NA | HM802890 |

| | | | | | | | |
|------------|------|--|----------|---|----|----|----------|
| A3Sym_02** | NED | R: CGATGGCGATGCGATGGTGAT F: GCATAAACACGTTTTCTTCCAA R: TTGCATACTTGCACTTGTGG | (TATG) 7 | 6 | 55 | T3 | KF787091 |
| A3Sym_08** | VIC | F: TGGTTTAGGGTTAGGGGTCA R: GGGGGCCTCTACAAAAGAAA | TAG(9) | 6 | 55 | T4 | KF787092 |
| A3Sym_48** | 6FAM | R: CCATCATGACCATCTGGCTA R: CCGCAAAAAGTGTACTCACC | TATC(6) | 4 | 55 | T2 | KF787093 |

* (Pinzón *et al.* 2011) ** (Baums *et al.* 2014).