



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

PAPEL DEL DINOFLAGELADO *Symbiodinium* EN EL CICLO DE VIDA DEL CARACOL ROSADO *Lobatus gigas*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR(A) EN CIENCIAS
BIOLOGIA MARINA

PRESENTA:
MARIBEL GARCIA RAMOS

TUTOR(A)O TUTORES PRINCIPALES:
DRA. ANASTAZIA T. BANASZAK
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOZA
INSTITUTO DE QUIMICA UNAM
DR. JUAN JOSE LUIS CARBALLO CENIZO
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DRA. SUSANA ENRIQUEZ DOMINGUEZ
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DRA. ELVA ESCOBAR BRIONES
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DRA. PATRICIA THOME ORTIZ
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM

CD. MX., JULIO, 2018



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.



PAPEL DEL DINOFLAGELADO *Symbiodinium* EN EL CICLO DE VIDA DEL CARACOL ROSADO *Lobatus gigas*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTOR(A) EN CIENCIAS
BIOLOGIA MARINA**

PRESENTA:

MARIBEL GARCIA RAMOS

TUTOR(A) O TUTORES PRINCIPALES:

. DRA. ANASTAZIA T. BANASZAK
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. ROBERTO ARREGUIN ESPINOZA
INSTITUTO DE QUIMICA UNAM
DR. JUAN JOSE LUIS CARBALLO CENIZO
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DRA. SUSANA ENRIQUEZ DOMINGUEZ
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DRA. ELVA ESCOBAR BRIONES
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM
DRA. PATRICIA THOME ORTIZ
CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGIA UNAM

MÉXICO, CD. MX., JULIO, 2018

AGRADECIMIENTO DE APOYO

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Sistemas Arrecifales Puerto Morelos Por el espacio brindado para llevar a cabo esta investigación.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca (de superación académica para la realización de los estudios doctorales, del período septiembre/2003 a agosto/2005).

Agradezco a mi Directora de tesis Dra. Anastazia T. Banaszak, por la confianza que deposito en mi para la realización de este trabajo, su tiempo que siempre tuvo y tiene para la aclaración de dudas y traumas, su amable atención y esos largos ratos que pasabamos con esas lecturas interminables pero sobre todo por su amistad.

A mi comite tutotal, Dr. Iglesias, Dra. Enriquez, Dra. Thome, Dr. Arreguin, Dra. Escobar y Dr. Carballo por compartir sus conocimiento, sus comentarios, su tiempo y los animos para finalizar la investigación.

Agradezco al Centro Regional de Investigaciones Pesqueras del Instituto Nacional de Pesca en Puerto Morelos por las facilidades para el desarrollo de la investigación y a M. C. Donaldo Martínez Vázquez y a la Dra. Claudia Padilla y a las Cooperativas: "Langosteros de Banco Chinchorro," "Cozumel," y "María Elena" por su apoyo para la colecta de organismos y masas ovígeras.

Ingeniero Pesquero Omar Cruz por su apoyo, amistad y consejos en los momentos de frustración a lo largo del desarrollo de esta investigación.

MC. Laura Celis Gutiérrez por su ayuda en la revisión de unos capítulos del manuscrito y la búsqueda de bibliografía especializada sobre el tema.

MC. Martha Eréndira Sandoval por sus comentarios y revisión del manuscrito.

MC. Fernando Negrete Soto por el apoyo para la recoleta de organismos necesarios para este trabajo.

Dr. Enrique Álvarez Lozano, por permitirme un espacio para el mantenimiento de los caracoles durante una etapa de investigación.

Dra. Lourdes Segura[†] por brindarme un espacio en su laboratorio, en su microscopio y en su vida.

Biólogo Xavier Hernández Pech por su apoyo durante las lecturas de Irradiancia.

Ania, Roberto, Omar, Pathy, Donaldo, Susana, Lulu, Judith, Claudia, Miguel, Lau, Judith, Liz, Aime, Braulio, Lupita, Flor, Javier, Francisco, Lolo, Pablo, Marcy, Martha, Gabriel y Ricardo por el apoyo, por los consejos, por las porras para terminar este trabajo y por su amistad.

A mi Familia por su gran apoyo:

A mi esposo Othón y a mi hijo Emilio

Mi pequeña gran familia quienes siempre me apoyan y están conmigo, en mis desvelos, en los momentos más difíciles, en las ausencias, por su paciencia, por los momentos de frustración, por soportar todo el tiempo mis lecturas en voz alta, por tantas horas de trabajo... Les dedico este trabajo que encierra tantas cosas, les dedico lo que sé hacer, mejor o peor, no lo sé pero se las dedico con todo mi amor.

Teresa y Jose

A mi mamá por ser el pilar más importante, por su apoyo incondicional su amor y su confianza. A mi papá, que a pesar de nuestra distancia física siento que está conmigo siempre, este momento hubiera sido tan especial para usted como lo es para mí... Hasta el Cielo... Mi Luz...



La Universidad Nacional Autónoma de México

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

Mtra. Maribel García Ramos

Por haber obtenido el **quinto lugar** en el Programa de Fomento al Patentamiento y la Innovación 2014, con el desarrollo tecnológico **Uso de microalgas para aumentar la sobrevivencia de las etapas tempranas del ciclo de vida del caracol rosado *Lobatus (=Strombus) gigas* en cultivo**, por su mérito y factibilidad técnica, la atraktividad de su mercado, su impacto social y mejor prospecto de negocio.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 23 de abril de 2015

Dr. José Narro Robles
Rector



Contenidos

	Paginas
Resumen	16
Introducción General	24
Simbiosis y asociaciones simbióticas	24
El papel de <i>Symbiodinium</i> en asociaciones simbióticas	34
Foraminíferos y Radiolarios	34
Anémonas marinas y Medusas	35
Corales	37
<i>Symbiodinium</i> y Moluscos	40
<i>Symbiodinium</i> y Strombus	41
<i>Lobatus gigas</i>	42

Capítulo 1

Distribución y actividad fotoquímica del dinoflagelado *Symbiodinium* en caracoles adultos de *Lobatus gigas*

Introducción	52
Hipótesis General de Investigación	59
Objetivo General	59
Objetivos Particulares	59
Materiales y Métodos	60
Recolecta de organismos	60

Disección	62
Cuantificación de dinoflagelados	63
Análisis histológico	65
Microscopía electrónica de transmisión	66
Efecto de la concha y el ambiente lumínico externo e interno del caracol rosado <i>L. gigas</i>	67
Estimación de la eficiencia fotoquímica de <i>Symbiodinium</i> en la glándula digestiva de <i>L. gigas</i>	68
Metodología Estadística	70
Resultados	71
Medición de irradiancia a través de la concha del caracol rosado <i>L. gigas</i>	71
Eficiencia fotoquímica de <i>Symbiodinium</i> en la glándula digestiva de <i>L. gigas</i>	72
Ubicación y distribución de <i>Symbiodinium</i> en <i>L. gigas</i>	73
En órganos	74
En tejidos	76
Ubicación intracelular o extracelular de <i>Symbiodinium</i> en los tejidos de <i>L. gigas</i>	90
Crecimiento y división de <i>Symbiodinium</i> en el interior de <i>L. gigas</i>	91
Discusión	95
Conclusiones	109

Capítulo 2

Adquisición del dinoflagelado *Symbiodinium* por el caracol rosado *Lobatus gigas*

Introducción	111
--------------	-----

Hipótesis General de Investigación	116
Objetivo General	116
Objetivos Particulares	116
Materiales y Métodos	117
Presencia o ausencia de <i>Symbiodinium</i> en las etapas tempranas de desarrollo de <i>L. gigas</i>	117
Recolecta y fijación de masa visceral	117
Adquisición de <i>Symbiodinium</i> por las larvas veliger en sistemas experimentales	118
Recolecta	118
Incubación	119
Sistema experimental	119
Aislamiento de <i>Symbiodinium</i> para la inoculación de las larvas veliger	122
Edad óptima de larvas veliger para la inoculación con <i>Symbiodinium</i>	123
Supervivencia de larvas veliger en presencia o ausencia de <i>Symbiodinium</i>	125
Inducción de metamorfosis	127
Juveniles en sistemas de experimentación	128
Supervivencia	128
Crecimiento	128
Metodología Estadística	129
Resultados	131
Discusión	149
Conclusiones	159

Capítulo 3

Preferencia de la larva veliger de *Lobatus gigas* por *Symbiodinium* aislado de diferentes hospederos

Introducción	161
Hipótesis General de Investigación	165
Objetivo General	165
Objetivos Particulares	165
Materiales y Métodos	166
Aislamiento de <i>Symbiodinium</i>	167
Inoculación de larvas veliger	168
Sistemas experimentales	169
Monitoreo de larvas veliger	169
Inducción de metamorfosis	171
Monitoreo de juveniles	171
Metodología Estadística	172
Resultados	173
Discusión	184
Conclusiones	190
Bibliografía Citada	191

Figuras

Figura 1.	Estructura celular de dinoflagelados tecados y atecados	32
Figura 2.	Ciclo de vida del caracol <i>Lobatus gigas</i>	49
Figura 3.	Parámetros de fluorescencia medidos en <i>Symbiodinium</i> localizado en el interior de <i>Lobatus gigas</i>	58
Figura 4.	Sitios de muestreo del caracol rosado <i>Lobatus gigas</i>	62
Figura 5.	Relación entre el porcentaje de irradiancia que pasó a través de la cavidad de la concha de <i>Lobatus gigas</i> (medido con un sensor esférico y la longitud sifonal	72
Figura 6.	Eficiencias fotoquímicas máximas en oscuridad y efectivas en presencia de irradiancia solar de <i>Symbiodinium</i> en la glándula digestiva de caracoles adultos de <i>Lobatus gigas</i> .	73
Figura 7.	El caracol <i>Lobatus gigas</i> desconchado mostrando el músculo columelar y la gónada; y la disección mostrando la glándula digestiva, el estómago y el intestino y el manto.	75
Figura 8.	Cortes histológicos en sección longitudinal de la glándula digestiva de <i>Lobatus gigas</i> mostrando en túbulos que forman la glándula digestiva la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	76
Figura 9.	Cortes histológicos en sección transversal del nefridio de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	77
Figura 10.	Corte histológico en sección transversal de la branquia de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	78
Figura 11.	Corte histológico en sección transversal de la gónada de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la ausencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	78
Figura 12.	Cortes histológicos en sección longitudinal del estómago de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	79

Figura 13.	Cortes histológicos en sección transversal del recto de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	79
Figura 14.	Cortes histológicos en sección longitudinal del manto de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	80
Figura 15.	Cortes histológicos en sección transversal del pie de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	81
Figura 16.	Corte histológico en sección transversal de la probóscide de <i>Lobatus gigas</i> mostrando la presencia de células de <i>Symbiodinium</i> .	86
Figura 17.	Densidad de células de <i>Symbiodinium</i> por gramo en peso húmedo de tejido blando de <i>Lobatus gigas</i> .	85
Figura 18.	Volumen (mm^3) de las células de <i>Symbiodinium</i> en peso húmedo de tejido blando de <i>Lobatus gigas</i> .	86
Figura 19.	Densidad por gramo de células de <i>Symbiodinium</i> y volumen (mm^3) de <i>Lobatus gigas</i> en diferentes poblaciones.	86
Figura 20.	Densidad y la relación entre el volumen (mm^3) de células de <i>Symbiodinium</i> por gramo en peso húmedo de tejido blando de <i>Lobatus gigas</i> .	88
Figura 21.	Volumen (mm^3) de las células de <i>Symbiodinium</i> en peso húmedo de tejido blando de <i>Lobatus gigas</i> . Representando un ajuste logarítmico	89
Figura 22.	Micrografías de transmisión electrónica de una porción de la glándula digestiva de <i>Lobatus gigas</i> en donde se observa la presencia de <i>Symbiodinium</i> .	92
Figura 23.	Heces fecales de <i>Lobatus gigas</i> con la presencia de <i>Symbiodinium</i> morfológicamente intactos entre restos alimenticios.	93
Figura 24.	<i>Symbiodinium</i> en división celular.	94
Figura 25.	Sistema de flujo cerrado completo, para el mantenimiento de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> .	121

Figura 26.	Masa ovígera de <i>Lobatus gigas</i> con uno y cuatro días de edad con embriones dentro del filamento pegajoso ambos sin evidencia de presencia de <i>Symbiodinium</i> .	132
Figura 27.	Supervivencia (%) de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> inoculadas con <i>Symbiodinium</i> a diferentes tiempos-edades de la larva.	133
Figura 28.	Variación de la supervivencia de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> inoculadas con <i>Symbiodinium</i> a diferentes tiempos-edades de la larva.	134
Figura 29.	Disección de larva veliger de <i>Lobatus gigas</i> de 9 días de edad inoculadas con <i>Symbiodinium</i> a las 48 h después de la eclosión.	135
Figura 30.	Número de células de <i>Symbiodinium</i> en el interior de las larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> inoculadas a diferentes edades.	136
Figura 31.	Supervivencia de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> en ausencia y presencia de <i>Symbiodinium</i> .	138
Figura 32.	Variación de la supervivencia de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> en ausencia y presencia de <i>Symbiodinium</i> .	139
Figura 33.	Disección de larva veliger de <i>Lobatus gigas</i> de 10 días de edad.	141
Figura 34.	Crecimiento de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> , en ausencia y presencia de <i>Symbiodinium</i> .	142
Figura 35.	Número de células de <i>Symbiodinium</i> en el interior de las larvas veliger del <i>Lobatus gigas</i> inoculadas con <i>Symbiodinium</i> .	145
Figura 36.	Larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> inducidas a la metamorfosis con <i>Laurencia poitei</i> a diferentes edades.	146
Figura 37.	Supervivencia de los juveniles de <i>Lobatus gigas</i> después de la metamorfosis a diferentes tiempos.	147
Figura 38.	Crecimiento de juveniles de <i>Lobatus gigas</i> después de la inducción a la metamorfosis a diferentes tiempos.	148

Figura 39.	Heces de juveniles de <i>Lobatus gigas</i> quienes fueron inoculados con <i>Symbiodinium</i> durante la etapa larval mostrando la presencia de <i>Symbiodinium</i> intactos y heces fecales de juveniles de <i>Lobatus gigas</i> que en etapa larval no fueron inoculados con <i>Symbiodinium</i> mostrando la ausencia del mismo.	149
Figura 40.	Diseción de larva veliger inoculada a las 48 h después de la eclosión con <i>Symbiodinium</i> aislado de <i>Lobatus gigas</i> , larva con 27 días de edad.	175
Figura 41.	Supervivencia de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> inoculadas con <i>Symbiodinium</i> aislados de diferentes hospederos: <i>Bartholomea annulata</i> (C1), <i>Millepora alcicornis</i> (A), <i>Pterogorgia anceps</i> (B1) y <i>Lobatus gigas</i> (C4).	176
Figura 42.	Variación de la supervivencia de larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> inoculadas con <i>Symbiodinium</i> aislado de diferentes hospederos.	179
Figura 43.	Número de células de <i>Symbiodinium</i> en el interior de las larvas veliger inoculadas con <i>Symbiodinium</i> aislados de diferentes hospederos.	180
Figura 44.	Crecimiento de las larvas veliger de <i>Lobatus gigas</i> inoculadas con <i>Symbiodinium</i> aislado de diferentes hospederos.	181
Figura 45.	Supervivencia de juveniles de <i>Lobatus gigas</i> después de la inducción a la metamorfosis para caracoles inoculados en etapa larval con <i>Symbiodinium</i> aislado del hospedero <i>Pterogorgia anceps</i> y <i>Lobatus gigas</i>	182
Figura 46.	Aumento del crecimiento en juveniles de <i>Lobatus gigas</i> después de la metamorfosis inoculados con <i>Symbiodinium</i> aislado del hospedero <i>Pterogorgia anceps</i> y del <i>Lobatus gigas</i> .	183
Figura 47.	Heces fecales de juveniles de <i>Lobatus gigas</i> inoculados con <i>Symbiodinium</i> aislados de <i>Pterogorgia anceps</i> y de <i>Lobatus gigas</i> .	183

Tablas

Tabla 1.	Número total de células de <i>Symbiodinium</i> y la proporción de <i>Symbiodinium</i> en órganos y tejidos de adultos de <i>Lobatus gigas</i> .	83
Tabla 2.	Análisis de covarianza para la comparación de medias entre los volúmenes de <i>Symbiodinium</i> en peso húmedo de <i>L. gigas</i> de tres sitios diferentes de colecta.	90
Tabla 3.	Número de células totales de <i>Symbiodinium</i> , diámetro de células y volumen en la glándula digestiva de <i>Lobatus gigas</i> por sitio de muestreo.	90
Tabla 4.	Dinámica poblacional de <i>Symbiodinium</i> en los tejidos y órganos de <i>Lobatus gigas</i> .	95



Resumen

Los dinoflagelados del género *Symbiodinium* se encuentran en asociación simbiótica en ambientes arrecifales con una gran variedad de invertebrados marinos. En un estudio publicado en 2002 en un ejemplar del molusco gasterópodo *Lobatus gigas* (antes *Strombus gigas*) proveniente de Puerto Morelos, fue identificado el tipo genético de *Symbiodinium* en la glándula digestiva y el tracto digestivo. Dicho estudio dio pauta a la presente investigación de describir la relación que existe entre ellos. En 11 ejemplares de *Lobatus gigas* (anteriormente *Strombus gigas*) provenientes de Puerto Morelos, Banco Chinchorro e Isla de Cozumel, por medio de disecciones y análisis histológicos, se observó que *Symbiodinium* se encuentra en la glándula digestiva, el tracto digestivo, el nefridio, la branquia, el manto y el pie, pero no se presenta en la gónada ni en el músculo columelar. Los dinoflagelados no son una fuente alimenticia para *Lobatus gigas* ya que no presentaron daño aparente ni señales de digestión. Se determinó que el porcentaje de irradiancia que pasa a través de las conchas de adultos de *Lobatus gigas* es 21% decayendo exponencialmente conforme incrementa la longitud sifonal. *Symbiodinium in situ* en la glándula digestiva presentó actividad fotoquímica lo que sugiere que el dinoflagelado es fotosintéticamente activo. Los



dinoflagelados en el interior del caracol son capaces de dividirse tanto que la población entera se puede renovar en 30 días. La colonización de *Symbiodinium* de la masa visceral presenta diferencias en relación al tamaño del organismo y a la población estudiada, ya que al aumentar el peso húmedo de la masa visceral de *Lobatus gigas* el volumen que ocupan los dinoflagelados aumenta porque aumenta el número de células en el tejido. Además, el tamaño de las células es diferente en los 3 sitios estudiados. La presencia del dinoflagelado en estructuras no relacionadas con el tracto digestivo sugiere que *Symbiodinium* mantiene una asociación simbiótica con *Lobatus gigas*. Además, el caracol es fuente de una gran cantidad de dinoflagelados que son liberados a través de sus heces fecales. Debido a que en las muestras de las gónadas no se presentaron dinoflagelados se postuló que la adquisición de estos puede ser a través del medio ambiente y no por herencia materna. Se estudiaron las etapas tempranas de *Lobatus gigas*, llevadas a cabo dentro del huevo (estadio embrionario y larva trocófora), muestreando continuamente segmentos de la masa ovígera hasta el momento de la eclosión. No se observó la presencia de *Symbiodinium* en ninguna de las etapas de *Lobatus gigas* desarrolladas dentro del huevo. Por otro lado, al emerger las larvas veliger, del huevo, fueron expuestas al simbiote aislado de adultos de *Lobatus gigas* a diferentes edades (0, 24, 48 y 72 h), determinando que la edad óptima de



inoculación es a las 48 h, observándose el *Symbiodinium* al tercer día de la inoculación en el estómago y en la glándula digestiva de las larvas. Estas larvas también presentaron mayor supervivencia con respecto a las otras. Al realizar inoculación única de las larvas veliger de *Lobatus gigas* con 48 h de eclosión con *Symbiodinium* recién aislado de caracoles adultos y alimentadas con microalgas del género *Isochrysis* sp., la supervivencia y el crecimiento fueron significativamente más altos en comparación con las larvas alimentadas sólo con *Isochrysis* sp. o las larvas con inoculación única del simbiote aislado de un caracol adulto. La presencia del dinoflagelado en las larvas veliger de diferentes edades (30 y 40 días) no fue un factor determinante para inducir la metamorfosis. Para inducir este proceso se necesitó la presencia de la macroalga roja *Laurencia poitei* obteniendo un 54 y 77% de larvas inducidas respectivamente. La presencia del dinoflagelado en la etapa juvenil de *Lobatus gigas* favoreció su supervivencia y crecimiento. En las heces fecales de los caracoles juveniles, se determinó la presencia de dinoflagelados morfológicamente intactos por lo que éstos no son digeridos por el caracol. Para determinar la preferencia de *Lobatus gigas* por diferentes tipos de *Symbiodinium* se inocularon larvas veliger con *Symbiodinium* de diferentes tipos genéticos (clades) recién aislados de sus hospederos. Se determinó que las larvas veliger de *Lobatus gigas* adquieren *Symbiodinium* aislado



de la anémona *Bartholomea annulata* (clade C1), del gorgonáceo *Pterogorgia anceps* (clade B1) y de *Lobatus gigas* (clade C4), pero no adquieren simbiontes aislados del hidrozoario *Millepora alcicornis* (clade A). Los dinoflagelados aislados de *Bartholomea annulata* se observaron solamente en el estómago de la larva veliger por 96 h. En cambio, en las larvas inoculadas con el simbionte aislado de *Pterogorgia anceps* y de *Lobatus gigas* se observaron en el estómago y en la glándula digestiva a lo largo de toda la fase experimental hasta finalizar el desarrollo de la etapa larval. En sistemas experimentales, las larvas veliger presentaron mayor supervivencia y crecimiento al ser inoculadas con *Symbiodinium* provenientes de *Lobatus gigas* (clade C4) pero para el proceso de metamorfosis el *Symbiodinium* que les otorga mayor ventaja es el aislado de un gorgonáceo. Las larvas inoculadas con el simbionte aislado de *Pterogorgia anceps* llevaron a cabo la metamorfosis sin necesidad de inductor externo, mientras que en las larvas inoculadas con dinoflagelados aislados de *Lobatus gigas* fue necesaria la inducción con la macroalga roja *Laurencia poitei*. Los juveniles inoculados con el simbionte aislado de *Pterogorgia anceps* en etapa veliger presentaron mayor crecimiento con respecto a los juveniles inoculados con el simbionte aislado de *Lobatus gigas* en etapa larval. Por todo lo anterior postulamos que *Lobatus gigas* juega un papel ecológico muy importante en el sistema arrecifal y que la presencia



de *Symbiodinium* en el ciclo de vida de *Lobatus gigas* es un factor necesario para su desarrollo.

Summary

The dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* are in symbiotic association in reef environments with a great variety of marine invertebrates. In a study published in 2002 in a specimen of the gastropod mollusk *Lobatus gigas* (formerly *Strombus gigas*) from Puerto Morelos, the genetic type of *Symbiodinium* was identified in the digestive gland and digestive tract. This study gave guidelines to the present investigation to describe the relationship that exists between them. In 11 specimens of *Lobatus gigas* (formerly *Strombus gigas*) from Puerto Morelos, Banco Chinchorro and Isla de Cozumel, through dissections and histological analyzes, it was observed that *Symbiodinium* is found in the digestive gland, the digestive tract, the nephridium, the gill, mantle and foot, but it does not occur in the gonad or in the columella muscle. The dinoflagellates are not a food source for *Lobatus gigas* since they did not show apparent damage or signs of digestion. It was determined that the percentage of irradiance that passes through the adult shells of *Lobatus gigas* is 21% decaying exponentially as the siphonal length increases. *Symbiodinium* in situ in the digestive gland presented photochemical activity



suggesting that the dinoflagellate is photosynthetically active. The dinoflagellates inside the snail are able to divide so much that the entire population can be renewed in 30 days. The colonization of *Symbiodinium* of the visceral mass presents differences in relation to the size of the organism and to the studied population, since when increasing the wet weight of the visceral mass of *Lobatus gigas*, the volume occupied by dinoflagellates increases because the number of cells in the body increases tissue. In addition, the size of the cells is different in the 3 sites studied. The presence of dinoflagellate in structures unrelated to the digestive tract suggests that *Symbiodinium* maintains a symbiotic association with *Lobatus gigas*. In addition, the snail is the source of a large amount of dinoflagellates that are released through their feces. Due to the fact that dinoflagellates were not shown in the samples from the gonads, it was postulated that the acquisition of these could be through the environment and not through maternal inheritance. The early stages of *Lobatus gigas* were studied, carried out inside the egg (embryonic stage and larva trocófora), continuously sampling segments of the ovigerous mass until the moment of hatching. The presence of *Symbiodinium* was not observed in any of the stages of *Lobatus gigas* developed inside the egg. On the other hand, upon emergence of the veliger larvae, from the egg, they were exposed to the isolated symbiont of adults of *Lobatus gigas* at



different ages (0, 24, 48 and 72 h), determining that the optimal age of inoculation is at 48 h, *Symbiodinium* is observed on the third day of inoculation in the stomach and in the digestive gland of the larvae. These larvae also had greater survival with respect to the others. By performing a single inoculation of the veliger larvae of *Lobatus gigas* with 48 h of hatching with *Symbiodinium* freshly isolated from adult snails and fed with microalgae of the genus *Isochrysis* sp., Survival and growth were significantly higher in comparison with larvae fed only *Isochrysis* sp. or the larvae with unique inoculation of the isolated symbiont of an adult snail. The presence of dinoflagellate in veliger larvae of different ages (30 and 40 days) was not a determining factor to induce metamorphosis. To induce this process, the presence of the red alga *Laurencia poitei* was needed, obtaining 54 and 77% of induced larvae respectively. The presence of dinoflagellate in the juvenile stage of *Lobatus gigas* favored its survival and growth. In feces of juvenile snails, the presence of morphologically intact dinoflagellates was determined, so they are not digested by the snail. To determine the preference of *Lobatus gigas* for different types of *Symbiodinium* veliger larvae were inoculated with *Symbiodinium* of different genetic types (clades) recently isolated from their hosts. It was determined that the veliger larvae of *Lobatus gigas* acquire *Symbiodinium* isolated from the sea anemone *Bartholomea annulata* (clade C1), from the gorgonian *Pterogorgia anceps*



(clade B1) and from *Lobatus gigas* (clade C4), but do not acquire isolated symbionts from the hydrozoan *Millepora alcicornis* (clade A). The dinoflagellates isolated from *Bartholomea annulata* were observed only in the stomach of the larva veliger for 96 h. In contrast, larvae inoculated with the isolated symbiont of *Pterogorgia anceps* and *Lobatus gigas* were observed in the stomach and digestive gland throughout the experimental phase until the development of the larval stage was completed. In experimental systems, veliger larvae showed greater survival and growth when inoculated with *Symbiodinium* from *Lobatus gigas* (clade C4) but for the process of metamorphosis the *Symbiodinium* that gives them greater advantage is isolated from a gorgonian. The larvae inoculated with the isolated symbiont of *Pterogorgia anceps* carried out the metamorphosis without the need for an external inducer, whereas in the larvae inoculated with dinoflagellates isolated from *Lobatus gigas*, induction with the red alga *Laurencia poitei* was necessary. The juveniles inoculated with the isolated symbiont of *Pterogorgia anceps* in the veliger stage presented greater growth with respect to the juveniles inoculated with the isolated symbiote of *Lobatus gigas* in the larval stage. For all the above we postulate that *Lobatus gigas* plays a very important ecological role in the reef system and that the presence of *Symbiodinium* in the life cycle of *Lobatus gigas* is a necessary factor for its development.



Introducción General

Simbiosis y asociaciones simbióticas

Las algas unicelulares como dinoflagelados del género *Symbiodinium* se localizan en una gran variedad de invertebrados marinos desde Protozoarios, hasta Moluscos en asociaciones mutualistas en aguas oligotróficas con alta irradiancia solar (Banaszak et al., 1993; Trench, 1979, 1993). La simbiosis como asociación mutualista es definida como la coexistencia de por lo menos dos genomas de distintos orígenes filéticos persistiendo a través de las generaciones subsecuentes, proliferando armoniosamente hasta formar una entidad estable (Trench y Blank, 1987). Los dinoflagelados que viven en este tipo de asociaciones, históricamente se denominaban zooxantelas, aunque este nombre no tiene ningún significado taxonómico.

El establecimiento de una simbiosis se lleva a cabo cuando el simbiote se integra a un hábitat celular. Este hábitat puede ser intracelular o intercelular. Cuando el simbiote penetra dentro de las células del hospedero que lo envuelven por completo dentro de una vacuola o dentro del citoplasma, se dice que su ubicación



es intracelular, como es el caso de los corales. El simbiote es intercelular, cuando este se encuentra entre las células del hospedero como es el caso de los moluscos tridácnidos (Smith, 1979).

El éxito de estas asociaciones se debe al movimiento de moléculas entre el hospedero y el simbiote en ambas direcciones. El hospedero proporciona a los fotobiontes los nutrientes que requieren para su crecimiento, lo que permite a la asociación colonizar un rango más amplio de hábitats. Los dinoflagelados simbiotes dentro del hospedero traslocan una gran cantidad de carbono orgánico en forma de glicerol, y en algunas algas aisladas se ha encontrado la liberación hasta del 90% del carbono orgánico producido en fotosíntesis (Trench, 1979; Muscatine et al., 1981; Falkowski et al., 1984). El glicerol es utilizado por el hospedero como fuente de energía, los aminoácidos (alanina y leucina) son empleados en la síntesis de proteínas, los ácidos grasos en la producción de lípidos que pueden ser utilizados durante un periodo de falta de alimento o de mayor desgaste de mantenimiento como ocurre durante la reproducción (Battey y Patton, 1984; Battey, 1992; Yellowlees y Warner, 2003). Por otro lado, los hospederos animales liberan productos de desechos metabólicos de la alimentación que son fuente del fósforo y de los compuestos nitrogenados en forma de amonio, que



necesita el alga (Fitt, 1984). El nitrógeno está potencialmente disponible en el ambiente simbiótico como NH_4^+ (iones de amonio) o como NO_3^- (nitratos) (Capone y Carpenter, E. 1999).

La habilidad del dinoflagelado para realizar fotosíntesis y además traslocar el producto de ésta al hospedero, es un éxito en las especies que se encuentran en los arrecifes como es el caso de *Tridacna crocea* (Banaszak, 1985), *T. gigas* (Fisher et al., 1985) y corales. Los dinoflagelados aportan los requerimientos diarios de carbono al hospedero proporcionándole otra fuente de alimentación en las aguas oligotróficas, características de los arrecifes de coral. De esta manera el holobionte puede competir exitosamente en su ambiente natural.

Las asociaciones simbióticas entre los dinoflagelados simbiotes y corales arrecifales son de gran importancia en ecosistemas tropicales (Paracer y Ahmadjian, 2000). Las algas simbiotes viven en el interior de las células de la cavidad digestiva del pólipo del coral. En algunos casos más del 90% de los fotosintetatos pueden ser liberados por el simbiote para las células del hospedero (Muscatine, 1990; Paracer y Ahmadjian, 2000). Los corales con algas simbiotes depositan carbonato de calcio mucho más rápido que los corales que no tienen algas. Las



algas estimulan la calcificación mediante la fotosíntesis y proveen al coral con oxígeno. El hospedero desecha productos semejantes a amonio que son convertidos por el alga en aminoácidos que son trasladados al hospedero.

El análisis de la distribución filética de los dinoflagelados y los grupos de hospederos demuestra que hay una especificidad en donde una entidad interactúa exclusivamente con otra, lo cual implica un proceso selectivo por parte del hospedero o del simbiote. La adquisición de dinoflagelados simbiotes por la progenie del hospedero se puede llevar a cabo mediante dos procesos: a) adquisición maternal en donde la progenie recibe directamente de la hembra una porción de la población maternal de algas (conocido como herencia materna) o, b) adquisición de los simbiotes del medio ambiente por uno de los estadios larvales (Trench 1979). Algunos ejemplos de los organismos que adquieren los simbiotes mediante el sistema cerrado son los hidrozoarios (coral de fuego), los alcionarios (corales blandos), los actinarios (anémonas) y varias especies de corales escleractinios. La adquisición de los simbiotes del medio ambiente ocurre en los scyphozoa (medusas), anthozoa (corales), los gorgonaceos, los platelmintos, y moluscos bivalvos de la familia Tridacnidae. Este mecanismo es posible porque las algas simbiotes pueden ser ocasionalmente liberadas por los hospederos



dispersándose en las corrientes de agua quedando disponibles para entrar en simbiosis con otros hospederos. Es posible infectar a varios hospederos con algas del género *Symbiodinium* en el laboratorio, por ejemplo: los juveniles del gorgonáceo *Pseudopterogorgia bipinnata*, el scyphistoma (pólipo) de la medusa *Cassiopea xamachana* y los juveniles de las almejas gigantes *Tridacna* spp. e *Hippopus hippopus* consiguiendo mayor supervivencia y crecimiento (Trench y Fitt, 1981).

Los dinoflagelados presentan reproducción asexual de las células vegetativas, multiplicándose por mitosis y produciendo poblaciones de células idénticas (Coats, 2002). Dunbar (1975) utilizando cultivos axénicos de zooxantelas aisladas de *Cassiopeia* sp., describió el ciclo de vida de las zooxantelas el cual está constituido por etapas de enquistamiento alternadas con fases móviles. Las células pueden enquistarse formando membranas gruesas que acumulan abundante reserva alimenticia con lo cual se hacen resistentes a las condiciones extremas del medio. Este tipo de enquistamiento es más frecuente en las especies dulceacuícolas y puede tener lugar en las especies marinas. Las formas no móviles producen zoosporas biflageladas. En este caso las células se redondean y liberan una o más células dinoflageladas típicas, desprovistas de prolongaciones y la reproducción



sexual es rara (Scagel et al., 1987). En otras observaciones sugieren dos posibles rutas sobre el ciclo de vida de *S. microadriaticum*. a) Células cocoides dentro de una membrana rígida, emergiendo células móviles haploides y b) todas las células son diploides (Taylor, 1973). Asumiendo que la etapa cocoide es haploide, las células móviles bajo ciertas condiciones pueden unirse para formar un cigoto. La división meiotica clásica produce cuatro células haploides. Las células tétradas (alternativamente) pueden ser el producto de la división mitótica. Por otro lado, si la célula cocoide es diploide, es difícil distinguir gametos de células móviles diploides.

Los dinoflagelados corresponden a un grupo de fitoplancton marino de carácter cosmopolita. Sus características morfológicas y requerimientos nutricionales los hacen exitosos desde el punto de vista reproductivo (De Castillo y Loppeto, 1983; Margulis y Schwartz, 1985; Paracer y Ahmadjian, 2000). Los dinoflagelados son unicelulares y fundamentalmente biflagelados, aunque existen formas aflageladas cocoides, filamentosas, palmeloides o ameboides, relacionadas con la diversidad de medios de nutrición. Los dinoflagelados son generalmente fotosintéticos, aunque también hay formas heterótrofas (saprofíticas, parásitas, simbióticas y holozoicas).



Los pigmentos de los dinoflagelados son las clorofilas *a* y *c*, el betacaroteno, las xantofilas, la peridinina, la neoperidinina, la dinoxantina, la neodinoxantina y la diatoxantina. Entre los cuales la peridinina y la dinoxantina son los únicos que se encuentran en esta división; la peridinina es el pigmento pardo al cual se debe el color característico del grupo. Las reservas alimenticias se almacenan en forma de almidón. El núcleo tiene características intermedias entre procariontes y eucariontes (Margulis y Schwartz, 1985). La pared celular, cuando está presente, está compuesta principalmente de celulosa. Las placas de celulosa forman lo que se conoce como teca, la cual puede tomar diferentes formas (Kumar y Singh, 1979 Van Den Hoek et al., 1995).

Existen dos clasificaciones de dinoflagelados basados en la pared celular o teca, las cuales son conocidas como dinoflagelados tecados y dinoflagelados atecados. Las placas de naturaleza celulósica que forman parte de la pared celular de estos organismos, son la característica taxonómica más importante ya que su forma, número y posición es propia de cada especie (Faust y Gullette, 2002). En los dinoflagelados atecados, las placas celulósicas están muy reducidas y no pueden ser usadas para taxonomía.



Los dinoflagelados tecados presentan una estructura celular la cual se divide en dos regiones denominadas epiteca en la parte superior, mientras que la inferior se denomina hipoteca. Ambas se encuentran separadas por el cíngulo, que aloja al flagelo transversal, y en la región ventral de la hipoteca se encuentra el sulco que aloja al flagelo longitudinal (Fig. 1a y b).

Los dinoflagelados atecados presentan las mismas estructuras, pero en este caso las placas celulósicas están reducidas, estas regiones son conocidas como epicono e hipocono (Fig. 1c) (Ferrandiz, 1970; Barnes, 1980).

El género *Symbiodinium* pertenece a los dinoflagelados atecados presentan un tamaño aproximado de 10 μm , tienen forma ovoide con un vértice transversal que rodea a toda la célula. El epicono e hipocono son casi iguales longitudinalmente, pero el epicono es un poco más ancho que el hipocono. Sin embargo, en células de *Symbiodinium* aisladas de diferentes hospederos, se han encontrado grandes diferencias fisiológicas, bioquímicas (en los patrones de isoenzimas), morfológicas, capacidad de infección, en la composición de ácidos grasos y esteroides y en la estructura molecular de las antenas fotosintéticas (Barnes, 1980; Iglesias et al., 1993; Parecer y Ahmadjian, 2000).

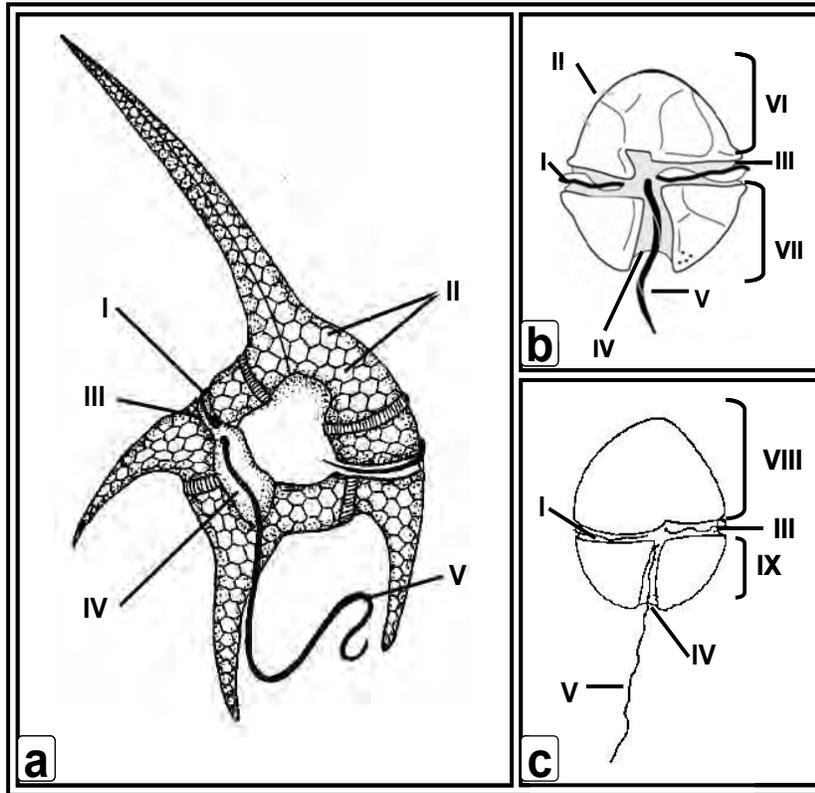


Figura 1. Estructura celular de dinoflagelados (a) y (b) tecados (Antonine Morin (1979) y (c) atecados (Ferrandiz, 1970). (I) Flagelo transversal, (II) Placas celulósicas, (III) Cíngulo, (IV) Sulcus, (V) Flagelo longitudinal, (VI) Epiteca (VII) Hipoteca (VIII) Epicono e (IX) Hipocono (Barnes, 1980).

En los años 60 se aisló *Symbiodinium microadriaticum* de *Cassiopeia xamachana* (Freudenthal, 1962) y por mucho tiempo se creyó que éste representaba la única especie de simbiote fotosintético que colonizaba todos los invertebrados en donde se encontraban algas microscópicas de color amarillo-café.



Sin embargo, en 1987, Trench y Blank describieron cuatro diferentes especies: *Symbiodinium goreauii*, *S. kawagutii*, *S. pilosum* y *S. microadriaticum* cada uno aislado de un hospedero diferente: *S. goreauii* es el simbiote de una anémona del Caribe (*Radactis lucida*), *S. kawagutti* es el simbiote del coral *Montipora verrucosa* y *S. pilosum* es el simbiote de *Zoanthus sociatus* (Banaszak et al., 1993). Debido a la dificultad en describir especies de manera tradicional se ha utilizado el análisis genético mediante técnicas de biología molecular. Basado en el análisis de subunidades ribosomales ejemplares de *Symbiodinium* fueron originalmente separados en tres clades (A, B y C) (Rowan y Powers, 1992).

La clade es un taxón filogénico en donde un grupo de organismos incluyen características de su antecesor más reciente común a todo el grupo, clasificándose según la secuencia de su DNA (LaJeunesse, 2001). Hasta la fecha se han reconocido 8 clades distintas de *Symbiodinium* (A, B, C, D, E, F, G, H e I) (Santos y Coffroth 2006, Pochon et al., 2012). Estas clades se han encontrado en una gran variedad de hospederos como son Cnidaria (corales, octocorales y anémonas) Moluscos (Tridacnas y Strombus), Poríferas (esponjas) y Protozoa (foraminíferos) (LaJeunesse 2005, et al., 2012; et al., 2015; Stat et al., 2006; Lee et al., 2015).



El papel de *Symbiodinium* en asociaciones simbióticas

Foraminíferos y Radiolarios

Los foraminíferos presentan conchas traslucidas de carbonato de calcio, el citoplasma se encuentra dividido en cámaras dentro de la concha, una delgada capa del citoplasma cubre el exterior de la concha, y se ha determinado que esta capa citoplásmica contiene dinoflagelados. (Lee y Go, 1997).

La relación funcional entre foraminíferos y las algas simbiotas es poco conocida. Se ha determinado que las algas fotosintéticas incrementan la tasa de calcificación para retirar el exceso de CO² en los foraminíferos y aportar carbón orgánico al hospedero. Las algas reciben nitrógeno, fósforo y vitaminas del hospedero, se ha observado que esta asociación puede reciclar nitrógeno (Lee y Go, 1992).

En un estudio realizado por Hallock et al., (1986, reportado en Reisser, 1992) determinaron que la presencia de dinoflagelados y la exposición a luz (40 μmol cuanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de estos, permitió un crecimiento mas acelerado del organismo en el laboratorio.



Los radiolarios presentan conchas de sílice que protege al citoplasma, este citoplasma se extiende hasta la parte externa del cuerpo a manera de red, en donde se encuentra una gran cantidad de dinoflagelados simbiotes, el exceso de fotosintetatos orgánicos producidos por los dinoflagelados es aprovechado por el hospedero radiolario como fuente complementaria de nutrientes (Barnes, 1989). Mediante análisis de radiactividad se ha determinado el movimiento de carbón orgánico producido por las algas durante la fotosíntesis al hospedero. Por su parte el alga simbiote asimila productos de desecho del hospedero, semejante a amonio y dióxido de carbono.

En algunos foraminíferos y radiolarios, los dinoflagelados se mueven fuera de la concha durante el día y en la noche son nuevamente devueltos al interior por el citoplasma del hospedero. Esta exposición diaria de las algas al sol facilita la fotosíntesis y la transferencia de nutrientes al hospedero (Paracer y Ahmadjian, 2000).

Anémonas marinas y medusas

Las anémonas *Anthopleura xanthogrammica* contienen dos tipos de algas simbiotes: Zooclorelas y zooxantelas, la relativa proporción de cada tipo de alga



depende de la temperatura del agua. A altas temperaturas (26°C) las zooxantelas son más comunes y a bajas temperaturas (12°C) las zooclorelas predominan y translocan pequeñas cantidades de carbono. El alga posiblemente abastece al hospedero de carbono lo que estimula el crecimiento del hospedero, probablemente el alga recibe nitrógeno y fósforo de la anémona. (Palincsar et al., 1988).

En la medusa *Cassiopeia xamachana* el *Symbiodinium* se localiza en el interior de las células del endodermo (Trench y Fitt, 1981). La medusa *C. xamachana* tiene un ciclo de vida que presenta una etapa sexual que incluye algas simbióticas *Symbiodinium* y una etapa asexual que presenta pólipos (scyphistoma) que carecen de algas. Si los pólipos no adquieren los dinoflagelados simbiosntes no hay estrobilación por lo tanto no hay liberación de éfiras y permanecen en esta fase.

Si se lleva a cabo la adquisición de simbiosntes por los pólipos ocurre la estrobilación en donde hay una liberación de efiras, y se concluye el ciclo obteniendo adultos de medusas. Se ha determinado la liberación de fotosintetatos por el alga en su mayoría como glicerol, glucosa y alanina (Trench et al., 1981a; Hofmann y Brand, 1987).



Corales

Los corales han desarrollado varias formas de alimentación, son heterótrofos ya que consumen plancton y moléculas disueltas en el agua. Por otra parte, muchas especies de corales reciben fotosintatos de las algas simbióticas conocidas como zooxantelas. (Muller-Parker et al., 2015).

Debido a lo anterior, las asociaciones simbióticas entre los dinoflagelados simbioses y corales arrecifales son de gran importancia en ecosistemas tropicales (Roberts, 1993 en Parecer et al., 2000) ya que soportan una gran comunidad de organismos, dan protección a la línea de costa y abastecen a muchas poblaciones con bienes y servicios tales como alimento (Peterson y Peterson, 1997; Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007). El dinoflagelado se localiza en tejidos transparentes donde queda expuesto a la radiación solar (Muscatine, 1990). Las algas simbioses viven en el interior de las células de la cavidad digestiva del pólipo del coral. En algunos casos más del 95% de los fotosintatos (glucosa y glicerol) pueden ser liberados por el simbiote para las células del hospedero (Muscatine, 1990 en Parecer et al., 2000; Van Oppen, 2007). Colombo et al., 2017 evaluaron corales blanqueados, mostrando que hay una tasa de calcificación positiva y significativamente mayor



cuando se les proporciona glicerol, lo que demostró que la fuente de energía que permite estimular la calcificación procede fundamentalmente de los productos translocados por las algas simbiotas, donde el glicerol es uno de los productos más translocados. Cuando se suministra artificialmente glicerol en corales blanqueados que han perdido la capacidad de hacer fotosíntesis, se puede estimular de nuevo la calcificación del coral. Además, la adición de oxígeno en los corales blanqueados también promueve la calcificación en la misma medida que la observada en el tratamiento con glicerol, por lo que no sólo el glicerol sino también el oxígeno producido por la fotosíntesis de las algas, explican por qué la luz estimula la calcificación de los corales simbióticos. Si en oscuridad se les suministra a los corales blanqueados oxígeno y glicerol, estos pueden incrementar significativamente la calcificación. Por tanto, no es la luz ("light enhanced calcification") sino los productos de la fotosíntesis de las algas simbiotas, los que juegan un papel fundamental en la calcificación simbiótica del coral, que debe ser visto como un proceso "photosynthesis-driven" (Colombo et al., 2017). El hospedero obtiene vitaminas, elementos traza, y otros compuestos esenciales de la digestión del plancton. El hospedero desecha productos semejantes a amonio que son convertidos por el alga en aminoácidos que son translocados al hospedero. (Van Oppen, 2007; Sheppard et al., 2009; Muller-Parker et al., 2015).



El éxito de la presencia de los corales donde las concentraciones de los principales nutrientes limitantes del crecimiento (nitrógeno y fósforo) son muy bajas, los corales conservan el nitrógeno al tener bajas tasas de catabolismo proteico y catabolizar los lípidos y carbohidratos translocados. Las algas pueden obtener nutrientes inorgánicos a través del reciclaje de los productos de desecho del coral, y de los nutrientes de la absorción de compuestos inorgánicos disueltos de la captura del agua marina y del zooplancton por el coral. (Muller-Parker et al., 2015).

Por otro lado, la estructura plana y ramificada del esqueleto de los corales juega un papel muy importante al hacer más eficientes el incremento de la dispersión de la luz, mejorando sensiblemente la eficiencia de absorción de la luz de los simbioses del coral, y desempeñando un papel clave en la regulación del campo de luz difusa interno por lo que mejora el entorno de luz local de sus simbioses, teniendo una mayor área de recolección de energía solar (Enríquez et al., 2017).

La alta productividad de los arrecifes de coral ocurre a poca profundidad (50 m) en aguas tropicales con pocos nutrientes. La producción de pigmentos por los simbioses del coral protege al hospedero y a las algas de nocivos efectos de radiación ultravioleta (Dotts y Jacobs, 2000).



***Symbiodinium* y Moluscos**

En los moluscos, el género en donde más se ha investigado y publicado sobre su relación con *Symbiodinium* es *Tridacna* spp., cuyas especies se distribuyen en el Indo-Pacífico en los arrecifes de coral. En *Tridacna*, *Symbiodinium* se localizan en toda la cavidad visceral, incluyendo el corazón, el estómago, la glándula digestiva, el manto, el intestino, el sistema visual (constituido por muchos ojos localizados a lo largo del margen del manto, formados por una capsula rectangular, una línea de células retinales y el nervio óptico). Además, se encuentran en túbulos uniendo al estómago y al manto (Wilkins, 1986; Norton et al., 1992; Hirose et al., 2006). La ubicación de los dinoflagelados dentro de los tejidos es extracelular y los dinoflagelados se observan morfológicamente intactos y con la capacidad de llevar a cabo división celular (Fitt y Trench, 1981; Fitt, 1984) y de realizar fotosíntesis como se ha comprobado en *Tridacna crocea* (Banaszak, 1985) y *T. gigas* (Fisher et al., 1985).

En los moluscos bivalvos de la familia Tridacnidaea y *Corculum cardissa* las conchas presentan un amplio espesor (Barnes, 1989), sin embargo, estas especies de



Tridacna e *Hippopus* se caracterizan por extender el manto al exterior de la concha en donde se encuentra la mayoría de la población de simbioses por lo que quedan expuestos a la máxima irradiación solar (Banaszak, 1985; Fisher et al., 1985).

La luz es uno de los factores claves en estas asociaciones simbióticas debido a que *Symbiodinium* convierte la energía lumínica a energía química lo cual utiliza para formar carbohidratos, por lo que la simbiosis es un efectivo reciclamiento de nutrientes vital para la alta productividad en aguas oligotróficas (Fitt, 1984, Jantzen et al., 2008). Una característica de los moluscos donde se ha registrado la presencia de *Symbiodinium* (principalmente *Tridacna*) es el gran tamaño con respecto a los demás géneros. Lo anterior es importante evolutivamente ya que denota la ventaja proporcionada por la asociación simbiótica tanto en la supervivencia como en el crecimiento del molusco en un ambiente con escasos nutrientes (Fitt y Trench, 1981).

Symbiodinium* y *Strombus

En 9 especies de 22 moluscos gasterópodos del mar rojo entre ellos un representante de la familia Strombidae (*Strombus tricornis*) se ha observado la presencia de algas del tipo de los dinoflagelados en órganos internos como el



hepatopáncreas y la gónada, ocultos dentro del espiral de la concha, donde la penetración de la luz es entre 5 y 15% del ambiente afuera de la concha (Bernet et al., 1986a). Análisis de pigmentos de estas algas indica la presencia de clorofila *a*, *c*, y piridinina, los cuales son pigmentos típicos de dinoflagelados y estos mismos son capaces de llevar a cabo fotosíntesis (Bernet et al., 1986b).

En una asimilación de ^{14}C por las algas aisladas del *Strombus tricornis* se demostró que los dinoflagelados producen fotosintetatos y los autores propusieron que estos productos de fotosíntesis podrían ser utilizados por el hospedero (Berner et al., 1986 a y b). Aunque no se ha comprobado si las algas son capaces de hacer fotosíntesis *in hospite* y tampoco si el caracol utiliza los productos de esta posible actividad.

Lobatus gigas

El caracol rosado *Lobatus gigas* anteriormente *Strombus gigas*, (Landau et al., 2008), es una especie típica de la fauna caribeña (Brownell, 1976), distribuida desde las Bermudas hasta las Bahamas, y de ahí hacia el Mar Caribe, alcanzando la costa sur del Golfo de México y cubriendo las costas de Brasil. En el Caribe, *L. gigas* es conocido con varios nombres, por ejemplo, en México se le conoce como caracol



rosado o de abanico, en Estados Unidos como caracol reina, en Venezuela como botuto o guarura, en Puerto Rico como cartucho y en Cuba como cobo. El caracol rosado juega un importante papel ecológico en las comunidades marinas bentónicas ya que se alimenta principalmente de detritos y epífitas de pastos marinos y/o de macroalgas, así como de cantidades significativas de arena y al ser el gran herbívoro de los mares del Caribe es a la vez alimento para otros organismos de importancia pesquera como la langosta espinosa, cangrejos, rayas, mantarrayas, peces, tortugas y pulpos (Randall, 1964b, Álvarez et al., 2007). Los estudios experimentales en los Cayos Exuma en las Bahamas encontraron que el pastoreo del caracol *L. gigas* tiene un importante efecto en la regulación de la abundancia del detrito de los pastos marinos y en la estructura global de las comunidades de macrofauna (Stoner et al., 1995; 1997).

Desde los años 1980, el caracol *L. gigas* ha sido un recurso comercial importante y lucrativo para los países con costas en el Caribe, tal es el caso del estado de Quintana Roo en México, donde ocupó un lugar muy importante como recurso pesquero (Leroy, 1984). Su captura excedió las 340 toneladas de pulpa anuales, siendo una de las más grandes en toda el área, acercándose solamente a las realizadas en Belice (De la Torre, 1984). La carne del caracol rosado es una fuente



importante de proteínas y a partir de su concha se obtienen algunos productos como son: lima para mortero y material para la manufactura de porcelanas y artesanías (Berg, 1976). Actualmente, la pesquería de caracol en el Golfo de México ha desaparecido y en el Mar Caribe ha declinado notablemente, debido principalmente a la sobre-explotación de la que ha sido objeto, colocando las poblaciones en una situación crítica para su supervivencia (Berg, 1976; Chanley, 1982; De la Torre, 1984). En 1989 la pesquería fue cerrada en Yucatán y desde 1990 a 1996 la pesquería de *Lobatus* estaba cerrada en estado de Quintana Roo con la excepción de Banco Chinchorro. En Noviembre del 2012 la pesquería fue cerrada en su totalidad hasta Febrero del 2017 (CITES, 2012). Esta situación ha causado un interés en el cultivo de caracol *S. gigas* hasta la etapa juvenil.

El caracol *L. gigas* comúnmente se encuentra a una profundidad de 30 metros, aunque algunos adultos se pueden encontrar desde la zona intermareal hasta los 70 metros de profundidad; sin embargo, la mayoría de los individuos no se desplazan a más de 40 metros (Appeldoorn y Sanders, 1984a, García et al., 2012). Es un habitante común de sedimentos marinos arenosos y praderas de pastos integrados principalmente por *Thalassia testudinum* y *Syringodium filiforme* a



profundidades de 4 a 8 m (Randall, 1964b; Brownell, 1977; Weil y Laughlin, 1984; Hahn, 1989; Stoner y Davis 2010).

El hábitat juega un papel muy importante en el desarrollo y distribución de *L. gigas*. Los cambios de hábitat están asociados con la edad de los organismos, ya que los juveniles se desarrollan mejor y se protegen de los depredadores en la pradera submarina, siendo diferente para los caracoles adultos, que prefieren los substratos arenosos para su desarrollo y actividad reproductiva (Stoner y Sandt, 1991).

Las áreas de reproducción más productivas se encuentran en los substratos arenosos a profundidades entre 5 y 6 m (Stoner, 1997). Son organismos que presentan sexos separados, la fecundación es interna, la cópula y el desove ocurren durante los meses más cálidos del año, aunque se ha observado que ocurren con mayor intensidad en el mes de agosto (D'Asaro, 1965; Jung, 1971; Blakesley, 1977). La maduración sexual se alcanza a los cuatro años de edad o alrededor de los 20 cm de longitud sifonal, caracterizada por el desarrollo del abanico de la concha (Berg, 1976), mientras que la longevidad del caracol excede los 20 años con una longitud sifonal máxima de 30 cm y un peso total de 3 a 5 kg con concha (Randall,



1964a, 1964b; Adams, 1970; Alcolado, 1976; Berg, 1976; Brownell y Stevely, 1981; Huston, 1985; Appeldoorn, 1988; Jory e Iversen, 1988; Lewis, 1989).

La hembra muestra preferencia por un sustrato de arena limpia con bajo contenido orgánico para depositar la masa de huevos (D'Asaro, 1965; Laughlin y Weil, 1983; Buitrago, 1985). Una hembra es capaz de depositar de 3 a 4 masas de huevos en un mes formando una masa compacta en forma de media luna (Pérez y Aldana, 2003), por lo que en promedio produce 28 masas de huevos por hembra por temporada (Hesse y Hesse, 1977; Weil y Laughlin, 1984). La puesta de huevos toma entre 24 y 36 horas y consiste en un tubo continuo lleno de huevos (Pérez y Aldana, 2003). La masa de huevos, una vez depositada en el sedimento, se cubre completamente con granos de arena, adheridos al delgado filamento pegajoso que la rodea y protege y que es secretado por la hembra (Davis, 2005), lo que disminuye la posibilidad de que sea depredada. La masa ovígera es depositada conformando un rosario, con una longitud aproximada de 24 a 37 m, con un contenido de 12 a 15 huevos por mm. Esta masa se forma por un promedio aproximado de 250 000 a 500 000 huevos (D'Asaro, 1965; Brownell, 1977; Iversen, 1983).

Después del desarrollo embrionario (primera división, segunda división, mórula y gástrula), da inicio el desarrollo de la larva trocófora (presenta movimientos lentos,



cilios cortos, primordios del pie y ojos) dentro del huevo. Estas etapas duran aproximadamente de 3 a 5 días y posteriormente eclosiona la larva veliger planctónica. La veliger es de hábitos pelágicos y en esta etapa forma parte del zooplancton marino. Este período dura aproximadamente 21 días (Brito y Aldana, 2000; Davis, 2005). Entre los 20 y 25 días las larvas cambian sus hábitos planctónicos por bénticos dando origen a una metamorfosis radical: el organismo desarrolla una probóscide, se forma la branquia, los ojos migran hacia la región anterior, y se forma un opérculo (Davis, 1994, 2005). Luego de la metamorfosis que origina pequeños caracoles a los 45 días se observan juveniles de 1 cm de longitud, los cuales se alimentan de diatomeas y algas filamentosas (Buitrago, 1985; Davis 2005).

Cuando entran a la etapa juvenil es difícil encontrar los caracoles rosados en el ambiente natural y solamente se vuelven a observar cuando tienen un tamaño aproximado de 10 cm (Little, 1965; Ballantine y Appeldoorn, 1983; Rodríguez, 1986; Ogawa y Coral, 1987). Sin embargo, en algunos casos se ha observado que una vez que ocurre la metamorfosis, los caracoles permanecen enterrados en la arena la mayor parte del tiempo, hasta después del primer año de vida (Berg, 1974; Goodwin, 1983; Appeldoorn, 1985; Stoner, 1989; Stoner y Waite, 1990).



El crecimiento de los juveniles en condiciones naturales es relativamente rápido, en promedio 0.9 cm/mes en longitud de la concha. Los caracoles juveniles se distribuyen en los lechos de pasto marino a profundidades cercanas a 1 m donde el alimento es abundante y existe poco oleaje (Sidall, 1983, 1984; Appeldoorn, 1984b; Sandt y Stoner, 1993). En un área protegida en México, los juveniles crecen en promedio de 0.84 cm/mes (Peel y Aranda, 2012).

Después de 4 años, éstos alcanzan su estado adulto, llegando a medir 30 cm y pesar cerca de 3 a 5 Kg (Randall, 1964a, 1964b; Adams, 1970; Alcolado, 1976; Berg, 1976; Brownell y Stevely, 1981; Appeldoorn 1988; Jory y Iversen, 1988). (Fig. 2).

L. gigas es una especie completamente herbívora ramoneadora (Chanley, 1982; Davis et al., 1984); utiliza su larga probóscide para raspar las algas epífitas adheridas a las rocas y a las hojas de pastos marinos, así como algas cianofíceas que cubren los granos de arena (Randall, 1964a). No obstante, se ha demostrado en experimentos en el laboratorio que los caracoles en la etapa de larva veliger pueden alimentarse de partículas suspendidas en el agua (Martínez, 1990).

En un ejemplar del caracol *L. gigas* recolectado de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, LaJeunesse (2002) identificó dos tipos de *Symbiodinium*, en la glándula

digestiva (C4) y en el tracto digestivo (C4 y B1), que son asociados en simbiosis mutualista con otros invertebrados marinos. La presencia de *Symbiodinium* en sus

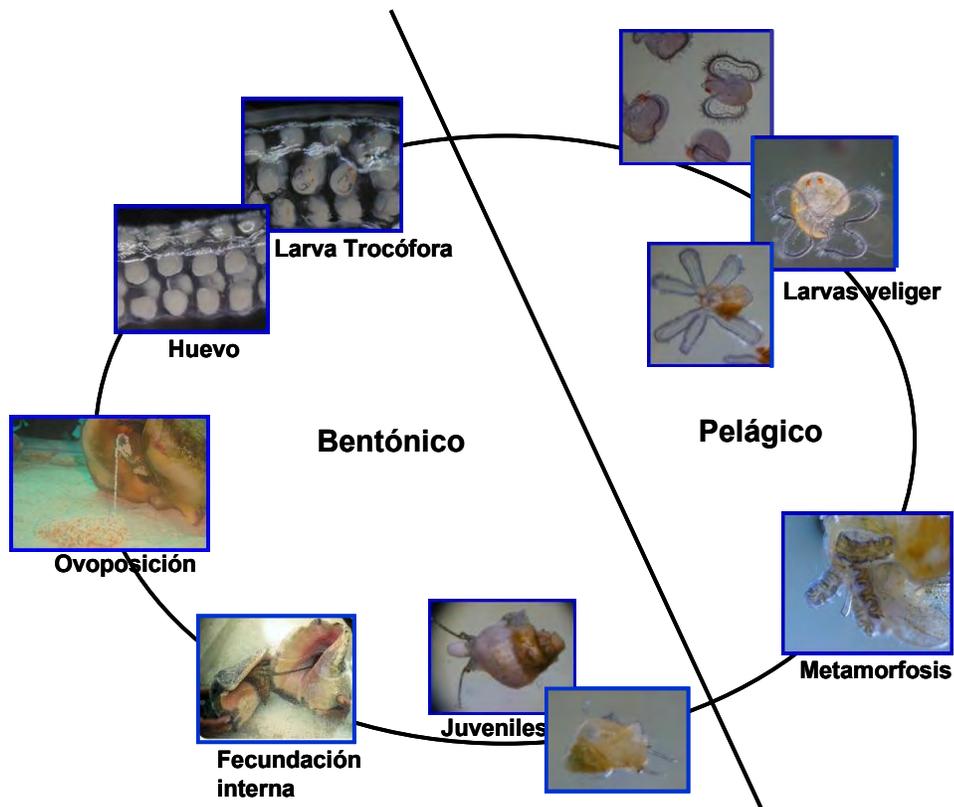


Figura 2. Ciclo de vida del caracol rosado *Lobatus gigas*, la línea divisoria representa los dos hábitats (bentónico y pelágico) presentes en el gasterópodo. Ciclo tomado de Davis (1994, 2005) y modificado por Maribel García Ramos.

tejidos y órganos deja especular que estos dinoflagelados pueden estar en una asociación íntima con el caracol *L. gigas*. Por todo lo anterior, la simbiosis que



establece *L. gigas* con *Symbiodinium* es fundamental para el completo desarrollo del ciclo de vida.

La tesis, está constituida por tres capítulos. Se presenta como Capítulo I "Distribución y actividad fotoquímica del dinoflagelado *Symbiodinium* en caracoles adultos de *Lobatus gigas*" el cual ha sido publicado en la revista Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. con el título "The symbiosis between the gastropod *Strombus gigas* and the dinoflagellate *Symbiodinium*. An ontogenic journey from mutualism to parasitism". Los resultados presentados en el Capítulo II "Adquisición del dinoflagelado *Symbiodinium* por el caracol rosado *Lobatus gigas*" y Capítulo III "Preferencia de la larva veliger de *Lobatus gigas* por *Symbiodinium* aislado de diferentes hospederos" se encuentran publicados en el artículo titulado "Symbiotic Association Between *Symbiodinium* and the Gastropod *Strombus gigas*. Larval Acquisition of Symbionts" en la revista Marine Biotechnology.

CAPITULO 1

**Distribución y actividad fotoquímica del
dinoflagelado *Symbiodinium* en caracoles adultos de
*Lobatus gigas***



Introducción

La simbiosis es definida como la coexistencia de por lo menos dos genomas de distintos orígenes filéticos (en este caso, dinoflagelados fototróficos con invertebrados heterótrofos) que proliferan armoniosamente, dando como resultado una entidad estable, que persiste a través de las generaciones subsecuentes (Trench, 1979, 1987; Trench y Blank, 1987).

Symbiodinium forma asociaciones simbióticas principalmente con hospederos habitantes de arrecifes coralinos en aguas tropicales. El éxito de asociaciones entre *Symbiodinium* y sus hospederos se debe a la capacidad del simbiote de proporcionarle al hospedero una fuente de alimentación alternativa en aguas oligotróficas, características de los arrecifes de coral (Fournier, 2013).

Los simbioses realizan fotosíntesis y proporcionan los fotosintetatos al hospedero, así aportando los requerimientos diarios de carbono. En cambio, el hospedero proporciona nutrientes al simbiote y en el caso de los corales que presentan una estructura del esqueleto plana o ramificada son más eficientes en incrementar la



dispersión de la luz, lo que ha jugado un papel muy importante en la historia evolutiva de los corales escleractíneos, mejorando sensiblemente la eficiencia de absorción de la luz de los simbioses de coral, y desempeñando un papel clave en la regulación del campo de luz difusa interno. Lo que permite que el organismos sea más eficientes para mejorar el entorno de luz local de sus simbioses, teniendo una mayor área de recolección de energía solar. Son además organismos que han desarrollado el grado más alto de integración colonial (Enríquez., et al 2017). Lo que les permite colonizar hábitats de forma exitosa. De este modo, el holobionte, puede competir exitosamente en su ambiente natural (Trench, 1979; Trench et al., 1981b; Klumpp y Griffiths, 1994).

Symbiodinium fue descrita como una especie (*S. microadriaticum*) por Freudenthal (1962). Sin embargo, Trench y Blank, (1987) describieron cuatro diferentes especies: *Symbiodinium microadriaticum*, *S. goreauii*, *S. kawagutii*, y *S. pilosum* usando evidencia de comportamiento, fisiología, bioquímica, ultraestructura y análisis de cromosomas, cada uno aislado de hospederos diferentes. Hasta la fecha se han descrito 12 especies adicionales: *S. californium*, *S. corculorum*, *S. meandrinae*, *S. pulchrorum*, *S. bermudense*, *S. cariborum*, *S. muscatine*, *S. voratum*, *S. minutum*, *S. psygmophilum*, *S. fitti*, *S. trenchi* (Banaszak et al., 1993, LaJeunesse y Trench, 2000;



LaJeunesse, 2001; Pinzón et al., 2011; Wham et al., 2011; LaJeunesse et al., 2012; Jeong et al., 2014). Debido a la dificultad en describir especies de manera tradicional se ha utilizado el análisis genético mediante técnicas de biología molecular. Basado en el análisis de subunidades ribosomales *Symbiodinium* fue separado en tres clades (A, B y C) (Rowan y Powers, 1992). La clade es un taxón filogénico en donde un grupo de organismos incluyen características de su antecesor más reciente común a todo el grupo, clasificándose según la secuencia de su DNA (LaJeunesse, 2001).

Refinando la técnica de Rowan y Powers (1992), LaJeunesse (2001, 2002) utilizó el análisis de espaciadores internos de transcripción (ITS por sus siglas en inglés). La región ITS es una parte no funcional del RNA situado entre las estructuras ribosomales de la subunidad ribosomal pequeña (ssRNA). Este segmento de transcripción no está incorporado dentro del ribosoma maduro debido a que está compuesto por secuencias genéticas poco conservadas que sufren una mayor tasa de mutación. Estas secuencias de escasa relevancia biológica son sin embargo sitios con un potencial informativo muy importante para distinguir tipologías y relaciones filogenéticas en el género *Symbiodinium*. Usando ITS, La Jeunesse encontró 6 clades de *Symbiodinium* (A, B, C, D, E y F). Dentro de estos, LaJeunesse



clasificó diferentes subclades, que nombró 1, 2, 3, etc y subtipos a, b, c, etc. Esta técnica molecular mejoró la resolución filogenética dentro de las clades y permitió distinguir poblaciones fisiológicamente distintas usadas en investigaciones ecológicas. Hasta la fecha se han reconocido 9 clades distintas de *Symbiodinium* (A, B, C, D, E, F, G, H e I) (Coffroth y Santos, 2005; Pochon et al., 2012).

En su análisis de invertebrados que forman asociaciones simbióticas con *Symbiodinium*, representados principalmente por el Phylum Cnidaria recolectados de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, LaJeunesse (2002) identificó los dinoflagelados aislados de sus hospederos. Él determinó que el dinoflagelado de clade B1 era una especie generalista debido a su presencia en casi la mitad de los hospederos mientras que las clades A, C, D, E y F fueron determinadas en menos frecuencia en los invertebrados estudiados. En el mismo trabajo, LaJeunesse (2002) analizó un ejemplar de un molusco gasterópodo, el caracol rosado *Lobatus gigas* encontrando la presencia de *Symbiodinium* en el tracto digestivo (B1 y C4) y la glándula digestiva (C4).

Con respecto a los moluscos gasterópodos, se han observado la presencia de algas en órganos internos del gasterópodo *Strombus tricornis* del mar rojo. Las



microalgas fueron localizadas en la gónada y en el hepatopáncreas oculto dentro del espiral de la concha, donde la penetración de la luz es entre el 5 y 15% con respecto a la del ambiente afuera de la concha (Berner et al., 1986a). Análisis de los pigmentos de estas algas indicaron la presencia de clorofila *a*, *c* y piridinina, los cuales son pigmentos fotosintéticos típicos de dinoflagelados.

Mediciones de asimilación de ^{14}C en las microalgas aisladas de *Strombus tricornis* mostraron que los dinoflagelados producían fotosintetatos. Ya que se encontró ^{14}C en las células del hepatopáncreas en el *S. trocornis*. Aunque los dinoflagelados no fueron identificados, es muy probable que estos sean del género *Symbiodinium* (Berner et al., 1986a).

La fotosíntesis es el proceso por el cual los organismos autótrofos capturan energía lumínica en las membranas tilacoidales (dentro del cloroplasto) y esa energía esta transformada en energía química dando como resultado la liberación de Oxígeno. La energía lumínica es absorbida por antenas que están formadas por pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y *c*) y proteínas que llevan la energía de excitación a los centros de reacción (formados por un tipo de clorofila *a* específico) a cada uno de los fotosistemas. La clorofila *a* de los centros de reacción es el mayor pigmento de



la antena capaz de donar un electrón al primer aceptor y llevar acabo la primera separación de carga en el fotosistema II (Falkowski y Raven, 1997).

Cuando la clorofila *a* absorbe la energía, la energía de excitación esta canalizada hacia tres vías: (1) la fotoquímica cuando es transformada en energía química (ATP y NADPH⁺), (2) la disipación de calor cuando hay exceso de energía lumínica y (3) la emisión inmediata de luz con una longitud de onda mayor con pérdida de energía como fluorescencia. (De La Rivas, 2000; Maxwell y Johnson, 2000).

Los principales parámetros que permiten monitorear la variación de la señal de la fluorescencia de la clorofila son F_v/F_m o máxima eficiencia fotoquímica del fotosistema II. Este parámetro requiere de la determinación de la fluorescencia basal cuando todos los centros de reacción están abiertos (F_0) y de la fluorescencia máxima cuando todos los centros de reacción están cerrados (F_m) (Fig. 3). La fluorescencia variable (F_v) se obtiene de la diferencia entre F_m y F_0 (Krause y Weis, 1991; Maxwell y Johnson, 2000; Yakovleva y Hidaka, 2004).

En este trabajo se determinó la transmitancia de luz a través de las conchas de *L. gigas*, la eficiencia fotoquímica, la distribución y la localización histológica del

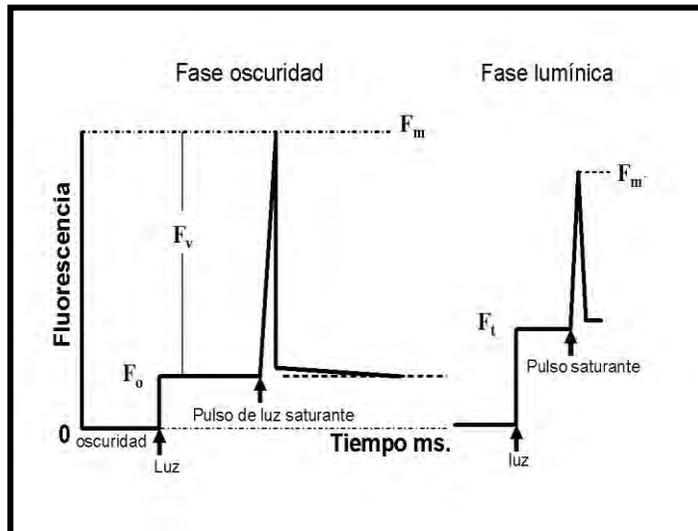


Figura 3. Principales parámetros de fluorescencia medidos en *Symbiodinium* localizado en el interior de *Lobatus gigas*.

simbionte en los órganos y en los tejidos de *L. gigas*. El objetivo fue determinar si la eficiencia fotoquímica y la presencia de *Symbiodinium* en el interior del caracol *L. gigas* es casual, lo que se podría concluir si se encontrara únicamente el simbionte en el lumen del tracto digestivo del caracol, o bien si forman una asociación simbiótica como muchos otros invertebrados arrecifales. La importancia económica del caracol en la pesca comercial, la reducción en sus poblaciones en particular en la Península de Yucatán, y la importancia de *Symbiodinium* en la ecología de organismos arrecifales justifican la investigación de esta asociación.



Hipótesis General de Investigación

El dinoflagelado *Symbiodinium* y el caracol *Lobatus gigas* forman una asociación simbiótica.

Objetivo General

Determinar la distribución y la actividad fotoquímica del *Symbiodinium* en el interior del caracol *L. gigas*.

Objetivos Particulares

Determinar la presencia o ausencia de *Symbiodinium* en diferentes estructuras anatómicas del caracol *L. gigas*.

Determinar si *Symbiodinium* crece y se divide en el interior de *L. gigas*.

Determinar si la ubicación de *Symbiodinium* es intracelular o extracelular.

Describir las condiciones lumínicas en el interior de *L. gigas*.

Determinar si los dinoflagelados localizados en el interior de adultos de *L. gigas* son fotosintéticamente activos.



Materiales y Métodos

Recolecta de organismos

Se recolectaron 4 adultos de *L. gigas* con una longitud sifonal de 20.9, 21.2, 22.6 y 23.8 cm en el campamento pesquero "María Elena" ubicado en el municipio de Felipe Carrillo Puerto frente a Punta Herrero en Quintana Roo, mediante técnicas de buceo SCUBA con la ayuda de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "María Elena" (19° 18' N, 87° 27' O) y del M. en C. Donaldo Martínez Vázquez del Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) en Puerto Morelos del Instituto Nacional de Pesca (INP).

Los organismos fueron colocados en un estanque de fibra de vidrio con una capacidad de 1120 litros con flujo de agua continuo y aireación constante. El suministro de alimento comercial para tilapia fue del 3% de su peso total del organismo una vez por día. El estanque se mantuvo cubierto con una malla de densidad neutral con el fin de atenuar la radiación solar que llegaba al estanque y evitar el aumento de la temperatura del agua y crecimiento de algas por 3 meses

hasta realizar mediciones de eficiencia fotoquímica. Además, se tomaron muestras de heces fecales para su observación bajo el microscopio.

Por otro lado, se recolectaron 11 caracoles adultos de *L. gigas* en tres sitios a lo largo del Caribe Mexicano: Banco Chinchorro (18° 45' N, 87° 18' O) a una profundidad de 10 m en una pendiente arenosa de 10 a 30 m de profundidad, en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (20° 50' N, 86° 52' O) a una profundidad de 3 m y por último en la isla de Cozumel (20° 30' N, 86° 50' O) en una plataforma de laja con escasa arena a 30 m de profundidad (Fig. 4) con la ayuda de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Cozumel" y del M. en C. Donaldo Martínez Vázquez.

Los caracoles fueron desconchados en el sitio de recolecta y la masa visceral fue fijada inmediatamente en formol al 4% en agua de mar filtrada (GF/F, Whatman, Inglaterra). La masa visceral y las respectivas conchas fueron transportadas al laboratorio de Fotobiología de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (Puerto Morelos) perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México para su posterior disección.

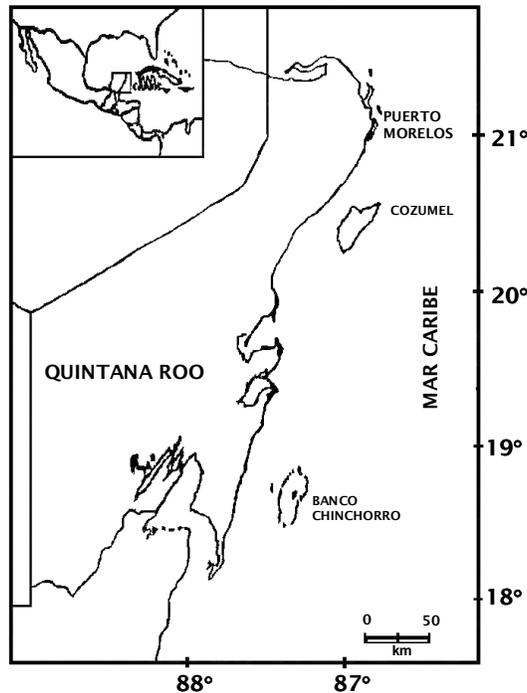


Figura 4. Sitios de muestreo de las muestras del caracol rosado *Lobatus gigas*. (1) Banco Chinchorro, (2) Puerto Morelos e (3) Isla de Cozumel (Mapa tomado de Sosa, 1997).

Disección

Los ejemplares recolectados se diseccionaron obteniendo los siguientes tejidos: el músculo columelar (conocido también como músculo de la concha), el manto, la probóscide y el pie, así como los siguientes órganos: la gónada, el nefridio (glándula excretora en forma de saco ciego que desemboca en la cavidad del manto), la branquia, la glándula digestiva (glándula accesoria del sistema digestivo conocida también como el hepatopáncreas) y el tracto digestivo. Del tracto



digestivo se obtuvo el estómago y el recto (parte final del sistema digestivo por donde se lleva a cabo la liberación de las heces fecales). Las estructuras fueron observadas bajo un microscopio compuesto (Olympus CH20, Japón) para determinar la presencia o ausencia de *Symbiodinium*. Se pesaron las muestras completas de cada órgano o tejido diseccionado y se tomaron submuestras de cada uno de ellos las cuales también se pesaron.

Cuantificación de dinoflagelados

A las submuestras de órganos y tejidos se les añadió un volumen conocido de agua de mar filtrada con GF/F. Se homogeneizaron las submuestras primero con un homogeneizador de tejidos (Tissue Tearor™, Biospec Products, Inc. USA.) y posteriormente con un molinillo de vidrio.

Las muestras que presentaban células de *Symbiodinium* fueron contadas usando un hematocitómetro y un microscopio compuesto. De cada submuestra se tomaron 10 réplicas, se calcularon los promedios y se extrapolaron la cantidad total de dinoflagelados al peso húmedo total de cada órgano y tejido. Asimismo, se cuantificaron las células que se encontraban en división celular para determinar el índice mitótico. El índice mitótico en una población de células, es el número de



células que experimentan división entre el número de células que no se están dividiendo (I. M.).

$$I. M. = \frac{\text{No. de células en mitosis}}{\text{No. total de células}} \times 100 \quad (1)$$

Las células se consideraban en división celular cuando se presenta una pared de división en ellas. Del I. M. se estimó la tasa específica de crecimiento (μ) de algas *in situ* en donde t es 1 día (Wilkerson et al., 1988) calculado como:

$$\mu = \frac{1}{t} \ln (1 + I. M.) \quad (2)$$

Conociendo a μ se puede calcular el tiempo requerido para duplicar el número de células (T) donde:

$$T = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3)$$

Para determinar el volumen que ocupan las células de *Symbiodinium* en la masa visceral del *L. gigas* se tomó el diámetro de 20 células al azar de cada caracol diseccionado, obteniendo el volumen total en mm³ asumiendo que las células tienen forma de esfera.



Análisis histológico.

Para determinar la ubicación celular de *Symbiodinium*, se diseccionaron tres ejemplares de *L. gigas* y se obtuvieron muestras de los tejidos del manto, probóscide y del pie y de los siguientes órganos: la gónada, el nefridio, la glándula digestiva, la branquia, el estómago y el recto. Las muestras fueron procesadas según Danilatos (1998); Yamada et al., (1983) y Vázquez y Echeverría (2000). En breve las muestras fueron fijadas en formol al 4% en agua de mar filtrada. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas en concentraciones de etanol crecientes del 30 al 100%.

El alcohol utilizado fue grado reactivo al 99.9% (Merck). Una vez completamente deshidratadas, las muestras fueron incluidas en parafina líquida. Se realizaron cortes seriales transversales y longitudinales de 7 micras de grosor. Los cortes fueron montados en portaobjetos y secados en una estufa a 58°C durante 15 min. Posteriormente, se procedió a la tinción del tejido con hematoxilina y eosina y montados con resina de Bálsamo de Canadá sintética.

Los dinoflagelados fueron observados y fotografiados con el microscopio compuesto que tenía una cámara adaptada. La preparación histológica se realizó



en el Laboratorio de Invertebrados de la Facultad de Ciencias de la UNAM y el material histológico fue analizado en la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales (Puerto Morelos), UNAM.

Microscopia Electrónica de Transmisión

Para determinar si la ubicación de *Symbiodinium* en los órganos y tejidos del caracol es intracelular o extracelular, se preparó una muestra de caracol adulto para observación bajo el microscopio electrónico de transmisión. Las muestras fueron procesadas según la técnica descrita en Trench (1974) y Trench y Blank (1987).

En breve las muestras de tejidos y órganos se fijaron en gluteraldehído al 6% en cacodilato de sodio al 0.1 M con sucrosa al 0.25 M y sulfóxido de dimetilo al 0.1% (pH 7.5) durante toda la noche en oscuridad a 4°C. Las muestras se lavaron en 0.1M de cacodilato del sodio y sucrosa al 0.25M, posteriormente con cacodilato del sodio al 0.1 M y sucrosa al 0.125M y finalmente con cacodilato del sodio al 0.1 M. Las muestras fueron introducidas en 2% de tetróxido del osmio (OsO_4) y posteriormente lavadas con cacodilato del sodio al 0.1 M.

La deshidratación de las muestras se realizó de igual manera que las muestras anteriores. Posteriormente las muestras se introdujeron en óxido del propileno al



100% y gradualmente se sustituyó el óxido del propileno con resina epóxica (3:1, 2:1 y 1:1) hasta que las muestras quedaron finalmente en resina absoluta. Los cortes de 60 nm de grosor se contrastaron con acetato del uranilo y citrato del plomo. El procedimiento se realizó en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Efecto de la concha entre el ambiente lumínico externo e interno del caracol rosado *L. gigas*

Las conchas de diferentes longitudes sifonales para estas mediciones fueron donadas por varias cooperativas de pescadores. Para las mediciones de irradiancia se utilizó una lámpara halógena de 50 W fijada a una base de madera y sujeta con soportes universales, por encima de un acuario a una distancia de 30 cm. Al acuario, de 38 l de capacidad, se introdujo una base de plástico cuadriculada a una distancia de 6 cm del fondo, cubriéndose en su totalidad con arena de mar. La arena antes de ser usada fue lavada con agua de mar hasta que el agua de desecho se observó transparente.

La irradiancia que pasa a través de las conchas de *L. gigas* se midió con un sensor 4π (Biospherical Instruments Inc, San Diego, EUA). Las mediciones de irradiancia sin



la presencia de conchas representan el 100% y fueron consideradas como control. Para realizar las lecturas se colocaron 11 conchas de *L. gigas* de 12.8 a 26.2 cm de longitud sifonal (longitud total) sin limpiarlas una a la vez sobre el sensor. Las lecturas fueron realizadas por triplicado.

Estimación de la eficiencia fotoquímica de *Symbiodinium* en la glándula digestiva de *L. gigas*.

La malla de densidad neutral fue retirada después de dos meses al estanque de fibra de vidrio en donde se mantuvieron los tres caracoles con el fin de aclimatarlos a las altas irradiancias características de su medio ambiente. Después de un mes en estas condiciones lumínicas se realizaron mediciones de eficiencia fotoquímica.

Las mediciones de eficiencia fotoquímica efectiva ($\Delta F/F_m'$) fueron realizadas en presencia de irradiancia solar en un día con el cielo abierto y las mediciones de eficiencia fotoquímica máxima (F_v/F_m) fueron realizadas en oscuridad. Para este fin se perforaron las conchas de los 4 caracoles en la espira formando un orificio de aproximadamente 0.5 cm con un cincel y un martillo evitando dañar la glándula digestiva que se encuentra protegida por esta parte de la concha. Estos orificios se



mantuvieron cubiertos con plastilina hasta el momento de la toma de las eficiencias fotoquímicas con el fluorómetro Diving-PAM (Walz, Alemania).

Los adultos de *L. gigas* se colocaron uno a uno en una cámara oscura constituida por un acuario de polietileno con paredes y fondo de color negro (49 x 52 x 6.6 cm). En la parte superior de este sistema se colocaron mallas atenuadoras de irradiancia con la finalidad de establecer un rango de intensidades de irradiancia durante las lecturas. Las mallas fueron sostenidas con soportes universales en cada esquina del acuario siempre a la misma altura (22 cm de la base del soporte).

La fibra óptica del Diving-PAM utilizada para las mediciones de las eficiencias fotoquímicas fue sujeta con un soporte universal de manera que se mantuviera en ángulo de aproximadamente 45° en relación al orificio en la espira del caracol.

Las mediciones de irradiancia solar fueron tomadas simultáneamente con el sensor coseno del Diving-PAM en un ángulo recto sobre la concha de tal manera que la fibra óptica no hiciera sombra a éste sensor.

Las mediciones de F_v/F_m fueron hechas primero en oscuridad después de 10 minutos de aclimatación cubriendo los caracoles con tela negra. Las



especificaciones de los parámetros bajo los cuales se operó el Diving PAM durante las mediciones fueron los siguientes: Intensidad de la luz de medición (measuring intensity, MI) = 10, ganancia (gain, G) = 2, amortiguación (damping, D) = 2, intensidad del pulso de saturación (saturation pulse intensity, SI) = 8 y ancho del pulso de saturación (saturation pulse width, SW) = 0.8 s.

Posteriormente a las lecturas en la fase de oscuridad, se retiró la tela negra y se procedió a realizar una serie de mediciones de $\Delta F/F_m'$ en presencia de irradiancia solar. Con el fin de obtener una serie de irradiancias creciente se colocaron hasta cinco mallas de densidad neutral sobre el acuario.

Las mallas fueron removidas una a la vez cada 5 minutos para obtener una serie creciente de irradiancias de (80, 170, 243, 646 y 743) $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Durante las mediciones de la eficiencia fotoquímica, los caracoles que no se estaban utilizando se mantuvieron a baja luz.

Metodología estadística

Los datos obtenidos de los conteos de las células de *Symbiodinium* en el peso húmedo de la masa visceral de caracoles adultos de *L. gigas* recolectados en sitios



diferentes (Banco chinchorro, Puerto Morelos e Isla de Cozumel) fueron transformados logarítmicamente para la aplicación de un análisis de covarianza en XLSTAT y de regresión lineal $\log Y = \log a + b \cdot \log X$, utilizando el método de los mínimos cuadrados. Las variables utilizadas fueron: densidad y volumen de *Symbiodinium* vs el peso húmedo de la masa visceral del caracol.

Resultado

Mediciones de irradiancia a través de la concha del caracol rosado *L. gigas*

Las irradiancias mediadas a través del paso de la luz con el sensor 4π a través de las conchas de *L. gigas* en organismos que presentaba una longitud sifonal (longitud total) entre 12.8 y 26.2 cm, oscilaron entre 232 ± 8 (promedio \pm DE) y 0.94 ± 0.19 (promedio \pm DE) $\mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ lo cual fue 20.8% y 0.09% respectivamente, de la intensidad proporcionada de manera que los datos se ajustaron a una función de decaimiento exponencial (Fig. 5).

La irradiación que penetraba a través de la concha dependía de su longitud sifonal.

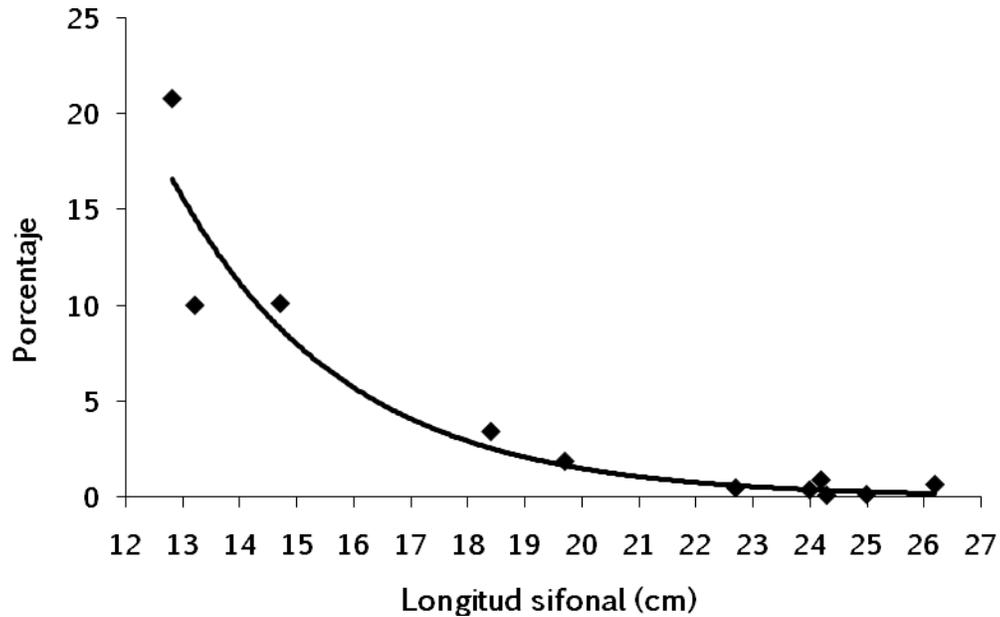


Figura 5. Relación entre el porcentaje de irradiancia que pasó a través de la cavidad de la concha de *Lobatus gigas* (medido con el sensor esférico) y la longitud sifonal. Las líneas representan el ajuste de los datos a una función de decaimiento exponencial y en la gráfica se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación. Ecuación $y = 1194.1e^{-0.33+2x}$ $R^2 = 0.84$.

Eficiencia fotoquímica de *Symbiodinium* en la glándula digestiva de *L. gigas*

Symbiodinium localizado en la glándula digestiva de caracoles adultos de *S. gigas* presentaron valores de eficiencia fotoquímica máxima en promedio de 0.4. A medida que aumenta la irradiancia solar disminuye la eficiencia fotoquímica efectiva como se observa en la figura 6.

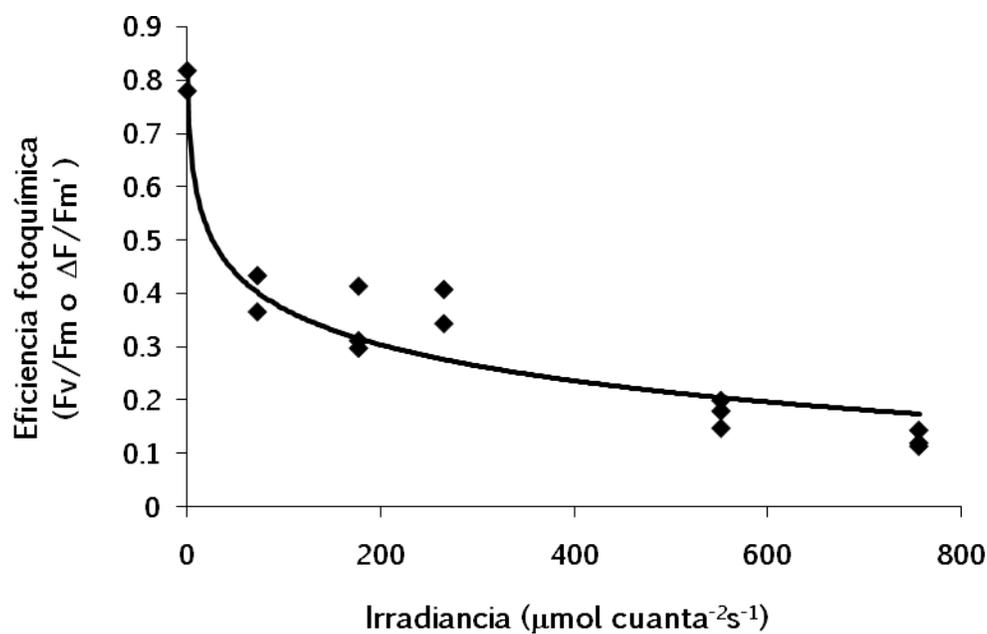


Figura 6. Eficiencias fotoquímicas máximas en oscuridad y efectivas en presencia de irradiancia solar de *Symbiodinium* en la glándula digestiva de caracoles adultos de *L. gigas*. $Y = 0.049\ln(x) + 0.4103$
 $R^2 = 0.9287$.

Ubicación y distribución de *Symbiodinium* en *L. gigas*

Todos los caracoles recolectados en Banco Chinchorro, en Puerto Morelos y en la Isla de Cozumel presentaron *Symbiodinium* tanto en el tracto digestivo como en estructuras no relacionadas con éste.



Los dinoflagelados se encontraron en los órganos como la glándula digestiva, el nefridio, la branquia, el estómago y el recto, pero la gónada no presentó ninguna evidencia de *Symbiodinium*. En los tejidos del manto, de la probóscide y del pie los dinoflagelados se encontraron dentro de una membrana epitelial que cubre los tejidos. En el músculo columelar no hubo evidencia de la presencia de *Symbiodinium* (Fig. 7 a-c).

En órganos

A nivel histológico se observó que *Symbiodinium* se localiza dentro de túbulos que constituyen la glándula digestiva (Fig. 8 a-c). Otra estructura en donde se localizó *Symbiodinium* fue en el nefridio, constituido por túbulos ciliados (Fig. 9 a y c). En la branquia de *L. gigas* también se observó la presencia de *Symbiodinium* (Fig.10).

En la gónada de *L. gigas* no se observó la presencia de *Symbiodinium* (Fig. 11) en los cortes histológicos del estómago de *L. gigas* se observó la presencia de células morfológicamente intactas de *Symbiodinium* entre el alimento que es consumido por el caracol (Fig. 12 a-c). En el recto de *L. gigas* se observaron las células de *Symbiodinium* morfológicamente intactas entre los restos de alimento (Fig.13 a y b).

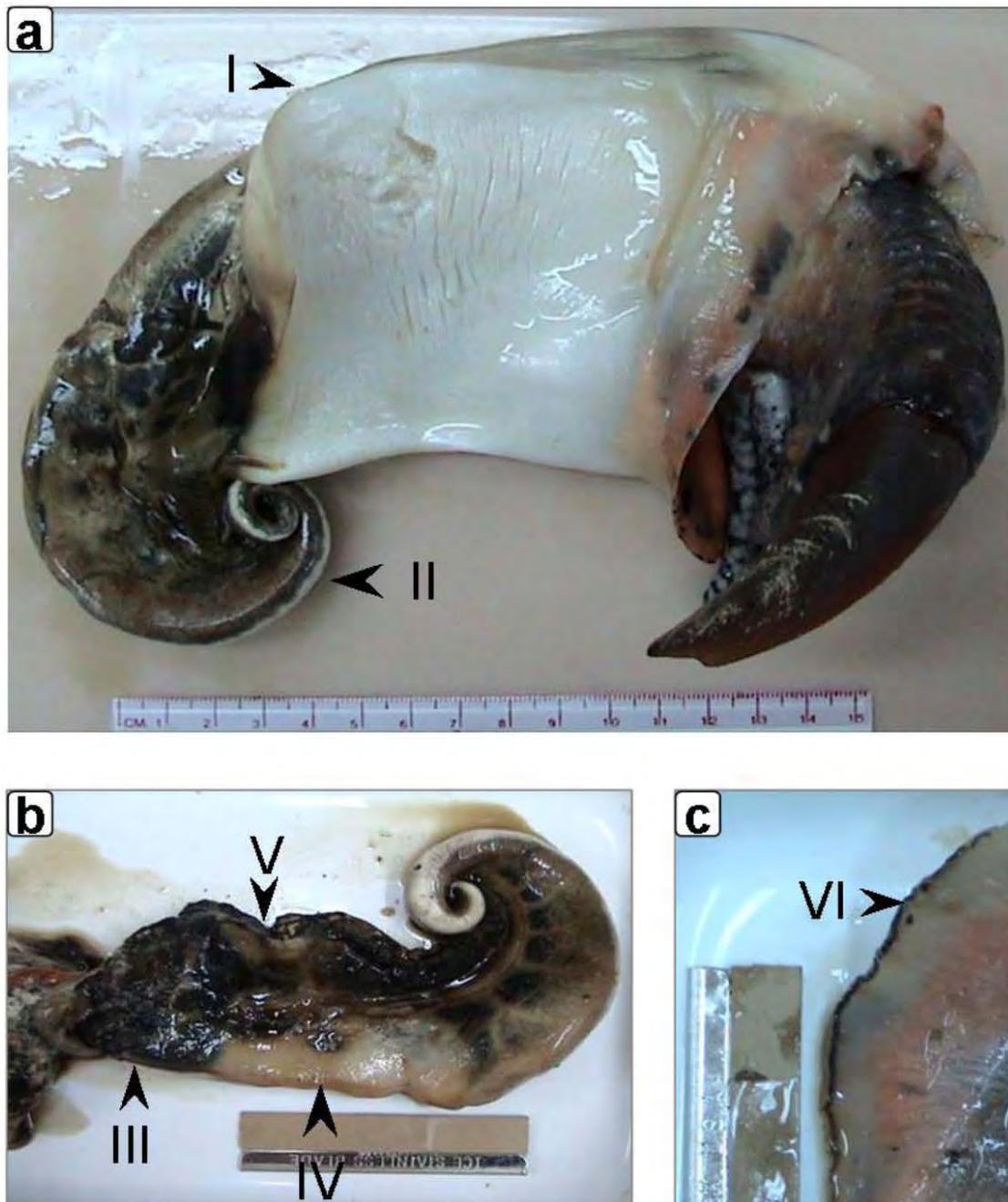


Figura 7. (a) *Lobatus gigas* desconchado mostrando el músculo columelar (I) y la gónada (II); (b) Disección de *L. gigas* mostrando la glándula digestiva (III), el estómago (IV) y el intestino (V) y (c) el manto (VI) de *L. gigas* (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).



En tejidos

A nivel histológico se observó que *Symbiodinium* se encuentra dentro de una

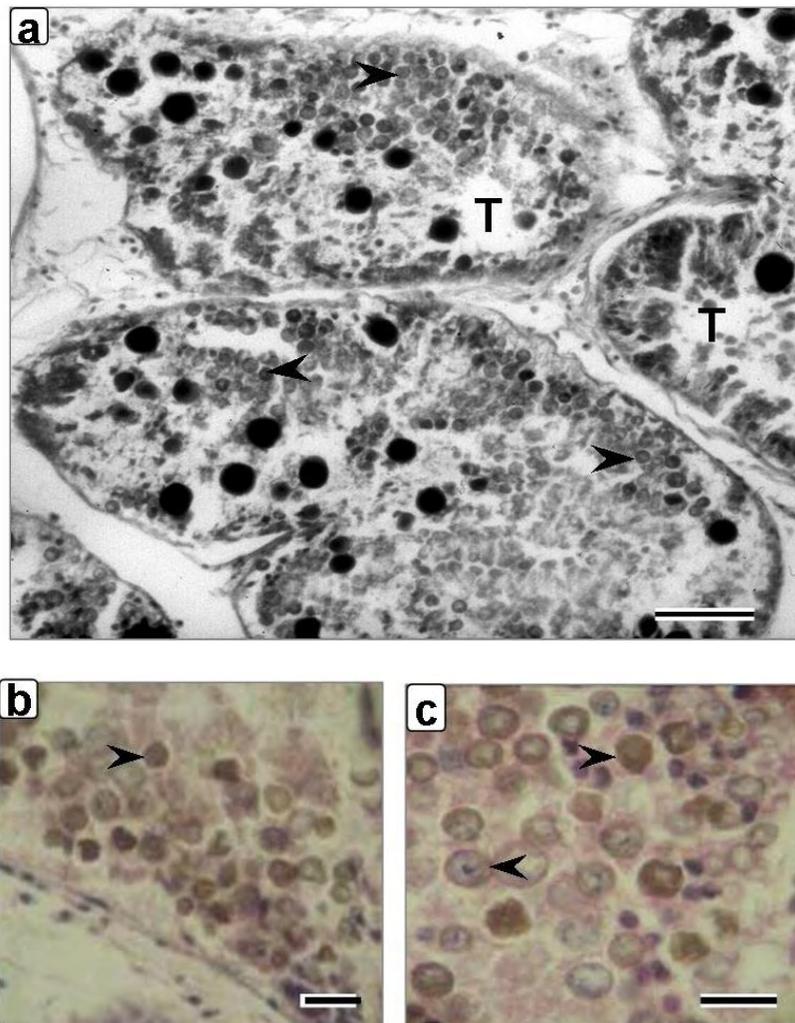


Figura 8. Cortes histológicos en sección longitudinal de la glándula digestiva de *Lobatus gigas* incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina mostrando en (a) los túbulos (T) que forman la glándula digestiva de *L. gigas*. Barra = 100 μm . En (b) y (c) se observan las células de *Symbiodinium*, señalados con flechas, dentro de los túbulos. Barras = 20 μm (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

membrana epitelial localizada en el borde del manto que tiene como función proteger el manto y además sostener a los dinoflagelados (Fig. 14 a y b). En el resto del tejido muscular del manto no se observó la presencia de dinoflagelados (Fig. 14 c). El pie también se encuentra cubierto por una membrana epitelial en donde se observó la presencia de los dinoflagelados (Fig. 15 a-d). En la probóscide de *L. gigas* también se observó la presencia de *Symbiodinium* dentro de una membrana epitelial (Fig. 16).

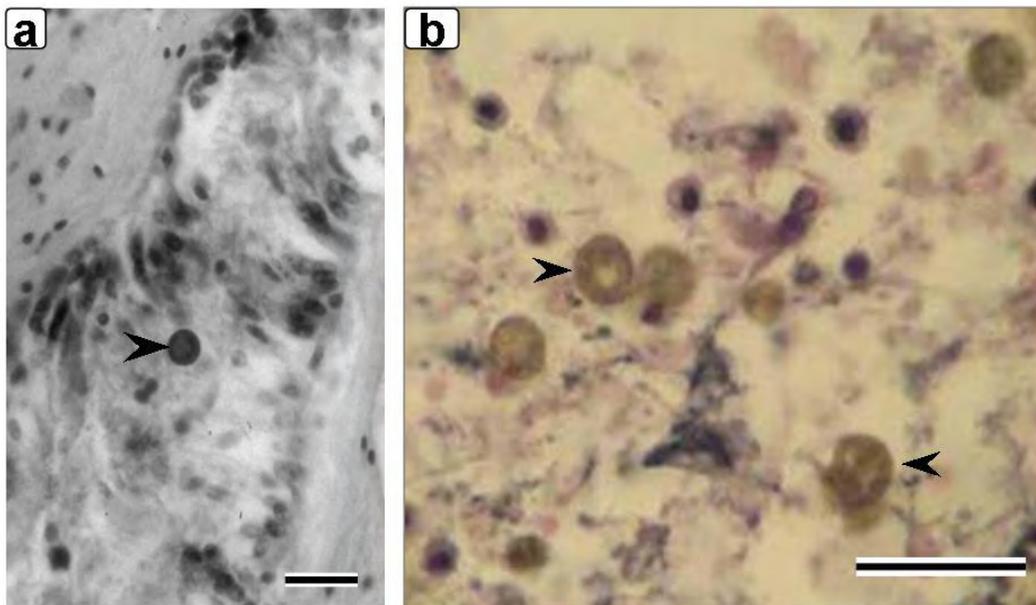


Figura 9. Cortes histológicos en sección transversal del nefridio de *Lobatus gigas* mostrando la presencia de *Symbiodinium*, señalados con flechas, en (a) Barra = 50 μm y (b) Barras = 20 μm . Las muestras fueron incluidas en parafina y teñidas con hematoxilina y eosina (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

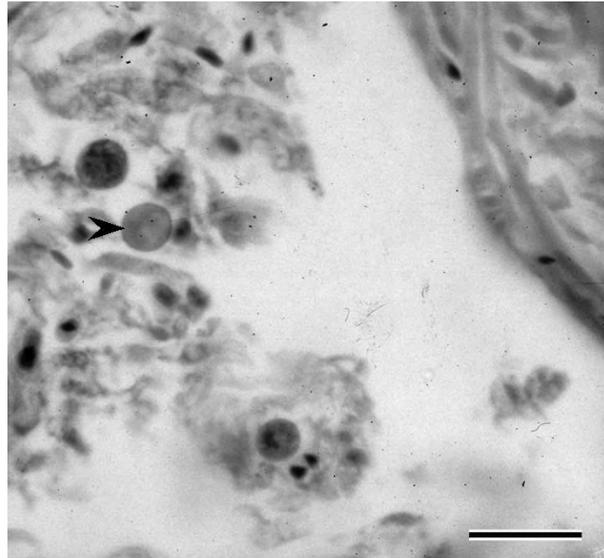


Figura 10. Corte histológico en sección transversal de la branquia de *Lobatus gigas* mostrando la presencia de *Symbiodinium*, señalado con flecha. La muestra fue incluida en parafina y teñida con hematoxilina y eosina. Barra = 20 μm (Foto tomada por Maribel García Ramos).

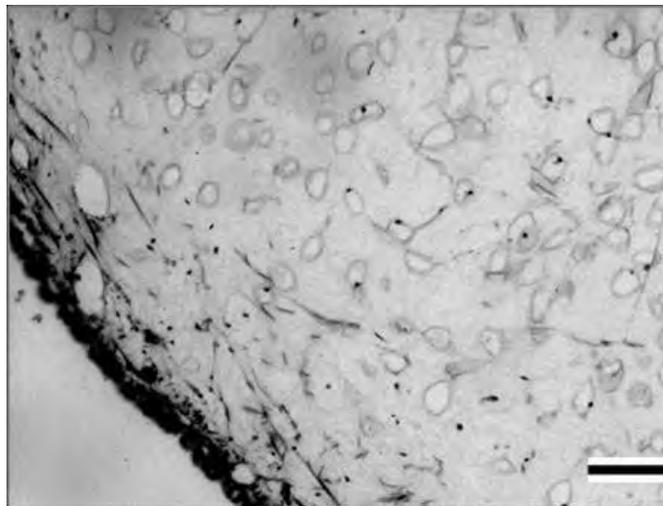


Figura 11. Corte histológico en sección transversal de la gónada de *Lobatus gigas* mostrando la ausencia de *Symbiodinium*. La muestra fue incluida en parafina y teñida con hematoxilina y eosina. Barra = 20 μm (Foto tomada por Maribel García Ramos).

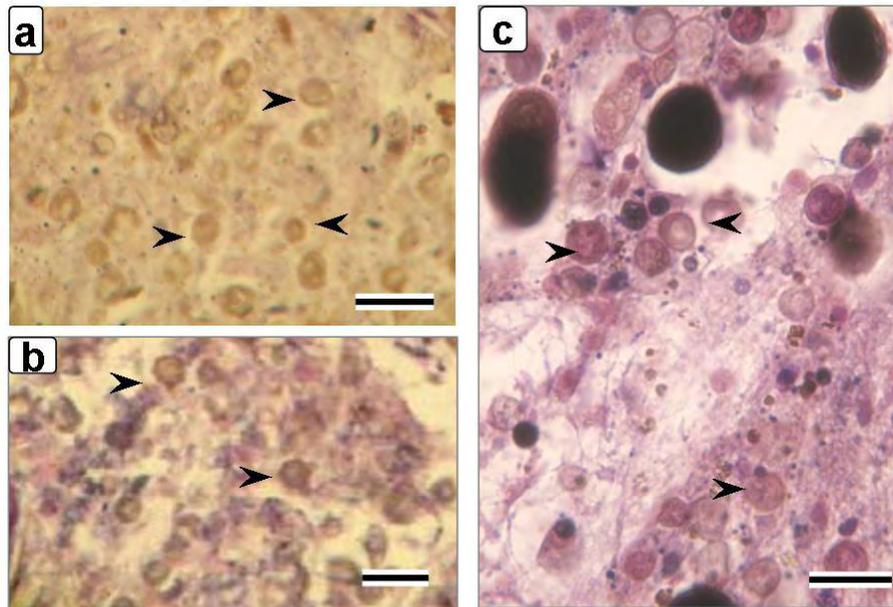


Figura 12. Cortes histológicos en sección longitudinal del estómago de *Lobatus gigas*, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina. En (a), (b) y (c) se observan las células de *Symbiodinium* morfológicamente intactas señaladas con flechas, entre restos alimenticios. Barras = 20 μm (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

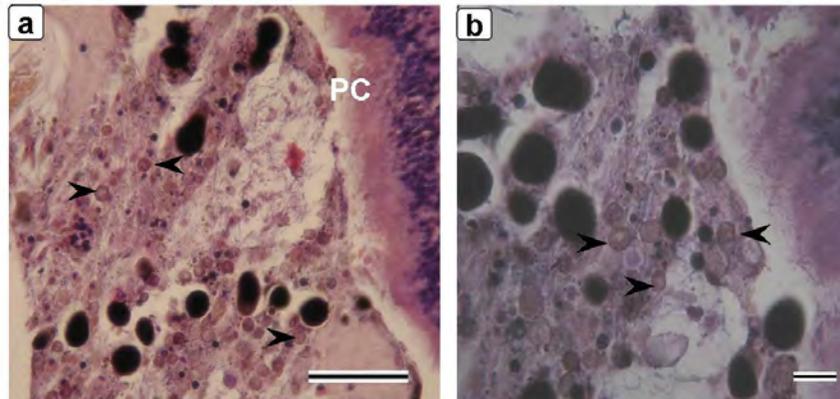


Figura 13. Cortes histológicos en sección transversal del recto de *Lobatus gigas*, incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina mostrando (a) *Symbiodinium* localizados dentro del recto, (PC) = pared celular del recto. Barra 100 μm . En (b) *Symbiodinium* morfológicamente intactos, señalados con flechas, entre restos alimenticios. Barras = 20 μm (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

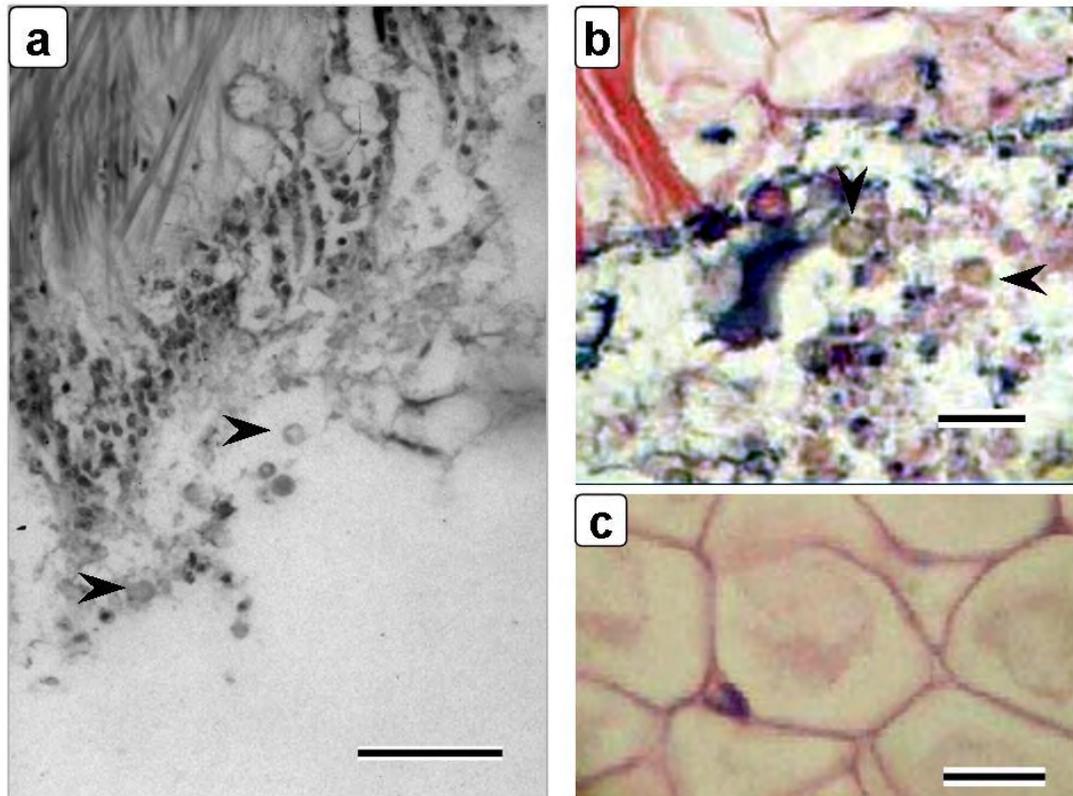


Figura 14. Cortes histológicos en sección longitudinal del manto de *Lobatus gigas* incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina mostrando en (a) y (b) *Symbiodinium*, señalados con flechas, localizados en el borde del manto en una membrana epitelial. Barras 50 y 20 = μm . En (b) se observa las células del manto en la parte superior y en (c) se observa el tejido muscular del manto sin la presencia de *Symbiodinium*. Barras = 20 μm (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

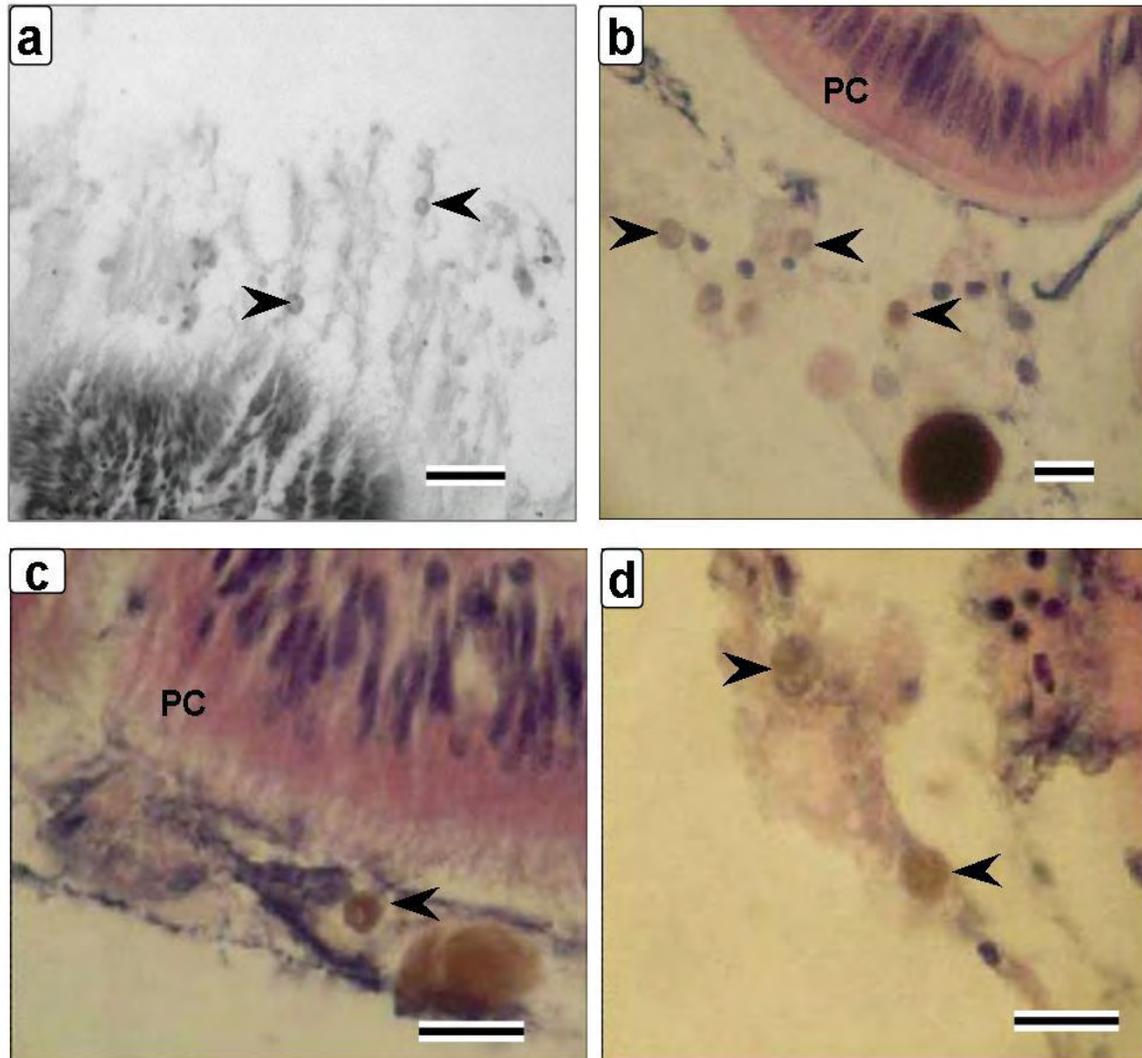


Figura 15. Cortes histológicos en sección transversal del pie de *Lobatus gigas* incluidos en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina mostrando en (a), (b) Barra 50 = μm y (c) la pared celular del pie cubierto con una membrana epitelial donde se observa la presencia de *Symbiodinium*, y en (d) la membrana epitelial con la presencia de *Symbiodinium* señalados con flechas. Barras = 20 μm (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).



Figura 16. Corte histológico en sección transversal de la probóscide de *Lobatus gigas* incluida en parafina y teñida con hematoxilina y eosina, mostrando la pared celular de la probóscide cubierta con una membrana epitelial donde se observa la presencia de *Symbiodinium*, señalados con flechas. Barras = 20 μm (Foto tomada por Maribel Garcia Ramos).

Al realizar los conteos de *Symbiodinium* en cada tejido y órgano y extrapolarlos a las estructuras enteras, se encontró que la cantidad de células fue mucho mayor en la glándula digestiva ($94.74\% \pm 1.89$ D. E.) que en las demás estructuras (Tabla 1).

Este patrón de distribución de *Symbiodinium* en el interior del *L. gigas* se registró en todos los ejemplares provenientes de los tres diferentes sitios de recolecta.

En la Figura 17 se describe la variación de la densidad del dinoflagelado *Symbiodinium* en la masa visceral de adultos de *L. gigas*, en función del aumento de la masa visceral del caracol. Se observa un aumento de la densidad de células



Tabla 1. Número total de células de *Symbiodinium* y la proporción de *Symbiodinium* en órganos y tejidos de adultos de *Lobatus gigas* mostrando promedios (n = 11) con desviaciones estándar (D. E.). Adicionalmente se muestran el índice mitótico, la tasa específica de crecimiento (μ) y el tiempo requerido para duplicar la población de células en las estructuras anatómicas en donde se encontraron *Symbiodinium* reproduciéndose.

	No. de células totales (\pm D. E.) (mm ³)	Porcentaje en cada estructura (\pm D. E.)	Índice Mitótico	μ (Divisiones por día)	T (Días)
Órganos					
Gónada	0	0	0	0	0
Glándula digestiva	$5.6 \times 10^8 \pm 3.6 \times 10^8$	94.74 ± 1.89	2.53	0.025	27.72
Nefridio	$1.2 \times 10^6 \pm 9.8 \times 10^5$	0.96 ± 0.34	0	0	0
Branquia	$8.4 \times 10^5 \pm 4.8 \times 10^6$	0.46 ± 0.25	0	0	0
Tracto digestivo					
Estomago e intestino	$4.1 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^8$	1.63 ± 0.42	17.14	0.158	4.39
Recto	$2.0 \times 10^6 \pm 1.3 \times 10^6$	0.92 ± 0.36	0	0	0
Tejidos					
Músculo columelar	0	0	0	0	0
Manto	$4.8 \times 10^6 \pm 6.6 \times 10^5$	0.91 ± 0.57	33.85	0.292	2.37
Pie	$1.9 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^6$	0.38 ± 0.21	0	0	0
TOTAL	5.8×10^8	100.00			

de *Symbiodinium* en el tejido en los caracoles menores de 100-110 gramos de tejido blando, hasta un valor máximo de unos 6.65 ± 0.16 células por gramo de tejido blando, por encima del cual no aumenta.



El único caracol examinado mayor de esta talla (de 140 g) no presentó un contenido de células en su tejido significativamente diferente del máximo observado en los caracoles de 105-120 gramos. Se observa también una gran variabilidad entre los organismos analizados tanto en la concentración de células máxima del tejido (6.4 a 6.9 mm³) como del tamaño del caracol al que lo alcanza (94 g a 102 g).

Probablemente esto tenga alguna relación con la profundidad a la cual fueron recolectados los organismos ya que los organismos que presentan mayor densidad de células de *Symbiodinium* fueron los colectados a una profundidad de 3 metros (Puerto Morelos ■), en comparación con los organismos que presentan menor densidad de células de *Symbiodinium* (Isla de Cozumel ▲) los cuales fueron colectados a una profundidad de 30 m.

En la Figura 18, se muestra la relación entre el volumen que está ocupando el dinoflagelado *Symbiodinium* en función del aumento del peso de tejido blando en los caracoles *L. gigas*. Según esta relación el volumen del dinoflagelado no aumenta tan rápido en relación al peso del tejido blando del caracol; es decir los organismos con mayor peso presentan un volumen inferior de la población de

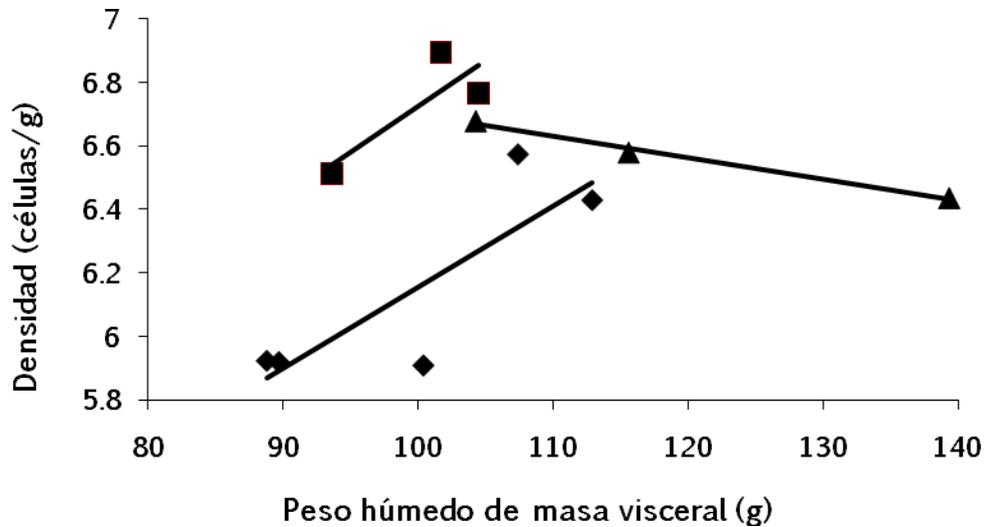


Figura 17. Densidad de células de *Symbiodinium* por gramo en peso húmedo de tejido blando de *Lobatus gigas* (n = 11) $r = 0.1714$. Organismos colectados de (◆) Banco Chinchorro, (■) Puerto Morelos e (▲) Isla de Cozumel

dinoflagelados en comparación con el volumen que ocupa la población de dinoflagelados en caracoles más pequeños.

Para entender mejor esta variabilidad se examinó posibles diferencias asociadas a la población de procedencia de cada caracol. En la Figura 19 se muestran los valores promedio para cada población tanto en el peso húmedo de tejido blando como en el número de células por gramo y el volumen total ocupado por las células simbiotes.

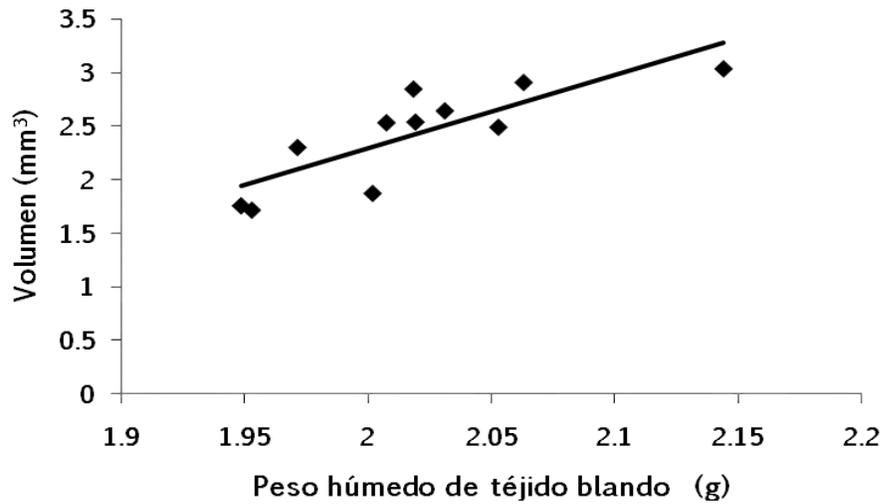


Figura 18. Volumen (mm^3) de las células de *Symbiodinium* en peso húmedo de tejido blando de *Lobatus gigas* ($n = 11$) $r^2 = 0.6123$.

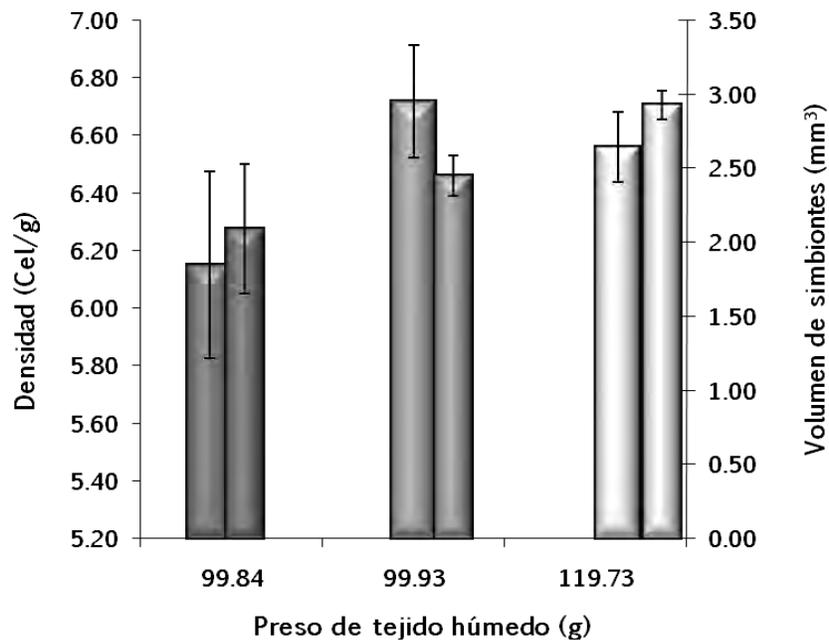


Figura 19. Densidad por gramo de células de *Symbiodinium* y volumen (mm^3) de *Lobatus gigas* ($n = 11$) en diferentes poblaciones. (■) Banco Chinchorro, (■) Puerto Morelos e (□) Isla de Cozumel. En la gráfica se muestran los valores de peso húmedo de tejido blando en gramos con desviaciones estándar.



En la Figura 20 a y b se muestran la densidad de las células diferenciando la procedencia de cada organismo recolectado. Los caracoles recolectados de Banco Chinchorro (n = 5) y Puerto Morelos (n = 3) fueron más o menos del mismo tamaño, presentando un rango de variación similar (un poco mayor la población de Banco Chinchorro), y en las dos poblaciones se observa un aumento de las células de *Symbiodinium* a medida que aumenta el peso de tejido blando, pero claramente la población de Puerto Morelos presentó valores mayores del contenido de células por unidad de tejido blando que la población de Banco Chinchorro.

Sin embargo, los tres caracoles recolectados de la Isla de Cozumel, en promedio de mayor tamaño que las otras dos poblaciones, presentaron una relación inversa ya que a medida que aumenta el peso de tejido blando disminuye el número de células de *Symbiodinium* por unidad de tejido blando.

La variación del volumen ocupado por los dinoflagelados presenta un contraste menor, pero claramente diferenciado entre las tres poblaciones, indicando posiblemente que se ha alcanzado los valores de volúmenes de dinoflagelados simbiotes en los tejidos, o la profundidad afecta el crecimiento de las células de

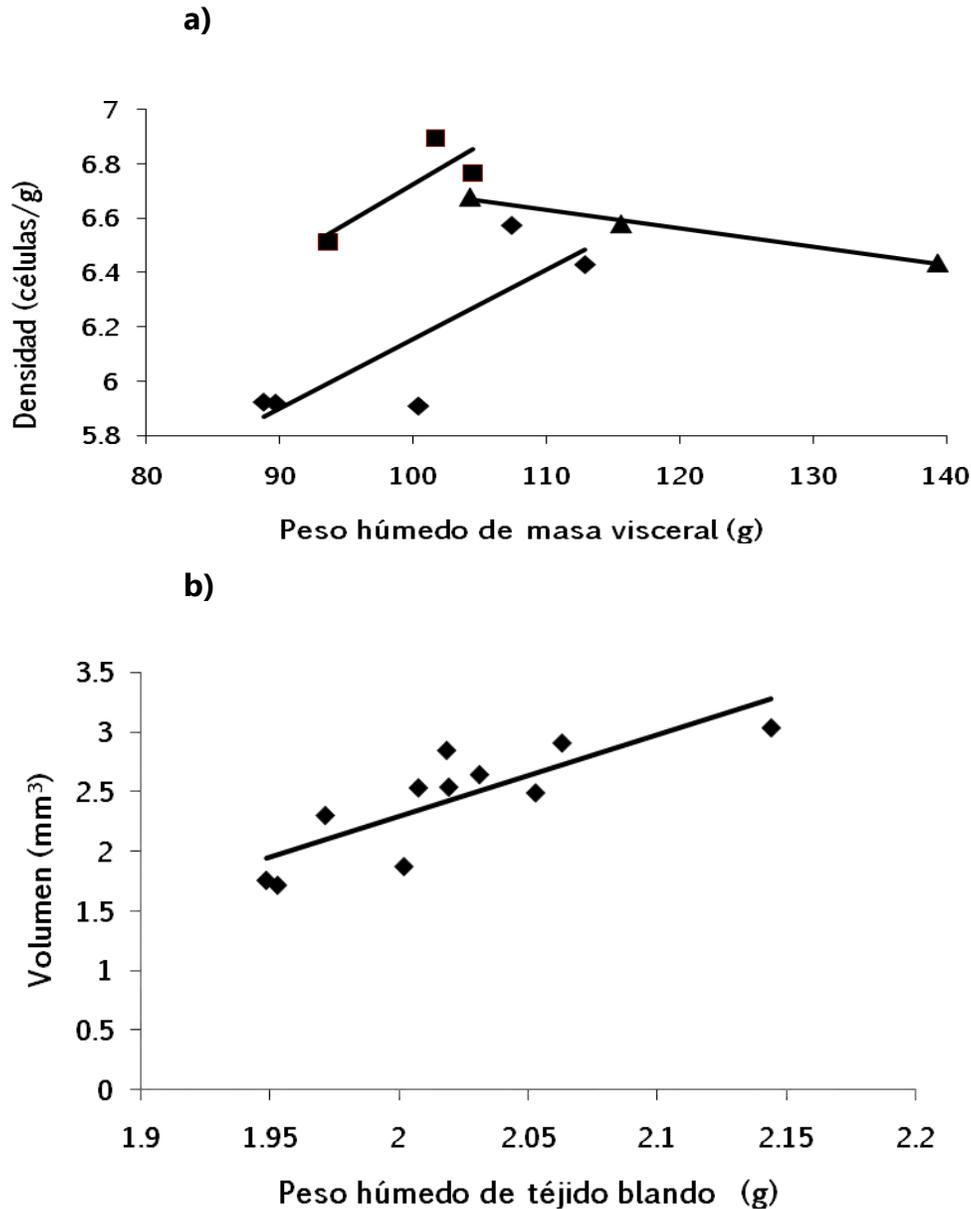


Figura 20. a) Densidad de células de *Symbiodinium* por gramo en peso húmedo de tejido blando de *Lobatus gigas*. La línea representa un ajuste a una función lineal. (◆) Banco Chinchorro (n = 5) $r = 0.8379$, (■) Puerto Morelos (n = 3) $r = 0.8324$ e (▲) Isla de Cozumel (n = 3) $r = 0.9954$; y **b)** relación entre el volumen (mm³) de las células de *Symbiodinium* y el peso húmedo tejido blando de *Lobatus gigas*. La línea representa un ajuste a una función lineal. (◆) Banco Chinchorro $r = 0.8199$, (■) Puerto Morelos $r = 0.9009$ e (▲) Isla de Cozumel $r = 1$.

Symbiodinium ya que fueron colectados a mayor profundidad (30 m) que los organismos de Puerto Morelos (3 m) y Banco Chinchorro (10m) (Fig. 20b, 21 y tabla 3). En donde los caracoles de Banco Chinchorro presentan menos volumen de Simbiontes en comparación de los caracoles de Puerto Morelos e Isla de Cozumel.

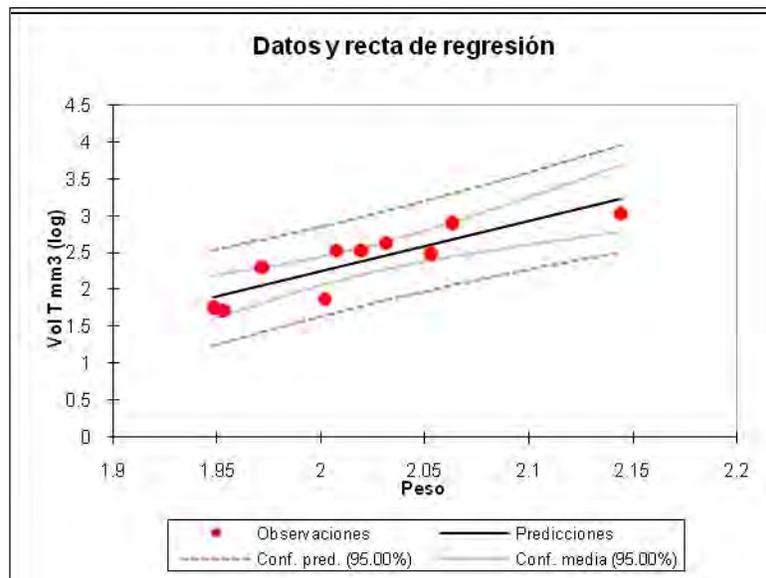


Figura 21. Volumen (mm^3) de las células de *Symbiodinium* y el peso húmedo tejido blando de *Lobatus gigas*. Representando un ajuste a una función logarítmica. (◆) Banco Chinchorro, (■) Puerto Morelos e (▲) Isla de Cozumel ($n = 11$) $r = 0.863$.

En la tabla 3 se muestra el número de células totales, diámetro y volumen que ocupa *Symbiodinium* en tejido húmedo de *L. gigas* recolectado en diferentes sitios y profundidades.



Tabla 2. Análisis de covarianza para la comparación de medias entre los volúmenes de *Symbiodinium* en peso húmedo de *L. gigas* de tres sitios diferentes de colecta.

Fuente	GDL	Suma los cuadrados	Cuadrado medio	F de Fisher	Pr > F
Modelo	1	1.448	1.448	23.239	0.001
Residuos	8	0.498	0.062		
Total	9	1.946			

Parámetros del modelo:

Parámetro	Valor	Desviación típica	t de Student	Pr > t	Límite inferior 95 %	Límite superior 95 %
Intersección	11.444	2.868	-3.990	0.004	-18.057	-4.830
Peso	6.845	1.420	4.821	0.001	3.571	10.119

La ecuación del modelo se escribe: Vol T mm³ (log) = -11.4436095494098 + 6.84500810559926*Peso

Tabla 3. Número de células totales de *Symbiodinium*, diámetro de células y volumen en la glándula digestiva de *Lobatus gigas* por sitio de muestreo.

Sitio de muestreo y profundidad (m)	Total de número de células (x 10 ⁶ cel.)	Diámetro de células (µm)	Volumen ocupado (mm ³)
Puerto Morelos, 3	897 ± 372	8.67 ± 0.58	294.31 ± 82
Banco Chinchorro, 10	288 ± 264	10.75 ± 0.34	185.64 ± 177
Isla de Cozumel, 30	740 ± 105	12.96 ± 1.18	865.81 ± 198

Ubicación intracelular o extracelular de *Symbiodinium* en los tejidos de *L. gigas*

Durante las observaciones de los tejidos de *L. gigas* realizadas por medio de microscopía electrónica de transmisión no fue posible determinar con certeza si las células de *Symbiodinium* tienen una localización intracelular o extracelular en *L.*

gigas porque la fijación de los dinoflagelados no fue suficientemente adecuada para poder observar con detalle esta relación (Fig. 22 a y b).

Por esta razón se realizó un segundo protocolo en donde la concentración del glutaraldehído fue mayor al igual que los tiempos de infiltración con la resina epóxica, pero los resultados obtenidos fueron similares al primer protocolo. Los *Symbiodinium* se observaron morfológicamente intactos en todas las estructuras del caracol (Figs. 8 a la 16 y 22).

En ningún órgano o tejido se observaron *Symbiodinium* en proceso de digestión o lisis. Inclusive en las heces fecales de *L. gigas* se observaron abundantes células de *Symbiodinium* que no presentaron signos de digestión (Fig. 23).

Crecimiento y división de *Symbiodinium* en el interior de *L. gigas*

Se observó la división celular de *Symbiodinium* dentro de órganos y tejidos de *L. gigas* (Fig. 24 a-c) pero estaba limitada al manto, al estómago y a la glándula digestiva ya que en los órganos restantes donde se localizan los dinoflagelados no se observó división. El manto o bien la membrana epitelial cubriendo el manto es la

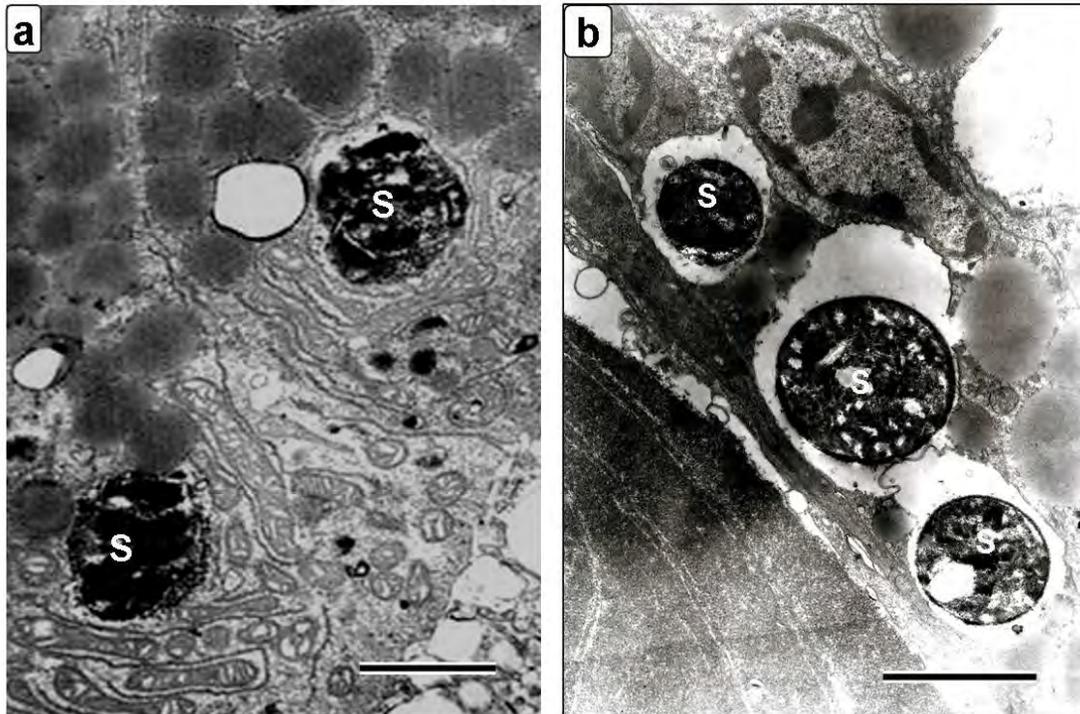


Figura 22. Micrografías de transmisión electrónica de una porción de la glándula digestiva de *Lobatus gigas* en donde se observa la presencia de *Symbiodinium* (S) en (a) y en (b) con mayor aumento. Barras = 10 μm (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

estructura en donde *Symbiodinium* presentó la mayor división mitótica ($33.85\% \pm 1.22$ D. E.), seguido por el estómago ($17.14\% \pm 5.55$ D. E.) y por último en la glándula digestiva ($2.53\% \pm 0.57$ D. E.). En base a estos índices mitóticos de *Symbiodinium* en *L. gigas* se estima que la tasa específica de crecimiento es de 0.292 divisiones por día en el manto lo cual es 10 veces mayor que las 0.025 divisiones por día en la glándula digestiva (Tabla 4).

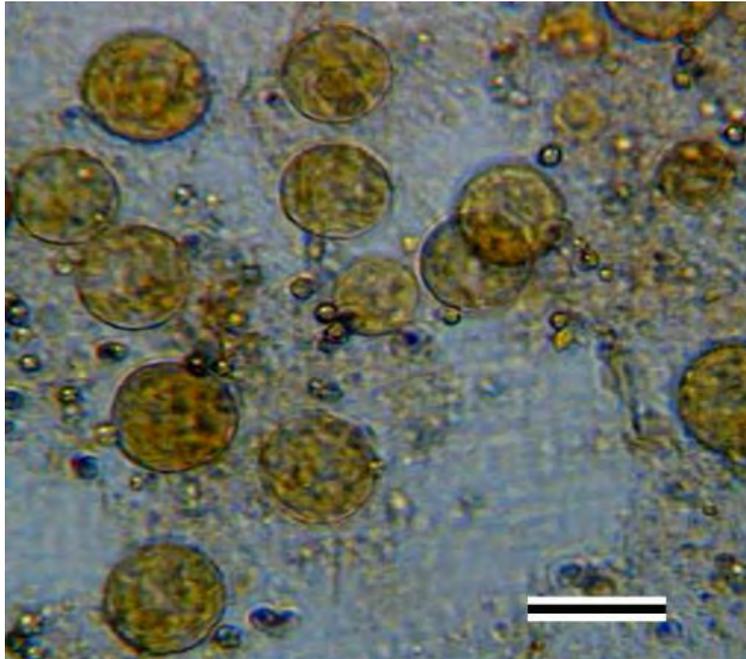


Figura 23. Heces fecales de *Lobatus gigas* con la presencia de *Symbiodinium* morfológicamente intactos entre restos alimenticios. Barra = 10 μ m (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

Debido a las altas tasas específicas de crecimiento dentro del manto, estómago y glándula digestiva se calculó el número de células de *Symbiodinium* producidas a diario en dichas estructuras (Tabla 1).

Para realizar el cálculo se asumió que el tamaño poblacional se encuentra en un estado de equilibrio, que no hay mortalidad de las células (porque no se observó digestión o lisis en ninguna muestra) y que no hay inmigración de células excepto por la probóscide. Este último no se estimó por lo que no se sabe la tasa diaria de

inmigración de nuevos *Symbiodinium*. También se asumió que las células en el recto están en tránsito a la expulsión.

Se calculó que la cantidad de células expulsadas por día debido únicamente a la división celular dentro del caracol es de 6.82×10^5 células por gramo de peso húmedo de tejido húmedo (Tabla 4) por lo que un caracol adulto cuya masa visceral pesa en promedio de 100 g expulsaría aproximadamente 7×10^7 células cada día al sistema arrecifal.

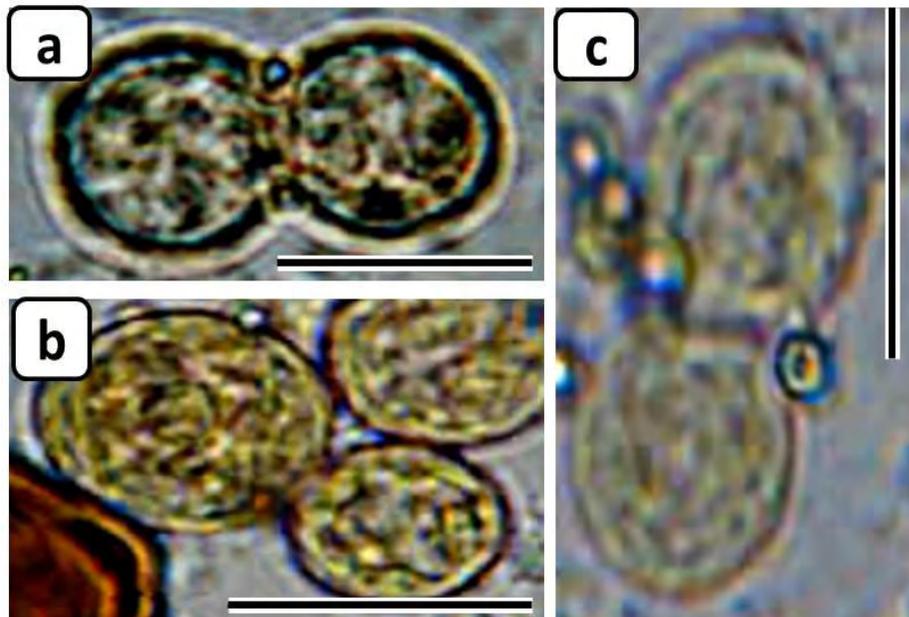


Figura 24. En (a), (b) y (c) se muestra *Symbiodinium* en división celular. Barras = 10 μm (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).



Tabla 4. Dinámica poblacional de *Symbiodinium* en los tejidos y órganos de *Lobatus gigas*. Se muestra la densidad de *Symbiodinium* en cada estructura anatómica (Cels./g húmedo), la tasa específica de crecimiento (μ) y las tasas de mortalidad (m), emigración (e) e inmigración (i). La tasa de ingestión de *Symbiodinium* no se determinó por lo que la tasa de inmigración al estómago no se sabe.

Estructura Anatómica	Densidad (Cels./g húmedo)	Tasa específica de crecimiento (μ)	Tasa de mortalidad (m) (Cels./g/día)	Tasa de emigración (e) (Cels./g/día)	Tasa de inmigración (i) (Cels./g/día)
Gónada	0	0	0	0	0
Glándula digestiva	2.240×10^7	0.025	0	5.600×10^5	0
Estómago	3.654×10^5	0.158	0	5.774×10^4	?
Nefridio	2.147×10^5	0	0	0	0
Recto	2.053×10^5	0	0	0	0
Branquia	1.033×10^5	0	0	0	0
Músculo columelar	0	0	0	0	0
Manto	2.195×10^5	0.292	0	6.411×10^4	0
Pie	9.323×10^4	0	0	0	0
TOTAL				6.819×10^5	

Discusión

En base a los resultados de esta investigación se ha determinado que *Symbiodinium* se encuentra en órganos y tejidos de *L. gigas* que están directamente e indirectamente relacionados con el tracto digestivo, lo que indica



que su presencia no es incidental y por lo tanto existe una asociación mutualista entre ellos. Los dinoflagelados no son una fuente directa de alimento para el caracol ya que los simbioses de *L. gigas* se encuentran morfológicamente intactos (Fig. 8, 12 y 13) y son eliminados a través de las heces fecales sin señales de digestión (Fig. 23). Al contrario, los simbioses realizan fotosíntesis y se encuentran dividiéndose dentro del hospedero (Fig. 24) lo que significa que los simbioses no solo mantienen un número significativo de células (5.83×10^8) en el interior del caracol, sino que se reproducen dentro de él. Lo que significa que tiene suficiente luz para activar la fotosíntesis y para mantener balances de carbono positivo y suficientemente óptimo para permitir la división celular.

L. gigas es un organismo béntico y ramoneador. Sus hábitos alimenticios incluyen el raspado de pastos marinos para alimentarse de epífitas que se acumulan en la superficie de las hojas, así como la recolecta de arena para consumir la materia en depósito (Randall, 1964a). Esto trae como consecuencia que el caracol ingiera de manera no selectiva muchos organismos incluyendo probablemente dinoflagelados del género *Symbiodinium* y así éstos entran al tracto digestivo. En este estudio se encontró 2.55% de las células totales de *Symbiodinium* en el estómago (Fig. 12) y en el recto (Fig. 13), ambos componentes del tracto digestivo.



El restante 97.45% de células de *Symbiodinium* está asociado a los órganos y tejidos no relacionados directamente con el tracto digestivo (Tabla 1). Se encontró *Symbiodinium* dentro de los túbulos de la glándula digestiva (Fig. 8) que es un órgano relacionado con el sistema digestivo, pero no forma parte del tracto digestivo propiamente. Además, se encontraron células de *Symbiodinium* en órganos no asociados al sistema digestivo, por ejemplo, dentro de los túbulos ciliados del nefridio (Fig. 9) y en la branquia (Fig. 10). Es importante notar que no se encontró ninguna evidencia de *Symbiodinium* en la gónada (Fig. 11), al contrario de lo reportado para *Strombus tricornis* y otros gasterópodos del Mar Rojo (Bernet et al., 1986a, b). La ausencia de *Symbiodinium* en la gónada implica que no hay transferencia de simbiosis a las siguientes generaciones (Trench, 1979) y por lo tanto en alguna otra etapa del ciclo de vida debe haber una adquisición de simbiosis. Por último, *Symbiodinium* se localiza en tejidos como el manto (Fig. 14), el pie (Fig. 15) y la probóscide (Fig. 16) dentro de una membrana epitelial que los cubre y protege.

Casi el 95% de las células de *Symbiodinium* en *L. gigas* se localizan en la glándula digestiva (Tabla 1). Esta estructura es la que presenta mayor actividad metabólica, dado que es la encargada de almacenar las reservas energéticas, segregar las



enzimas digestivas y absorber los nutrientes (Barnes, 1989). Esta ubicación favorecería el intercambio de nutrientes entre el simbiote y su hospedero, razón por la cual se encuentra la mayoría de los *Symbiodinium* en esta estructura en *L. gigas*. El número tan alto de *Symbiodinium* en la glándula digestiva se puede deber a varias razones. Este órgano con su alta actividad metabólica posiblemente esta proporcionando a los simbioses nutrientes que le apoyan en mantenerse y reproducirse. Por otro lado, los simbioses mismos por medio del proceso de fotosíntesis pueden fijar suficiente carbono que les permite mantenerse y reproducirse en el interior del caracol y posiblemente traslocar fotosintetatos al hospedero como se ha mostrado para dinoflagelados aislados de *Strombus tricornis* del Mar Rojo. Berner et al. (1986a) midieron la incorporación de ^{14}C y determinaron usando curvas de fotosíntesis para mostrar que los simbioses fueron capaces de realizar fotosíntesis y postularon que los fotosintetatos son traslocados al hospedero. Los datos obtenidos con los simbioses de *L. gigas* indican que son capaces de realizar fotosíntesis dentro de *L. gigas* y también se puede postular que los fotosintetatos son traslocados al hospedero.

Los simbioses en caracoles adultos (mayores de 20 cm de longitud sifonal) muestran actividad fotoquímica *in situ* en presencia de irradiancia solar (Fig. 6)



aunque los valores de irradiancia medidas *in situ* a nivel de la glándula digestiva llegan a ser menos de 1% de irradiancia superficial. Sin embargo, los índices mitóticos son altos inclusive en la glándula digestiva lo que significa que una proporción sustancial de los fotosintetatos contribuye al proceso de metabolismo y reproducción de los simbiositos, esto indica que probablemente no trasloca casi fotosintetatos al caracol sino que los usa íntegramente para dividirse (Fig. 24, Tabla 1). En caracoles juveniles (entre 10 a 20 cm de longitud sifonal) la irradiancia a nivel de la glándula digestiva es mayor que en caracoles adultos (Fig. 5) lo que sugiere que la actividad fotosintética de juveniles puede ser mayor que lo encontrado en los adultos.

La cantidad de dinoflagelados presentes en el manto es mucho menor en comparación con la presencia casi exclusiva de *Symbiodinium* en la glándula digestiva. En bivalvos Tridacnidos, el mayor número de dinoflagelados se concentra en el tejido sifonal hipertrofiado (también conocido como manto), debido a la exposición directa de esta estructura a la radiación solar (Fitt y Trench, 1981). En el manto de *L. gigas* se localizan menos de 1% de las células totales de *Symbiodinium* (Tabla 3) pero en esta estructura se encontró el mayor índice mitótico (I. M., 33.85% \pm 1.22 D. E.).



El I. M. observado en el manto de *L. gigas* es muy elevado si se compara con el I. M. de simbiontes localizados en otros invertebrados marinos. Fitt y Trench (1983) aislaron *Symbiodinium* de dos especies de anémonas *Aiptasia tagetes* y *Heteractis lucida* y de la medusa *Cassiopeia xamachana* y mantuvieron los simbiontes en cultivos aclimatados a ciclos de luz y oscuridad (12 h:12 h) durante 2 años antes del experimento. Los I. M. determinados para cada cepa de dinoflagelados fue de 5.7%, 19% y 4.4% respectivamente.

Por otra parte, Muscatine et al. (1986) determinaron *in situ*, que el I. M. de *Symbiodinium* localizados en la mesoglea de la umbrela de la medusa *Mastigias* sp. fue del 14%. Así mismo, Cook et al. (1988) determinaron el I. M. de simbiontes localizados en tentáculos de la anémona *Aiptasia pallida* en un rango de 7% a 8 % y Wilkerson et al. (1988) en 9 especies de corales escleractinios (*Madracis mirabilis*, *Eusmilia fastigiata*, *Dendrogyra cylindrus*, *Agaricia agaricites*, *Porites astreoides*, *Montastraea cavernosa* y *M. annularis*, *Acropora cervicornis*, y *A. palmata*), en un rango de 1.1% a 14.1% dependiendo la profundidad de colecta. Fitt (2000) determinó que el punto máximo de I. M. en simbiontes localizados en las vacuolas y células digestivas de la hidra *Myrionema ambionenses* es en la noche con un rango de 12–20%. Bachman y Muller-Parker (2007) compararon el pelet de la



digestión extraoral y de las heces fecales de la anémona *Anthopleura elegantissima*, determinando que el I. M. de los simbioses no es significativamente diferente (2.81 y 3% respectivamente) entre muestras. Por último, Dimond y Carrington (2008) determinaron que el I. M. para simbioses presentes en el coral escleractinio *Astrangia poculata* aclimatado a diferentes temperaturas fue de 2.87% a 4°C y de 4.40% a 20°C.

Los altos valores de I. M. en el manto de *L. gigas* podrían deberse a que este está expuesto a la radiación solar, debido a que se extiende usando el abanico del caracol como soporte. Las aguas someras de arrecifes coralinos están expuestas a altas cantidades de radiación solar y la arena refleja una gran cantidad de radiación (Hochberg y Atkinson, 2000) por lo que los simbioses localizados en el manto podrían recibir suficiente energía lumínica para tener una cierta actividad fotosintética y podría explicar el alto índice mitótico. El manto está encargado de segregar, construir y formar la concha y su principal función es servir de base para el posterior depósito de sales minerales (Hughes, 1986). El alto índice mitótico podría deberse a que el hospedero controla la aportación de nutrientes para que los simbioses mantengan altas tasas de fotosíntesis para proveer sustratos requeridos por su hospedero en el proceso de calcificación.



Usando el índice mitótico, se calculó que se podía producir 3×10^{185} simbioses en el manto durante la vida de un caracol hasta alcanzar madurez sexual (Tabla 1). Sin embargo, se encontró solo 4.8×10^6 células de simbioses en esta estructura (Tabla 1). El alto índice mitótico sugiere que los simbioses no están limitados en espacio o por nutrientes que requieren para realizar el proceso de fotosíntesis entonces la regulación de la población es probablemente por expulsión del caracol a través de heces fecales (Fig. 23), digestión por el caracol o por desescame de la membrana epitelial liberando los simbioses. La posibilidad de que los simbioses sean digeridos podría descartarse dada la falta de evidencia de células en proceso de digestión o lisis mientras que los simbioses en las heces fecales se encuentran abundantes e intactos (Fig. 23).

Al encontrar *Symbiodinium* en órganos y tejidos no directamente relacionados con el sistema digestivo, sugiere que debe de existir un sistema de movimiento de células dentro del caracol. Inclusive los *Symbiodinium* en exceso en el manto, si no están desescamados junto con la membrana epitelial deben ser transportados al estómago o a otro sitio como la glándula digestiva. Este traslado puede ser a través de la hemolinfa, pero este no pudo ser confirmado usando microscopía electrónica de transmisión. En especies de *Tridacna* se ha observado un sistema tubular



zooxantelar en donde se ha descrito la migración de *Symbiodinium* entre los tejidos hipertrofiados del manto a los ductos digestivos del estómago (Norton et al., 1992; Hirose et al., 2006).

Es posible que un sistema tubular similar al que está descrito para *Tridacna* existe en *L. gigas*, pero no fue posible confirmarlo. Aunque tampoco fue posible determinar si la ubicación de *Symbiodinium* en el tejido de *L. gigas* era intra o extracelular, se postula que la localización es extracelular debido al movimiento de células dentro del caracol similar a la ubicación de *Symbiodinium* en 6 especies de *Tridacna* (Fitt y Trench, 1981). En el manto se calculó que se produce en exceso de 60,000 células por gramo de peso húmedo de manto diario lo que significa que el traslado de tantas células es probablemente a nivel extracelular. El movimiento de las células de *Symbiodinium* a través de la masa visceral de *L. gigas* podría tener implicaciones importantes en la asociación en términos del control de la población de *Symbiodinium* en particular en el manto.

La colonización de dinoflagelados *Symbiodinium* de la masa visceral de *L. gigas*, presentó diferencias en relación al tamaño del organismo y a la población examinada. Al aumentar el peso húmedo de la masa visceral de *L. gigas*, el



volumen que ocupan los dinoflagelados aumenta porque aumenta el número de células en el tejido. Sin embargo, este aumento de células de *Symbiodinium* sólo se observa claramente en los caracoles de menor masa visceral, ya que al alcanzar un cierto peso de masa visceral no se ha encontrado un aumento del volumen que ocupa *Symbiodinium* en el tejido, incluso parece que disminuye el número de células como se observa en el único caracol de gran tamaño (140 g de masa visceral) examinado. Este patrón de variación presentó también claras diferencias entre las poblaciones provenientes de tres sitios distintos de muestreo (Banco Chinchorro, Puerto Morelos e Isla de Cozumel).

Los organismos de Cozumel presentó caracoles con mayor masa visceral y los mayores valores del volumen del tejido ocupado por la población de algas simbiotas en comparación con los caracoles provenientes de Banco Chinchorro y Puerto Morelos (Fig. 19 y 20b).

En los caracoles provenientes de Puerto Morelos se observa un patrón de variación contrario al de la Isla de Cozumel, para pesos similares de masas viscerales de caracoles el número de células de *Symbiodinium* es mucho más alto que el de las poblaciones presentes en los caracoles provenientes de Banco Chinchorro e Isla de Cozumel, pero no es tan diferente en el volumen que ocupan por el tamaño menor



de las células de *Symbiodinium*. Las diferencias entre los organismos de Puerto Morelos y los organismos de la Isla de Cozumel están condicionadas por el tamaño de estos, pero Banco Chinchorro con organismos tan pequeños como los de Puerto Morelos si presentan diferencias no asociadas al tamaño y que pueden ser explicadas por diferencias en la disponibilidad de luz asociada a la profundidad. (Tabla 4). Sería interesante conocer un poco más de la regulación ambiental de la población simbiote dentro del caracol. Muchos pueden ser los factores que podrían explicar estas diferencias ya que los ambientes en los que se recolectaron los organismos son claramente diferentes por ejemplo en cuanto a la disponibilidad de luz (los caracoles provenientes de la Isla de Cozumel se recolectaron a una profundidad de 30 m mientras que los de Puerto Morelos viven a una profundidad de 3 m en donde el campo lumínico es más alto).

Existe una transmisión de luz dentro del caracol ya que *Symbiodinium* lleva a cabo una división celular y estas células están pigmentadas por lo que si hay una actividad fotosintética dentro del caracol. Sin embargo en este trabajo no se ha demostrado la traslocación de fotosintetatos, es claro que existe un beneficio que permite que *Symbiodinium* crezca y se reproduzca dentro del caracol pero no es claro el beneficio para el caracol. Muscatine et al. (1986) encontraron que la



medusa *Mastiglas* sp. regula la densidad poblacional de *Symbiodinium* presentes en la mesoglea por medio de la expulsión y en algunas ocasiones se observó que la regulación fue por medio de la digestión de estas algas, por otro lado Falkowski et al. (1993) determinaron que el control de la densidad poblacional de *Symbiodinium* en el interior de corales hermatípicos era por la limitación de nutrientes y Baghdasarian y Muscatine (2000) mostraron que la pérdida de algas por expulsión en hospederos Cnidarios es uno de los reguladores primarios para la densidad de población de *Symbiodinium*. Usando el I. M. calculado para *L. gigas* la población de *Symbiodinium* se renueva totalmente en 30 días. Como el caracol no digiere a *Symbiodinium*, ni se observó lisis celular (mortalidad) se puede concluir que el caracol es una fuente continua de *Symbiodinium* al ambiente por medio de la expulsión de las células producidas en exceso. Ya que la cantidad de células expulsadas por día debido únicamente a la división celular dentro del caracol es de 6.82×10^5 células por gramo de peso húmedo de tejido húmedo (Tabla 4).

La evidencia de *Symbiodinium* sin señales de digestión en las heces fecales apoya la hipótesis que la regulación de la población de los simbiositos es por expulsión.

De los caracoles adultos de *L. gigas* mantenidos durante 3 meses con alimento comercial, sus heces fecales presentaron abundantes simbiositos sin signos de



digestión que solo pueden haberse reproducido dentro del caracol y que el exceso de simbiontes sería muy probablemente eliminado a través de las heces fecales (Fig. 23). Fitt y Trench (1981) mantuvieron juveniles de *Tridacna* aislados en agua filtrada durante 10 meses, solo con energía lumínica, y en las heces fecales observaron la presencia del simbionte sin signos de digestión.

La cantidad de células de *Symbiodinium* en exceso que produce el caracol cada día (6×10^7) y la expulsión de estos morfológicamente intactos (Fig. 23) pueden jugar un papel muy importante en el ecosistema de arrecifes coralinos. Los dinoflagelados expulsados morfológicamente intactos están disponibles para otros hospederos, por ejemplo, varias especies de larvas de coral, que al momento de ser liberadas no presentan simbiontes, o bien colonias de adultos que se blanquean (Hoegh-Guldberg, 1999; Banaszak et al., 2003).

Los organismos que se blanquean, pero sobreviven al evento pueden adquirir nuevamente simbiontes del ambiente por lo que el *L. gigas* puede ser un importante reservorio para proporcionar simbiontes a los habitantes simbióticos de los arrecifes coralinos. LaJeunesse (2002) identificó la presencia de diferentes clades (A, B, C y D) de dinoflagelados en 69 especies del Phylum Cnidaria (hidras,



medusas, anémonas y corales) de la laguna arrecifal de Puerto Morelos. *Symbiodinium* de clade B1 fue encontrado tanto en *L. gigas* como en casi la mitad de los cnidarios muestreados (33 especies) y es considerada una clade generalista por presentarse en una gran variedad de especies. Varias de las especies de cnidarios huéspedes de *Symbiodinium* Clade B1 como *Cladocora arbuscula*, *Dendrogyra cylindrus*, *Diploria clivosa*, *D. labyrinthiformis*, *D. strigosa*, *Eusmilia fastigiata*, *Manicina aereolata*, *Porites furcata* etc, han sufrido blanqueamiento en los arrecifes de Puerto Morelos por lo que los *Symbiodinium* expulsados de *L. gigas* podrían ser aprovechados por otros hospederos.

Si bien no existe un muestreo exhaustivo de las clades de *Symbiodinium* con las que se asocia *L. gigas* naturalmente, en diversas localidades, el hecho de que solo se hayan reportado dos clades, cuando el caracol podría ingerir dinoflagelados de todas las clades, fortalece la idea de que esta asociación no es incidental.

Por todo lo anterior, *L. gigas* por su simbiosis con *Symbiodinium* es una especie clave en la ecología de los arrecifes coralinos del Caribe y su decaimiento poblacional, debido a la sobre-explotación (Berg, 1976; Chanley, 1982; De la Torre, 1984) puede afectar la diversidad de este ecosistema.



Conclusiones

La presencia de *Symbiodinium* en el caracol *L. gigas* no es una casualidad debido a la localización de dinoflagelados en estructuras no relacionadas con el sistema digestivo de *L. gigas*. Además, los *Symbiodinium* no son una fuente directa de alimento para el caracol porque no presentan signos de digestión y porque son expulsados por el ano sin ser digeridos. Al contrario. *Symbiodinium* crece, se divide en el interior de *L. gigas* y son fotoquímicamente activos. Por lo tanto, se está llevando a cabo una asociación simbiótica funcional con los adultos tanto que la población entera teóricamente se puede renovar en 30 días. Esto significa que *Symbiodinium* juega un papel muy importante, aun por descubrir en la biología de *L. gigas* y que este a su vez juega un papel muy importante en la ecología de los arrecifes coralinos. En base al conocimiento generado hasta el momento sobre la asociación simbiótica entre *Symbiodinium* y los adultos de *L. gigas*, es importante saber cual es la importancia de *Symbiodinium* en el resto del ciclo de vida del caracol *Lobatus gigas*.

CAPITULO 2

**Adquisición del dinoflagelado *Symbiodinium* por el
caracol rosado *Lobatus gigas***



Introducción

La adquisición del *Symbiodinium* por los invertebrados marinos en asociación simbiótica con este dinoflagelado puede llevarse a cabo mediante dos procesos: a) *la herencia materna* en donde la progenie recibe directamente una porción de los simbiontes de la población materna y por esa razón se ha considerado como un sistema cerrado de adquisición ó bien como adquisición vertical (Trench, 1979, 1987) o b) adquisición de los simbiontes del medio ambiente por cada generación por algún estadio del ciclo de vida. Esta adquisición de simbiontes es conocida también como un sistema abierto de adquisición ó adquisición horizontal (Trench, 1979, 1987; Huang, et al., 2008).

Algunos invertebrados que adquieren el simbionte por herencia materna son los hidrozoarios (hydras) (Fraser, 1931 en Trench, 1987), los alcionarios (corales blandos) (Theodor, 1969, en Trench, 1987), los actinarios (anémonas) (Atoda, 1954 en Trench, 1987), varias especies de corales escleractinios (Kruger y Schleyer, 1998) y scyphozoas (medusas) (Davy y Turner, 2003). Algunos ejemplos de organismos que adquieren los simbiontes del medio ambiente son: los scyphozoas (medusas),



gorgonaceos, platelmintos y todas las especies de moluscos bivalvos de la familia Tridacnidae del género *Tridacna* e *Hippopus* y en el molusco bivalvo conocido como corazón *Corculum cardisa* (Kawaguti, 1950) en donde Fitt y Trench, 1981; Fitt et al., 1984, Fitt et al., 1986; Trench et al., 1981 y Hirose et al., 2006 determinaron la ausencia de dinoflagelados *Symbiodinium* en el huevo y en la larva trocófora (ambos procesos llevados a cabo dentro del huevo), por lo que dedujeron que la adquisición del dinoflagelado por los bivalvos era por transmisión abierta. Por lo que cada generación adquiriría los dinoflagelados del ambiente.

En el molusco gasterópodo *L. gigas* puede ser que los dinoflagelados sean adquiridos del ambiente debido a la ausencia de estos en la gónada. Sin embargo (Berner et al., 1986b) en gasterópodos adultos de *Strombus tricornis* de origen del mar rojo encontraron algas que presentaban pigmentos típicos de dinoflagelados como clorofila a, c, peridinina y β caroteno. Estas algas se localizaban en la gónada y el hepatopáncreas. Además, se determinó que las algas eran activas fotosintéticamente y se postuló que podrían aportar carbono al gasterópodo. Por lo anterior esta relación se tendría que estudiar más a fondo.



En sistemas experimentales, se ha mostrado que los beneficios de adquirir el simbionte son un mejor desarrollo larval, mayor supervivencia y crecimiento tanto de larvas como de juveniles (Fitt y Trench, 1981). En las larvas veliger de *Tridacna* se observó que el proceso de metamorfosis se lleva a cabo tanto en presencia como en ausencia de *Symbiodinium* (Fitt y Trench, 1981). En juveniles que en etapa larval no adquieren el simbionte se observa mayor mortalidad a partir de la tercera semana después del desove (Jameson, 1976; Fitt y Trench, 1981; Fitt et al., 1984, et al., 1986). Los beneficios al hospedero como son un mejor desarrollo larval, disminución de mortalidad en esta etapa y mejor crecimiento tanto en etapa larva como en etapa juvenil se obtienen siempre y cuando las larvas veliger sean expuestas a simbiontes recién aislados de la misma especie del hospedero (Fitt y Trench, 1981; Trench et al., 1981; Fitt et al., 1986)

El ciclo de vida del caracol rosado es complejo ya que esta formado por varias etapas que se desarrollan en diferentes partes del arrecife. El desove de la masa de huevo ocurre a profundidades entre 5 y 6 m en áreas arenosas (Stoner, 1997). La puesta de huevos consiste en un tubo continuo lleno de huevos que por ser gelatinoso se cubre completamente con granos de arena (Robertson, 1959 en Pérez y Aldana, 2003) como protección ante depredación (Davis, 2005). En cada



masa ovígera se forma un promedio de 250,000 a 500,000 huevos (D'Asaro, 1965; Brownell, 1977; Iversen, 1983). Dentro de esta masa ocurre el desarrollo embrionario, desde las primeras divisiones hasta la larva trocófora. Estas etapas duran aproximadamente de 3 a 5 días. Posteriormente eclosiona la larva veliger planctónica que forma parte del zooplancton marino (Brito y Aldana, 2000; Davis, 2005).

Entre los 20 y 25 días las larvas cambian sus hábitos planctónicos por bénticos dando origen a una metamorfosis radical (Davis, 1994). El proceso de metamorfosis se define como una transición morfológica entre dos fases multicelulares en organismos dentro de su ciclo de vida (Hodin, 2006). En *L. gigas* la metamorfosis consiste en desarrollar una probóscide, formar la branquia, la migración de los ojos hacia la región anterior, y la formación de un opérculo. (Davis, 1994, 2005). Hasta el momento se sabe que en el gasterópodo *L. gigas* es necesaria la presencia de un precursor que desencadene el proceso de metamorfosis (Davis, 1994), tales como: hojas de *Bathophora oerstedii* (Davis y Stoner, 1999), hojas de *Thalassia testudinum*, macerado de *Thalassia testudinum* (presenta abundantes algas rojas incrustadas que crecen como epifitas.) (Davis, 1994; Boettcher y Targett., 1996), Cloruro de potasio (KCl) (Davis et al., 1990, Davis y Stoner, 1999), ó la macroalga roja *Laurencia*



poitei. Cabe mencionar que esta alga roja es la única que se ha estudiado para la inducción de dicho proceso en moluscos gasterópodos (Davis et al., 1990, 1994, 2005). La *Laurencia poitei* contiene el pigmento R-ficoeritrina el cual se cree puede ser reconocido por algunos sitios específicos en la membrana de la neurona postsináptica de la larva del molusco gasterópodo e inducir la metamorfosis. (Boettcher y Tangett, 1998; Fusetani, 2004), lo que no se sabe es si *Symbiodinium* juega un papel en la metamorfosis de las larvas de *L. gigas*. Dicha metamorfosis da origen a juveniles los cuales se alimentan de diatomeas y algas filamentosas (Buitrago, 1985, Davis 2005) pero son difíciles de encontrar en el ambiente natural y solamente se vuelven a observar cuando tienen un tamaño aproximado de 10 cm (Little, 1965; Ballantine y Appeldoorn, 1983; Rodríguez, 1986; Ogawa y Coral, 1987). Algunos autores han postulado que una vez que ocurre la metamorfosis, los caracoles permanecen enterrados en la arena la mayor parte del tiempo, hasta después del primer año de vida (Berg, 1974; Goodwin, 1983; Appeldoorn, 1985; Stoner, 1989; Stoner y Waite, 1990). Los caracoles juveniles se distribuyen en los lechos de pasto marino a profundidades cercanas a 1 m donde el alimento es abundante y existe poco oleaje (Sidall, 1983, 1984; Appeldoorn, 1984a; Sandt y Stoner, 1993). El crecimiento de los juveniles en condiciones naturales es relativamente rápido, en promedio 0.9 cm/mes en longitud de la concha.



En el capítulo anterior se ha mostrado que los adultos de *L. gigas* forman una asociación simbiótica con *Symbiodinium* basada en la presencia de los simbiositos en estructuras anatómicas no relacionadas con el tracto digestivo y la habilidad del simbiote de dividir y crecer dentro del hospedero. Sin embargo, no se sabe como es adquirido el simbiote por las etapas tempranas ni cuál es su papel de en esta fase.

Hipótesis General de Investigación

El dinoflagelado *Symbiodinium* es adquirido en algún estadio del ciclo de vida del caracol *Lobatus gigas* y su presencia beneficia al desarrollo del gasterópodo.

Objetivo General

Definir en que estadio del ciclo de vida del caracol *Lobatus gigas* son adquiridos los dinoflagelados *Symbiodinium* y si la adquisición de éstos afecta el desarrollo del caracol.

Objetivos particulares

Determinar cómo adquieren las larvas de *L. gigas* el simbiote; por transferencia materna o del medio ambiente.



Determinar si las larvas veliger pueden adquirir el simbionte, y cuándo ocurre.

Determinar que beneficios tienen las larvas veliger si adquieren el simbionte.

Determinar si la presencia del simbionte induce el proceso de metamorfosis de las larvas.

Determinar si los juveniles obtienen un beneficio por la presencia de los simbiontes.

Materiales y Métodos

Presencia o ausencia de *Symbiodinium* en las etapas tempranas de desarrollo de *L. gigas*.

Recolecta y fijación de la masa ovígera. Se recolectó una masa ovígera de una hembra al finalizar la ovoposición mediante buceo SCUBA durante la época de desove con la ayuda de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Langosteros de Banco Chinchorro" (18° 45' N, 87° 18' O) y del M. en C. Donaldo Martínez Vázquez del Centro Regional de Investigación Pesquera en Puerto Morelos del Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA). La profundidad de recolección fue de 10 m. Al llegar a la superficie, inmediatamente se tomaron segmentos al azar de aproximadamente 3 cm de longitud en formol al 4% en agua de mar



filtrada con filtros GF/F (Whatman, Inglaterra). Se fijaron muestras cada dos horas mientras se transportaba la masa ovígera en una nevera con agua de mar hasta el Laboratorio de Fotobiología de la Unidad Académica de Sistemas arrecifales (Puerto Morelos) perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma México. Durante el transporte se trató de mantener la temperatura similar a la del ambiente natural y periódicamente se removía el agua para oxigenarla. Se continuó con el proceso de la fijación de la masa ovígera cada dos horas hasta la eclosión, aproximadamente 5 días después. Para determinar la presencia o ausencia de *Symbiodinium* en la masa ovígera se observaron las muestras bajo el microscopio compuesto (Olympus CH20, Japón).

Adquisición de *Symbiodinium* por larvas veliger en sistemas experimentales

Recolecta. Se recolectaron 4 masas ovígeras mediante buceo SCUBA, durante la época de desove de *L. gigas*, en la Isla de Cozumel (20° 30' N, 86°50' O) a una profundidad de 25 m el 2 de abril del 2005 con la ayuda de la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera "Cozumel" y de la Dra. Claudia Padilla Souza y del M. en C. Donald Martínez Vázquez, ambos del CRIP-Puerto Morelos.



Se trasladaron las masas ovígeras en neveras con agua de mar hasta el CRIP-Puerto Morelos procurando mantener la temperatura similar a la del ambiente natural y periódicamente se removía el agua para oxigenarla.

Incubación. En el CRIP-Puerto Morelos, las masas ovígeras se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio comercial a una concentración al 0.5% (10 ml de cloro al 5% para uso doméstico en un litro de agua de mar filtrada y esterilizada) durante 30 s de acuerdo con Davis y Hesse 1983 (en Davis, 1994). Posteriormente se enjuagaron las masas con abundante agua marina filtrada con el fin de retirar los excesos de sedimentos, bacterias, depredadores tales como poliquetos, nemátodos, crustáceos y algas que pudieran afectar el desarrollo del huevo (Davis, 2005). Una vez lavadas las masas ovígeras, se incubaron en un sistema de flujo continuo (1 l/min), constituido por un colador suspendido en un recipiente de plástico con una capacidad de 86 l a una temperatura de 28 °C (Davis, 1994). En este sistema se mantuvieron las masas ovígeras durante aproximadamente 5 días, tiempo que dura el desarrollo embrionario completo.

Sistema experimental. Para el mantenimiento de las larvas veliger durante los tratamientos se utilizó un sistema de circulación cerrado; constituido por un



acuario rectangular de plástico transparente con un volumen aproximado de 8 l. Dentro de éste, se colocó un contenedor cilíndrico de PVC de 17 cm de diámetro, con una altura de 12.5 cm y un volumen aproximado de 2 l.

Se colocó a 5 cm de la base del contenedor una malla para plancton con una apertura de luz de malla de 200 μm . En la base del contenedor cilíndrico se realizaron 6 aberturas con la finalidad de facilitar el flujo del agua a través de éste. El aire utilizado para todo el sistema fue proporcionado por un compresor y éste a su vez regulado por llaves de paso hacia los sistemas de experimentación.

En el sistema de circulación cerrado, el aire fue dirigido por una manguera de silicona de 0.5 cm de diámetro a través de un tubo de PVC de 1.9 cm. Se colocó una piedra aireadora al extremo de la manguera de silicona introducida en el tubo de PVC, con la finalidad de obtener aireación más fina y producir el movimiento del agua hacia el extremo distal del tubo permitiendo la circulación del agua en el sistema como se observa en la figura 24 (Máximo y Alvarenga, 2002).

El flujo del agua en el sistema fue aproximadamente de 54 ml/min lo que equivalió aproximadamente a 9 recambios de agua en 24 h en cada acuario. La construcción

de este sistema se realizó con la finalidad de evitar la manipulación de las larvas veliger en experimentación.

Antes de iniciar los experimentos, los acuarios fueron lavados con hipoclorito de sodio, y enjuagados con abundante agua dulce, dejándolos secar durante 24 h. Posteriormente, se procedió al llenado de los acuarios con agua de mar esterilizada con una lámpara UVC. Se utilizaron entre 9 a 16 acuarios en los experimentos.

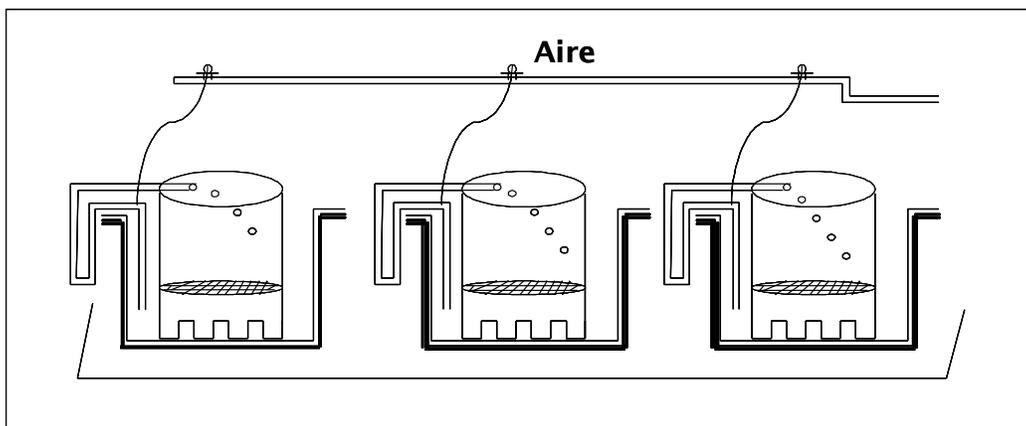


Figura 25. Sistema de flujo cerrado completo, mostrando los contenedores cilíndricos de PVC con una malla de plancton a 5 cm de la base y aberturas en esta para facilitar el flujo del agua a través del sistema y mantener el flujo continuo. El sistema fue colocado dentro de un acuario rectangular de plástico transparente de 8 l de capacidad. El diagrama presentado no está realizado a escala. (Esquema realizado por Maribel García Ramos).



Aislamiento de *Symbiodinium* para inocular las larvas veliger: Se realizaron 4 inoculaciones a diferentes tiempos. Para cada inoculación de larvas se recolectó un caracol adulto de *L. gigas* en la laguna arrecifal de Puerto Morelos para obtener la glándula digestiva en donde se encuentran más del 95% de los simbioses (ver capítulo 1). Se diseccionaron los caracoles y se obtuvo la glándula digestiva se cortó con navaja, se colocó en agua de mar filtrada y se licuó con una homogeneizadora Tissue Tearor™ (Biospec Products, Inc. EUA), hasta que la muestra presentó un aspecto homogéneo. Se tomó una submuestra, se centrifugó a 100 g durante 3 min en una centrifuga (Eppendorf 5810 R). Esta operación se repitió 4 veces para separar a *Symbiodinium* del tejido, entre cada centrifugación se lavó la pastilla con agua de mar filtrada, y se homogeneizó con un molinillo de vidrio.

La presencia de dinoflagelados libres se corroboró con observaciones bajo el microscopio compuesto (Olympus CH20, Japón). Al comprobar durante estas observaciones la muestra libre de tejido del hospedero, se procedió al conteo de los dinoflagelados en un hematocitómetro bajo el microscopio compuesto.



Edad óptima de larvas veliger para inoculación con *Symbiodinium*: Una vez obtenidas las larvas veliger después de la eclosión, se utilizaron 1600 en este experimento: 1,200 larvas fueron distribuidas en 4 diferentes tratamientos correspondientes a las diferentes edades de larvas (0, 24, 48 y 72 h después de la eclosión), cada tratamiento estuvo constituido por 100 larvas y replicado 3 veces.

Las 400 larvas restantes se distribuyeron en cuatro sistemas anexos (representando cada tratamiento) de donde se tomaron muestras de larvas cada dos días para su fijación en formaldehído al 4% en agua del mar filtrada para el seguimiento del número de células de *Symbiodinium* en los tejidos de las larvas. Estas muestras se observaron bajo el microscopio compuesto (Olympus CH20, Japón). Las inoculaciones fueron de 1×10^6 células de *Symbiodinium* por tratamiento de 100 larvas veliger. Los organismos fueron expuestos a una irradiancia de $4 \mu\text{mol}$ cuanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ con un fotoperiodo de 8:16 h (luz:oscuridad) por medio de dos lámparas fluorescentes de 39 W (Limite la longitud de onda de la luz actínica azul, que necesitan los invertebrados y corales fotosintéticos marinos). La irradiancia fue medida con un sensor plano corregido por coseno conectado a un fluorómetro sumergible (Diving PAM, Walz, Alemania).



Las lámparas se encendían y apagaban con un temporizador durante el experimento. Cambios parciales de agua en el sistema se realizaron cada 4 días (Fitt y Trench, 1981). El primer tratamiento fue de larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* inmediatamente después de la eclosión (0 h). En el segundo, tercero y cuarto tratamiento las larvas veliger fueron inoculadas con *Symbiodinium* a las 24, 48 y 72 h después de la eclosión.

En el texto se citan a los tratamientos como L₀, L₂₄, L₄₈ y L₇₂ para referirse a las larvas veliger inoculadas en los diferentes tiempos después de la eclosión. Las larvas veliger de cada tratamiento se alimentaron con 2000 a 3000 células de *Isochrysis* sp. cada 24 h (Fitt y Trench, 1981; Aldana et al., 1994). *Isochrysis* sp. se cultivó según la técnica de Guillard (1975) en donde los cultivos de fitoplancton se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 500 ml de borosilicato estériles y el medio F/2. Fue procurado el suministro de alimento todos los días aproximadamente a las 10:00 am. El número de larvas veliger sobrevivientes se cuantificó a diario. Además, cada dos días se tomó tres larvas al azar de cada tratamiento con el fin de observarlas y fotografiarlas en un microscopio invertido PC Scope digital (Kosmos Scientific, EUA) y fueron incorporadas nuevamente a los acuarios. A partir de las fotografías tomadas se llevó un registro de las larvas midiendo la longitud total



conocida como la longitud sifonal de la concha desde el ápice hasta el borde exterior del canal sifonal (Randall, 1964a; García y Aldana, 1999). Con el fin de determinar la localización de *Symbiodinium* y el aumento en número del mismo a diferentes tiempos en las larvas veliger, se tomaron muestras de tres larvas cada dos días del sistema anexo al experimento.

Las muestras fueron fijadas en formaldehído al 4% en agua de mar filtrada, para su conteo posterior en el microscopio compuesto (Olympus CH2O, Japón). Una vez fijadas las larvas, se descalcificaron las conchas con una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1.88 μM), tartrato de potasio y sodio (0.034 μM), tartrato de sodio (0.608 μM) y ácido clorhídrico (1.19 N). Posteriormente se realizaron las disecciones de las masas viscerales. De cada una se extrajeron la glándula digestiva, el intestino, el estómago, los ocelos (ojos), el manto, los velos y la branquia. Una vez localizados los dinoflagelados en las larvas veliger, se llevó a cabo el conteo de los simbioses en estos tejidos y órganos.

Supervivencia de larvas veliger en presencia o ausencia de *Symbiodinium*:

Para determinar si la adquisición del simbionte influye en la supervivencia de las larvas veliger en condiciones de experimentación se utilizaron 1200 en este



experimento con 48 horas de edad: 900 larvas fueron expuestas a 3 tratamientos diferentes (100 individuos por cada tratamiento). Cada uno de los tratamientos fue replicado 3 veces y las 300 larvas restantes se distribuyeron en tres sistemas anexos (representando cada tratamiento), para el seguimiento del número de células de *Symbiodinium* en los tejidos de las larvas como se mencionó anteriormente.

El primer tratamiento consistió en larvas veliger alimentadas con 2000 a 3000 algas de *Isochrysis* sp. diariamente sin ser inoculadas con *Symbiodinium*. El segundo tratamiento fue de larvas veliger inoculadas en una única ocasión con *Symbiodinium* a las 48 h de la eclosión sin suministro de alimento durante todo el experimento. El tercer tratamiento fue de larvas veliger alimentadas con 2000 a 3000 células de *Isochrysis* sp. diariamente e inoculadas en una única ocasión con *Symbiodinium* a las 48 h después de la eclosión. Las larvas fueron expuestas a una intensidad de luz de $36 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 8:16 h (luz:oscuridad) por medio de una lámpara fluorescente. (Sera blue sky royal, Sera deep sea, Alemania). La irradiancia fue medida con un sensor plano corregido por coseno conectado a un fluorómetro sumergible (Diving PAM, Walz, Alemania).



Las inoculaciones con *Symbiodinium* fueron de 1×10^6 células por réplica aislados de la glándula digestiva de un adulto de *L. gigas* recolecta en la Laguna arrecifal de Puerto Morelos.

En los tratamientos con suministro de alimento, se procuró que la administración del mismo fuera siempre a la misma hora. En el texto se citan como L_I a las larvas veliger alimentadas con *Isochrysis* sp., L_S a las larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* y L_{I/S} a las larvas veliger alimentadas con *Isochrysis* sp. e inoculadas con *Symbiodinium*.

Inducción de metamorfosis: Las larvas entre los 25 y 30 días de edad después de la eclosión presentaron cambios estructurales indicando la preparación de la larva para el proceso de metamorfosis.

Las 166 larvas sobrevivientes del experimento anterior pertenecientes al tratamiento de alimentación con *Isochrysis* sp. e inoculación con *Symbiodinium* fueron divididas en 2 grupos utilizando el mismo diseño de sistema experimental de circulación cerrado. El primer grupo de larvas fue inducido a la metamorfosis a los 30 días con la macroalga roja *Laurencia poitei* (Davis et al., 1990). El segundo



grupo, en donde las larvas sólo habían sido expuestas a la presencia de *Symbiodinium*, no se indujo la metamorfosis durante los primeros 10 días, por lo que las larvas no mostraron señales de metamorfosis al finalizar el tiempo de observación, por lo que se procedió a inducir a este grupo con *Laurencia poitei* a los 40 días de edad. Las larvas fueron observadas en un microscopio PC Scope digital (Kosmos Scientific, EUA).

Juveniles en sistemas experimentales

Supervivencia: Se monitoreó la supervivencia de los caracoles juveniles de *L. gigas* de los dos lotes experimentales que en estado larval adquirieron *Symbiodinium* y fueron alimentados con *Isochrysis* sp. e inducidos a la metamorfosis en diferentes tiempos con *Laurencia poitei*. Los registros de supervivencia se realizaron cada 15 días a partir de los 30 días después de la metamorfosis, estos registros se llevaron a cabo por 45 días aproximadamente, fecha en que se interrumpieron los experimentos debido a la amenaza del Huracán Wilma y posterior efecto sobre las instalaciones de la UNAM y CRIP de Puerto Morelos.

Crecimiento: Se monitoreó el incremento de la longitud sifonal de la concha en los mismos juveniles. Asimismo, se tomaron medidas de 15 caracoles prestados por la



Dra. Claudia Padilla Souza (CRIP-Puerto Morelos) que fueron criados en sistemas de 1000 l.

Estos caracoles no fueron inoculados con *Symbiodinium* en etapa larval y se indujeron a la metamorfosis con *Laurencia poitei* en el día 30. En ambos casos se midió la longitud sifonal de la concha con un vernier (Scienceware, EUA). Estas mediciones fueron realizadas cada 15 días a partir de los 30 días después de la metamorfosis, por 45 días aproximadamente, fecha en que se interrumpieron los experimentos debido a la entrada del Huracán Wilma en el estado de Quintana Roo.

Metodología estadística

Los datos obtenidos de los experimentos de supervivencia entre grupos de larvas veliger de *L. gigas* de diferentes edades (0, 24, 48 y 72h) en presencia de *Symbiodinium* y la supervivencia de larvas veliger de *L. gigas* con la misma edad en presencia ó ausencia de *Symbiodinium*, se valoraron por medio del programa de The Statistical Discovery Software JMP 5.1 para los análisis estadísticos. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron Log-rang, Wilcoxon, Análisis de Varianza, Ajuste de datos a función logarítmica, exponencial, lineal y coeficiente de determinaciones.



Log-rank

(Prueba de rango logarítmico): Comparación de curvas de Supervivencia)

La prueba no paramétrica log-rank compara dos o más curvas de supervivencia, el método calcula para cada tiempo el número de eventos terminales que se esperarían asumiendo que no hay diferencias entre ambas curvas de supervivencia).

Se obtiene un valor final que puede compararse mediante una distribución de X^2 (ji-cuadrada): considerada como una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica (bondad de ajuste), indicando si hay o no diferencias estadísticamente significativas entre ambas curvas, de haberlas, se debe al azar.

Wilcoxon.

(Prueba de la suma de rangos)

La prueba no paramétrica wilcoxon (suma de rangos) compara dos o más curvas de supervivencia, útil para detectar diferencias tempranas en las probabilidades de supervivencia.



Resultados

Symbiodinium no es heredado por herencia materna de adultos de *L. gigas* a su progenie porque al observar los segmentos de la masa ovígera en los estadios del desarrollo embrionario, el desarrollo de la larva trocófora y el filamento pegajoso delgado que los rodea como protección, se determinó que no hay evidencia de la presencia de *Symbiodinium* (Fig. 26 a y b).

La edad óptima para infectar las larvas de *L. gigas* con *Symbiodinium* en sistemas experimentales es a las 48 h de la eclosión, ya que este tratamiento es el que produjo la mayor supervivencia de los cuatro tiempos examinados (Fig. 27).

Las larvas presentaron una mortalidad del 100% al ser expuestas a *Symbiodinium* inmediatamente después de la eclosión, mientras que las larvas expuestas al simbionte a las 24h y 72h de haber eclosionado sobrevivieron hasta 7 y 5 días, respectivamente, después de la inoculación (Fig. 27). Las larvas expuestas a *Symbiodinium* en las 48 h de haber eclosionado presentaron aproximadamente un 20% de supervivencia, 13 días después de la inoculación con los simbioses. Como

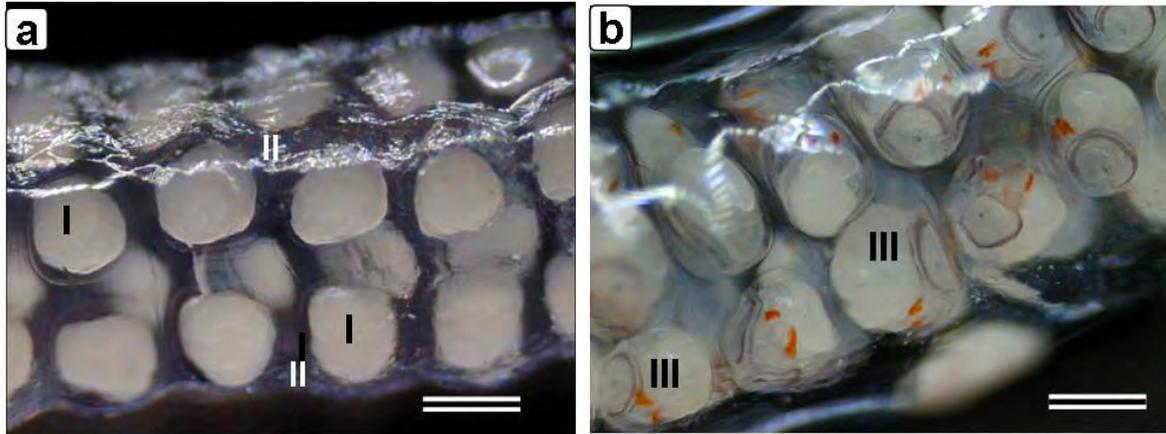


Figura. 26. (a) Masa ovígera de *Lobatus gigas* con un día de edad con embriones (I) dentro del filamento pegajoso (II) ambos sin evidencia de presencia de *Symbiodinium*. Barra = 100 μm y (b) Etapa trocófora con 4 días de edad, sin evidencia de presencia de *Symbiodinium* (III). Barra = 150 μm . (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

consecuencia de una subida drástica de la temperatura en el sistema experimental todas las larvas murieron durante el día 13 (Fig. 27).

Dentro de las larvas inoculadas inmediatamente después de la eclosión (0 h) y a las 72 h no se observó la presencia de *Symbiodinium* durante el periodo de observación, mientras que en las larvas inoculadas a las 24 h la presencia de *Symbiodinium* fue visible a partir del segundo día después de la inoculación y el simbionte fue visto en todas las larvas del tratamiento. En las larvas inoculadas a las



48 h observadas al azar la presencia de *Symbiodinium* fue aparente al tercer día después de la inoculación, siendo constante hasta el final del experimento.

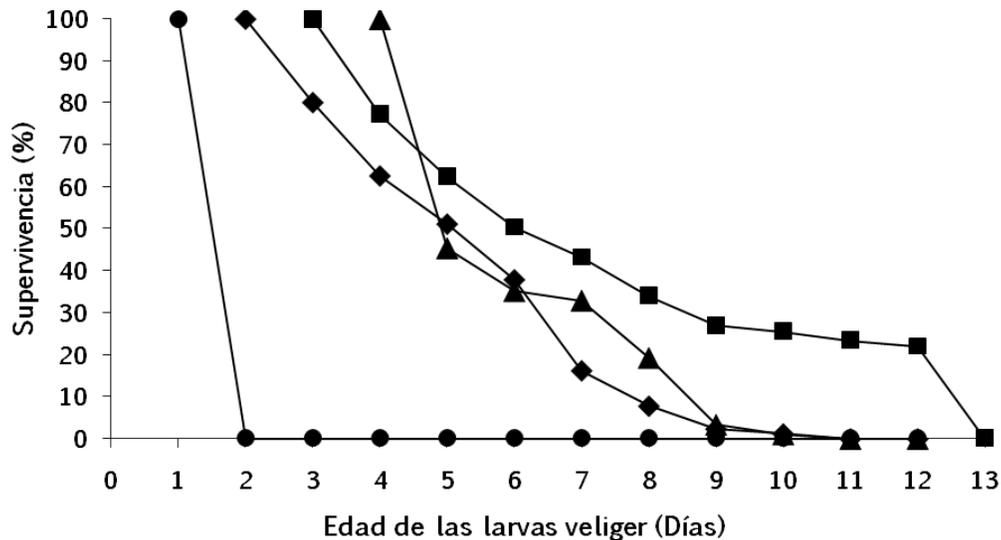


Figura 27. Supervivencia (%) de larvas veliger de *Lobatus gigas* inoculadas con *Symbiodinium* a diferentes tiempos-edades de la larva. Se monitoreó su evolución a lo largo de 13 días desde el inicio del experimento. Graficados son los porcentajes con barras de desviación estándar. Los símbolos representan la edad de las larvas a la que fueron inoculadas. (●) 0 h (L₀), (◆) 24 h (L₂₄), (■) 48 h (L₄₈) y (▲) 72 h (L₇₂).

La prueba de log-rank mostró que en las curvas de supervivencias de la figura 28 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) entre las diferentes horas de inoculación (0, 24, 48 y 72) horas en las larvas veliger con el dinoflagelado simbiote. Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se determinaron al realizar comparaciones entre las diferentes horas de inoculación en las larvas veliger por medio del estadístico de Log-rank.

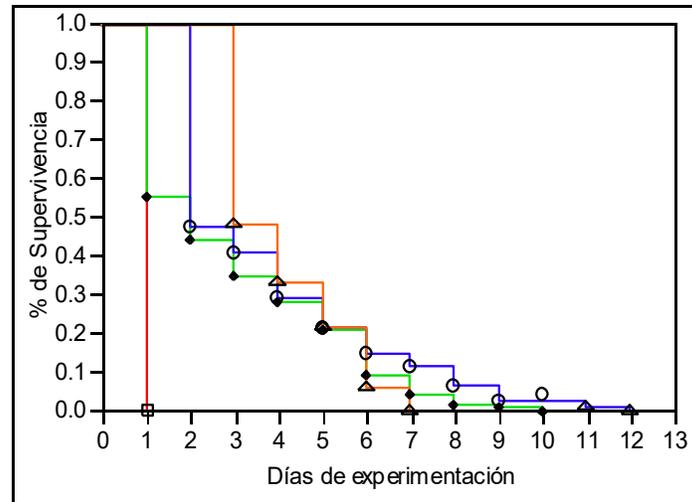


Figura 28. Variación de la supervivencia de larvas veliger del caracol rosado *Lobatus gigas* inoculadas a diferentes horas con el dinoflagelado *Symbiodinium*. 0 (□); 24 (◇); 48 (○); y 72 (△) horas.

Al comparar los tiempos de inoculación: 0–24; 0–48; 0–72; 24–48, 24–72 y 48–72 horas con el dinoflagelado *Symbiodinium* en las larvas veliger, por medio del análisis de Wilcoxon se obtuvo que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$); en todos los tratamientos.

En la disección de las larvas veliger (Fig. 29 a), se observó la presencia de *Symbiodinium* en la glándula digestiva y el estómago (Fig. 29 b y c), con algunas células del simbionte en proceso de división (Fig. 29 d y e). No se encontraron simbiontes en la branquia, el intestino, los ocelos, el manto ni los velos (Fig. 29 f).

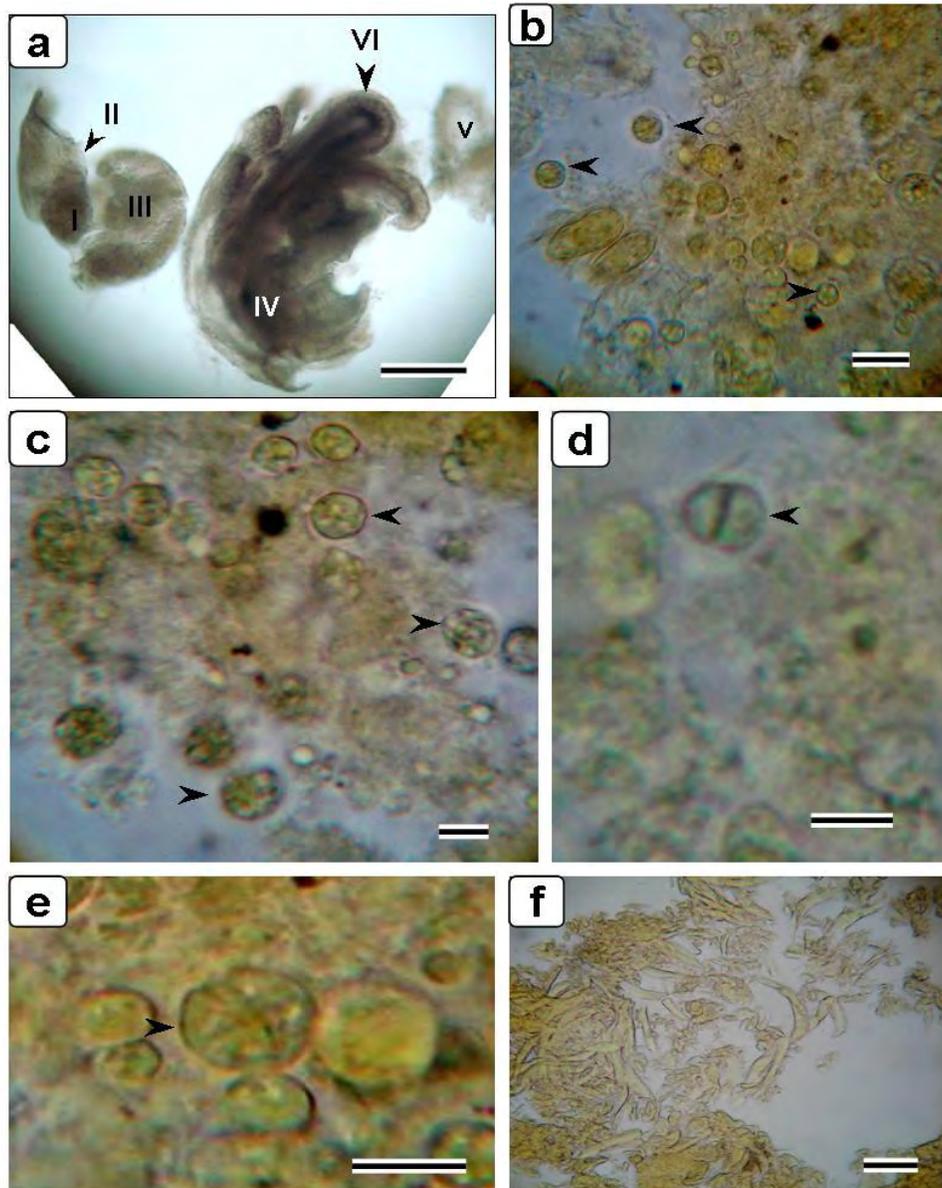


Figura 29 (a) Disección de larva veliger de *Lobatus gigas* de 9 días de edad inoculadas con *Symbiodinium* a las 48 h después de la eclosión. (I) Glándula digestiva, (II) intestino, (III) estómago, (IV) ocelos, (V) manto y (VI) velos. Barra = 100 μm , (b) *Symbiodinium* presente en la glándula digestiva y (c) en el estómago. Barras = 20 μm , (d) división celular de *Symbiodinium* en el estómago y (e) en la glándula digestiva. Barras = 10 μm y (f) ausencia de *Symbiodinium* en la branquia. Barra = 100 μm . (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).



Las células de *Symbiodinium* en el interior de las larvas veliger L₂₄ y L₄₈ presentaron un crecimiento logarítmico tanto en el estómago como en la glándula digestiva (Fig. 30).

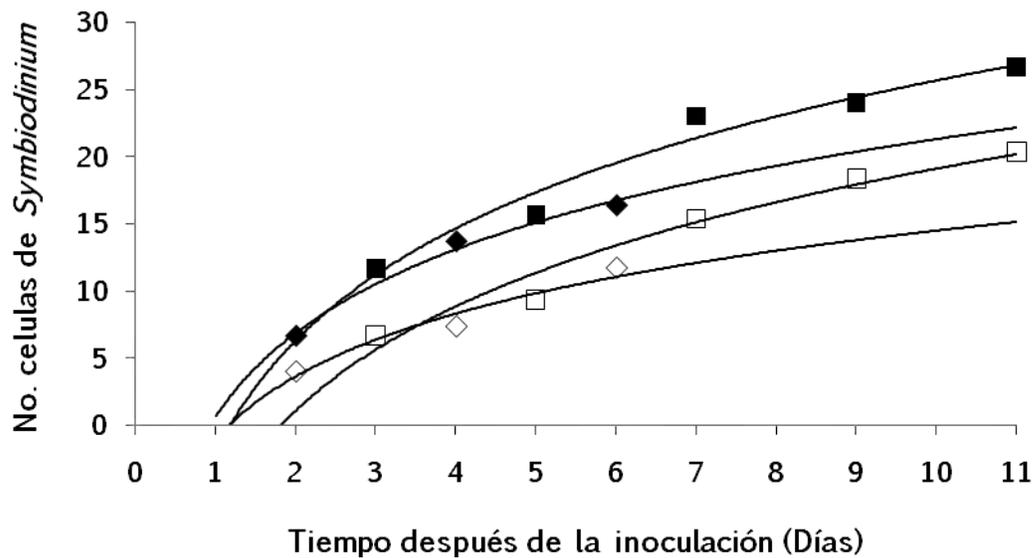


Figura 30. Número de células de *Symbiodinium* en el interior de las larvas veliger de *Lobatus gigas* inoculadas a diferentes edades. Graficados son los promedios con barras de desviación estándar. Los símbolos representan la edad de inoculación de las larvas. 24 h (L₂₄) con la presencia del simbiote en la glándula digestiva (◆) $y=11.151\ln(x)-6.6272$ $R^2=0.9606$ y (◇) en el estómago $y=6.7449\ln(x)-1.0369$ $R^2=0.9501$; y 48 h (L₄₈) con la presencia del simbiote en la glándula digestiva $y=12.004\ln(x)-2.0058$ $R^2=0.9631$ y (□) en el estómago $y=8.7318\ln(x)+0.5102$ $R^2=0.994$. Las líneas representan el ajuste de los datos a una función logarítmica y en la gráfica se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.



En base a los resultados del experimento anterior, se procedió a determinar la supervivencia de larvas veliger en ausencia y presencia de *Symbiodinium*. Las larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. e inoculadas con *Symbiodinium* tuvieron la mayor supervivencia en comparación a los otros dos tratamientos presentando una supervivencia cercana al 73 % en los primeros 12 días del experimento.

En el decimotercer día, se observó un decremento brusco en la supervivencia de las larvas. Lo anterior fue causado por la entrada del huracán Emily que afectó las instalaciones del CRIP-Puerto Morelos y como consecuencia se produjo un aumento en la temperatura de entre 3 y 4 °C en los tanques experimentales. Esta anomalía térmica perjudicó las condiciones de cultivo de la microalga *Isochrysis* sp. resultando en una escasez del alimento lo cual afectó considerablemente la población experimental (Fig. 31).

Las larvas únicamente alimentadas con *Isochrysis* sp. presentaron una mortalidad del 100% para el día 10 mientras que las larvas únicamente inoculadas con *Symbiodinium* presentaron 99.6% de mortalidad para el día 16. Después de este período, sólo una larva veliger sobrevivió sin alimento por 50 días con luz y agua de mar filtrada.

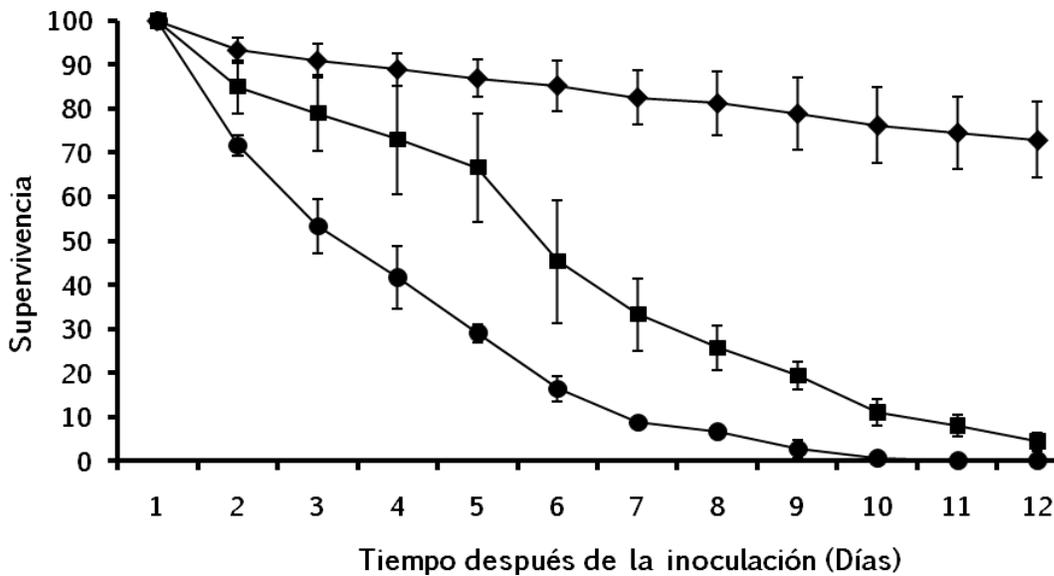


Figura 31. Supervivencia de larvas veliger de *Lobatus gigas* en ausencia y presencia de *Symbiodinium*. (●) Alimentadas con *Isochrysis* sp. diario (L_i), (■) Inoculadas con *Symbiodinium* una sola vez (L_s), y (◆) Inoculadas con *Symbiodinium* una sola vez y alimentadas diario con *Isochrysis* sp (L_{i/s}). Se graficaron los promedios con barras de desviación estándar.

Por medio de las prueba de log-rank y wilcoxon mostraron que en las curvas de supervivencias de la figura 31 existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) entre los diferentes tratamientos (alimentadas con *Isochrysis*, inoculadas con *Symbiodinium* y alimentadas con *Isochrysis* e inoculadas con *Symbiodinium*) (Fig. 32).

Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizaron

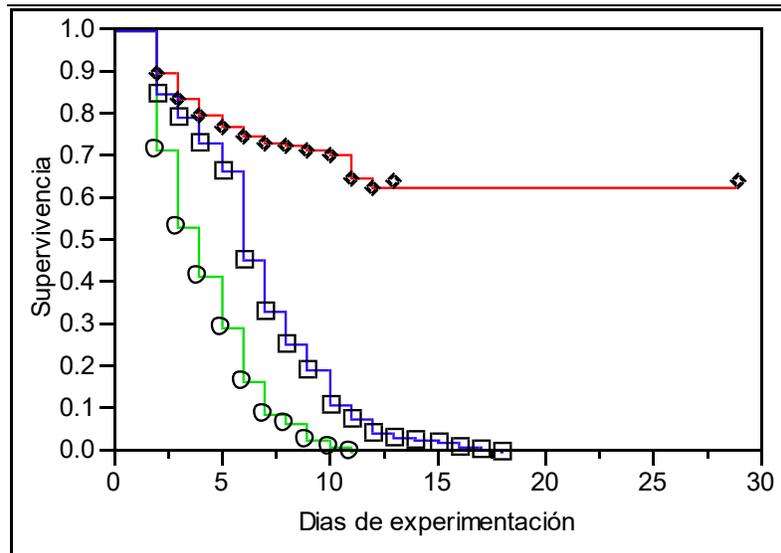


Figura 32. Variación de la supervivencia de larvas veliger de *Lobatus gigas* en ausencia y presencia de *Symbiodinium*. a) Alimentadas con *Isochrysis* (○), b) Inoculadas con dinoflagelados *Symbiodinium* (□), y c) Alimentadas con *Isochrysis* e inoculadas con dinoflagelados *Symbiodinium* (◇).

comparaciones entre estos, por medio del análisis estadístico de Log-rank y Wilcoxon.

Al comparar los tratamientos de larvas veliger alimentadas con *Isochrysis*, larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* (inoculación única) y larvas veliger alimentadas con *Isochrysis* e inoculados con *Symbiodinium*; mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para ambas pruebas estadísticas.



Para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizaron comparaciones entre estos, por medio del análisis estadístico de Log-rank y wilcoxon. Al comparar los tratamientos de larvas veliger alimentadas con *Isochrysis*, larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* (inoculación única) y larvas veliger alimentadas con *Isochrysis* e inoculados con *Symbiodinium*; mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) para ambas pruebas estadísticas.

En los dos tratamientos que fueron expuestos a *Symbiodinium* (en presencia y ausencia de alimento), al tercer día los dinoflagelados fueron visibles. En el día 10 se observan *Symbiodinium* en la glándula digestiva y el estómago (Fig. 33).

El crecimiento, medido como incremento en la longitud sifonal con tiempo, se observa en la figura 34.

Durante los primeros 7 días que sobrevivieron las larvas alimentadas solo con *Isochrysis* sp. presentaron un incremento sifonal similar con las larvas inoculadas con *Symbiodinium*, sin embargo, estas presentaron una mortalidad del 100% en los primeros días de experimentación, en comparación con las larvas solo inoculadas con *Symbiodinium* y las larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. e inoculadas con *Symbiodinium*, los cuales presentaron mayor incrementos en su longitud sifonal.

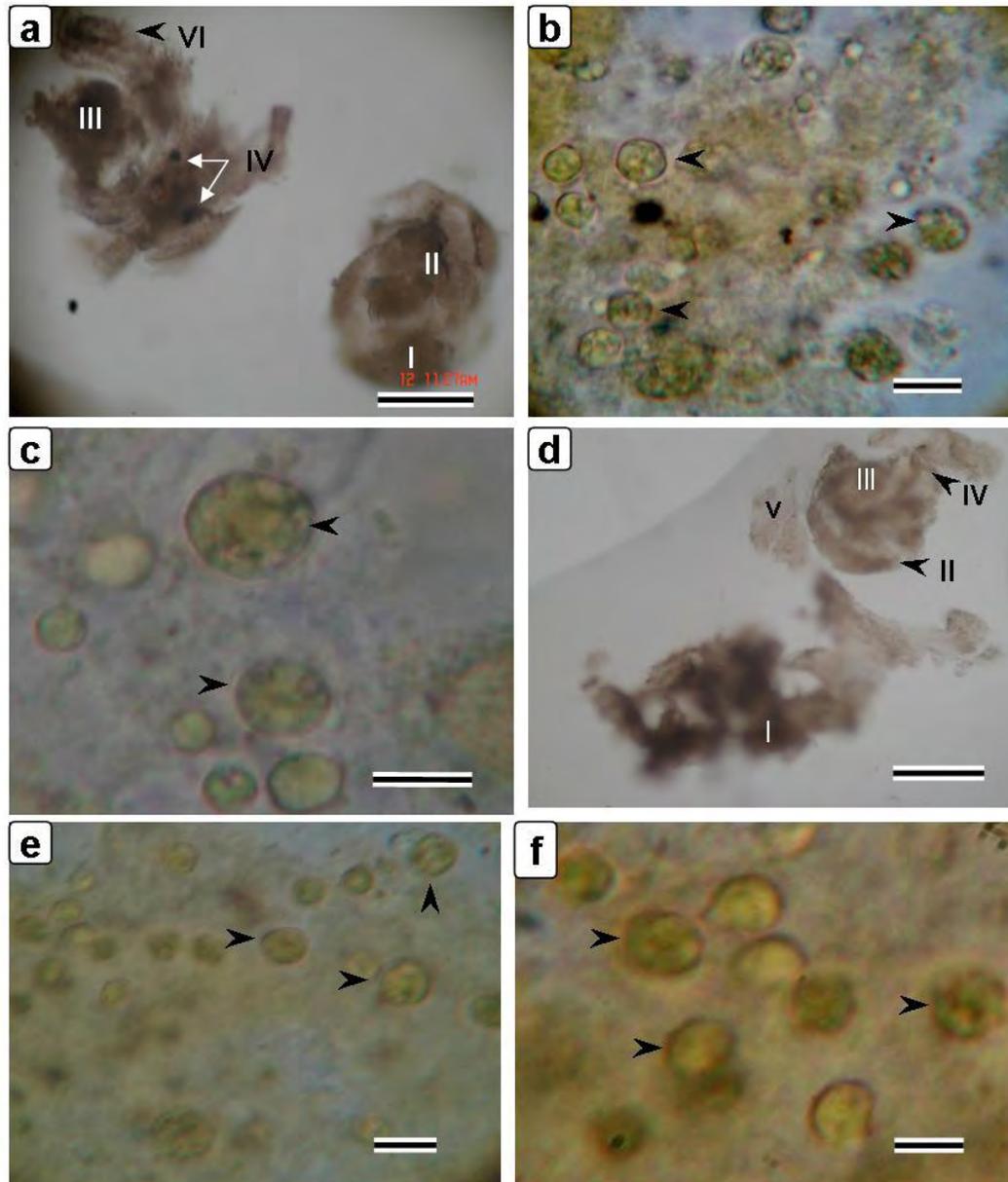


Figura 33. (a y d) Disección de larva veliger de *Lobatus gigas* de 10 días de edad. Barras = 100 µm, (I) glándula digestiva, (II) intestino, (III) estómago, (IV) ocelos, (V) manto y (VI) velos. Con presencia de *Symbiodinium* (b) en la glándula digestiva y (c) en el estómago inoculadas con *Symbiodinium* una sola vez (L_s). (e) *Symbiodinium* presente en la glándula digestiva y (f) en el estómago en larvas veliger Inoculadas con *Symbiodinium* una sola vez y alimentadas diario con *Isochrysis* sp. (L_{15}). Barras = 10 µm. (fotos tomadas por Maribel García Ramos).

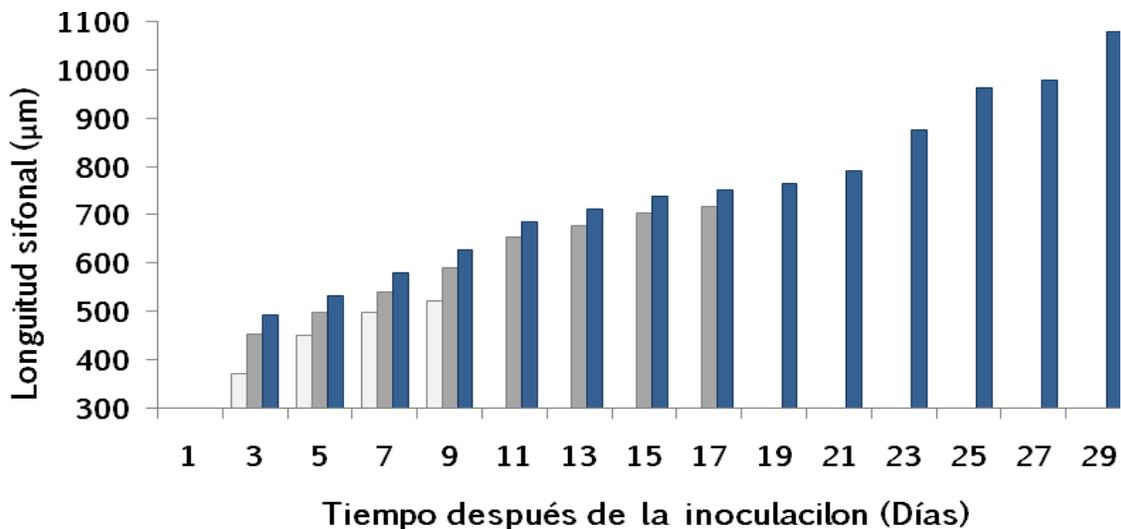


Figura 34. Crecimiento de larvas veliger de *Lobatus gigas*, en ausencia y presencia de *Symbiodinium*. (□) Larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. (L₁), (■) Larvas Inoculadas con *Symbiodinium* (L₅) una sola vez y (■) Larvas Inoculadas con *Symbiodinium* una sola vez y alimentadas con *Isochrysis* sp. (L_{1/5}).

Las larvas solo inoculadas con *Symbiodinium* sobrevivieron 12 días en comparación con el lote de larvas alimentado con *Isochrysis* sp. e inoculados con *Symbiodinium* quienes concluyeron la etapa larval veliger y mostraron las modificaciones necesarias para entrar al proceso de metamorfosis. Por medio del análisis de varianza se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) en el incremento de la longitud sifonal de las larvas alimentadas con *Isochrysis*, inoculadas con el dinoflagelados *Symbiodinium* y en las larvas



alimentadas con *Isochrysis* e inoculadas con el dinoflagelados *Symbiodinium*, por lo tanto esto significa que en todo el estudio existe alguna diferencia en el incremento de la longitud sifonal entre las larvas del caracol *L. gigas*.

El número de las células de *Symbiodinium* en el interior de las larvas inoculadas solo una ocasión con *Symbiodinium* y las larvas alimentadas con *Isochrysis* e inoculadas solo una ocasión con *Symbiodinium* presentaron un incremento exponencial hasta el día séptimo de la inoculación (Fig. 35), sin embargo para el noveno día las larvas alimentadas con *Isochrysis* e inoculadas solo una ocasión con *Symbiodinium* presentaron un incremento en el número de células de *Symbiodinium* en comparación con las larvas solo inoculadas en una ocasión con células de *Symbiodinium* probablemente porque la comida almacenada en las larvas en forma de albumina se ha agotado (Davis, 1994).

El número de células de *Symbiodinium* se ve afectada en el día 16 en las larvas inoculadas con *Symbiodinium* (excepto las células de *Symbiodinium* que se encuentran en la glándula digestiva) y las larvas que fueron alimentadas con *Isochrysis* e inoculadas con *Symbiodinium*, probablemente porque las larvas están desarrollando varios sistemas (digestivo y respiratorio, excepto el reproductivo) y



esto afecta la presencia de *Symbiodinium* en el interior de la larva así como la sobrevivencia de las larvas al grado de ocasionar la muerte de estas como se observa en las larvas inoculadas solo en una ocasión con células de *Symbiodinium* (Fig. 35).

El número de células de *Symbiodinium* aumenta nuevamente a partir del día 20 en el interior de las larvas (Fig. 35), posiblemente porque el corazón de las larvas aumentan en tamaño y en contracciones, la longitud de los lóbulos velares son tres veces más largos que la longitud sifonal de la larva veliger y la masa bucal esta en desarrollo (Davis, 1994)

Al final de 30 días en el sistema experimental había un total de 166 larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. e inoculadas con *Symbiodinium* sobrevivientes las cuales se usaron para inducir la metamorfosis para investigar el papel de *Symbiodinium* en la inducción de metamorfosis.

Para la única larva sobreviviente del tratamiento en donde las larvas fueron inoculadas solo una ocasión con *Symbiodinium* los cambios estructurales asociados a la metamorfosis se observaron alrededor de los 50 días después de la

eclosión. Esta larva murió a los pocos días después de llevar a cabo la metamorfosis.

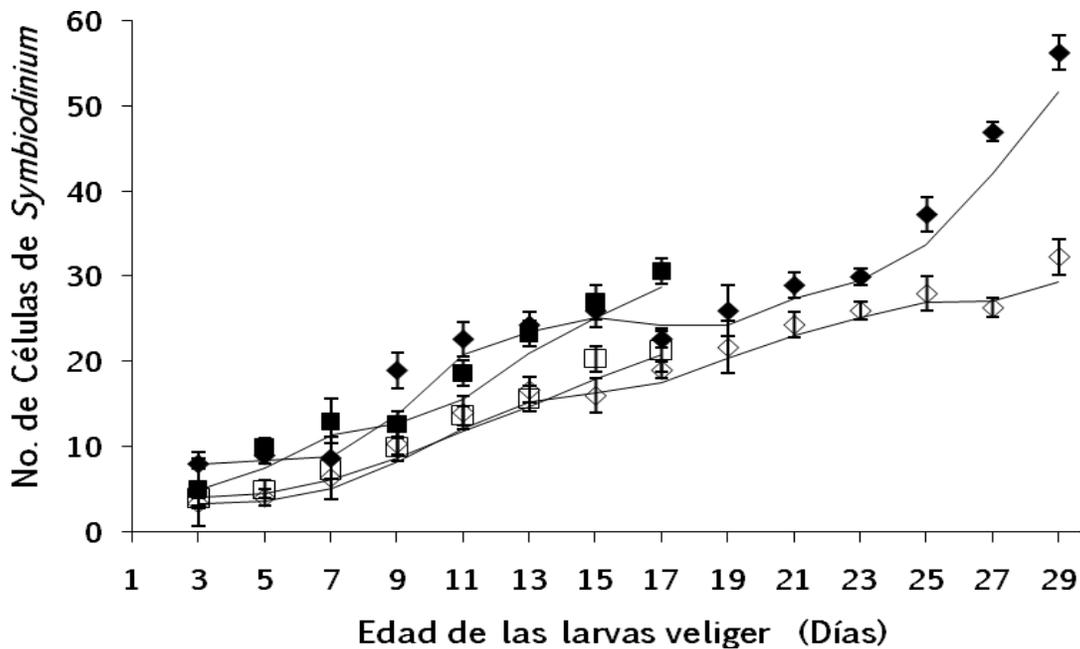


Figura 35. Número de células de *Symbiodinium* en el interior de las larvas veliger del *Lobatus gigas* inoculadas con *Symbiodinium*. Símbolos representan (■) larvas Inoculadas con *Symbiodinium* (L_s) en la glándula digestiva y (□) en el estómago, y (◆) larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. e Inoculadas con *Symbiodinium* (L_{1/s}) en la glándula digestiva y (◇) en el estómago. Se grafican los promedios con barras de desviación estándar. Las líneas representan ajustes de los datos a una función exponencial y en la gráfica se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

De las 166 larvas alimentadas con *Isochrysis* sp. e inoculadas con *Symbiodinium* sobrevivientes al ser inducidas al proceso de metamorfosis en presencia de *Laurencia poitei*, un total de 109 (65.7%) llevaron a cabo la metamorfosis con éxito.



De las 83 larvas inducidas en presencia de *L. poitei* a los 30 días, 45 (54%) llevaron a cabo la metamorfosis, mientras de las 83 larvas que se mantuvieron sin *L. poitei* ninguno mostró cambios estructurales que se asocian con la inducción de metamorfosis (Fig. 36) durante 10 días. Por esta razón a los 40 días de su eclosión se expuso este lote de larvas a *L. poitei* logrando un 77% de larvas inducidas (Fig. 36).

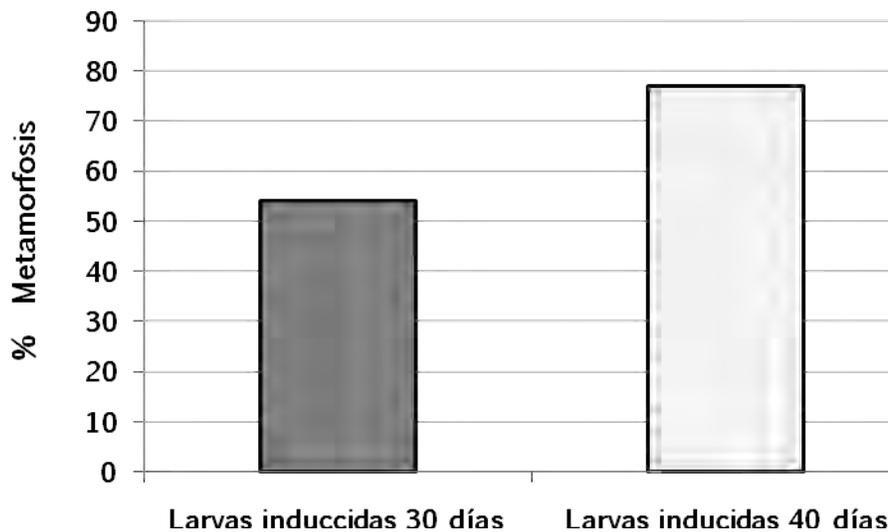


Figura 36. Dos grupos de larvas veliger de *Lobatus gigas* inducidas a la metamorfosis con *Laurencia poitei* a 30 días de edad (54% de larvas inducidas a la metamorfosis) y a 40 días de edades (77% de larvas inducidas a la metamorfosis).

La supervivencia de los caracoles después del proceso de inducción a la metamorfosis se observa en la figura 37 donde se muestra un decremento exponencial lineal.

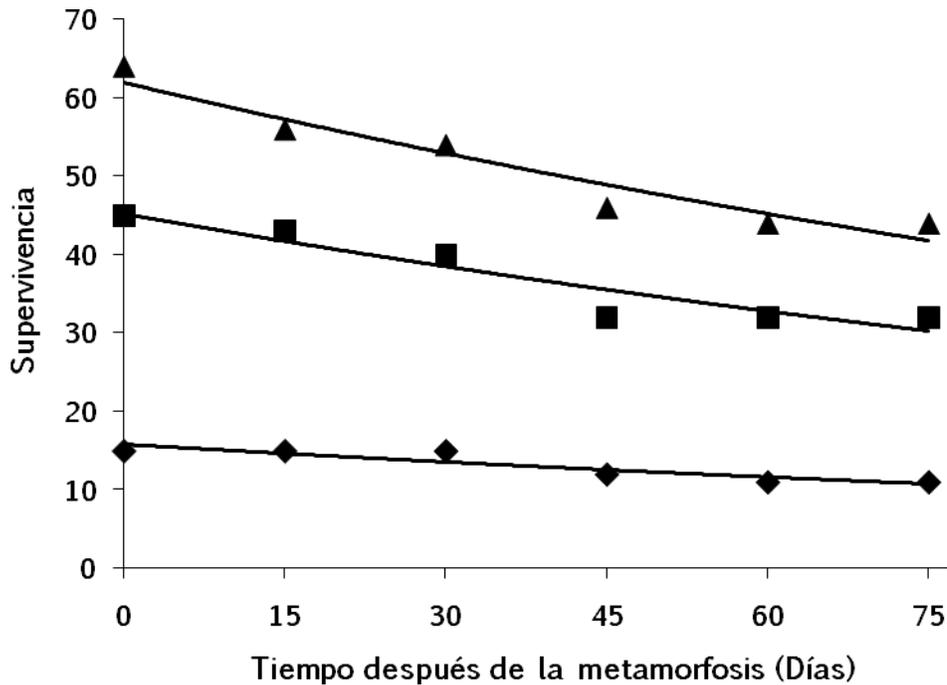


Figura 37. Supervivencia de los juveniles de *Lobatus gigas* después de la metamorfosis a diferentes tiempos: (■) Juveniles con *Symbiodinium* inducidos a los 30 días $y=61.88e^{-0.0053x}$ $R^2=0.9225$, (▲) Juveniles con *Symbiodinium* inducidos a los 40 días $y=45.151e^{-0.0054x}$ $R^2=0.869$ y (◆) Juveniles en ausencia de *Symbiodinium* inducidos a los 30 días $y=15.81e^{-0.0052x}$ $R^2=0.8452$. Se grafican los promedios con errores de desviación estándar. Las líneas representan ajustes de los datos a una función lineal y en la gráfica se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación correspondiente.

El incremento en la longitud sifonal de los tres lotes experimentales de juveniles fue exponencial. Sin embargo, los caracoles inoculados con *Symbiodinium* en la etapa larval e inducidos con el alga roja a los 30 y 40 días, presentaron mayor



incremento de la longitud sifonal con respecto a los juveniles que no fueron inoculados con *Symbiodinium* en la etapa larval (Fig. 38).

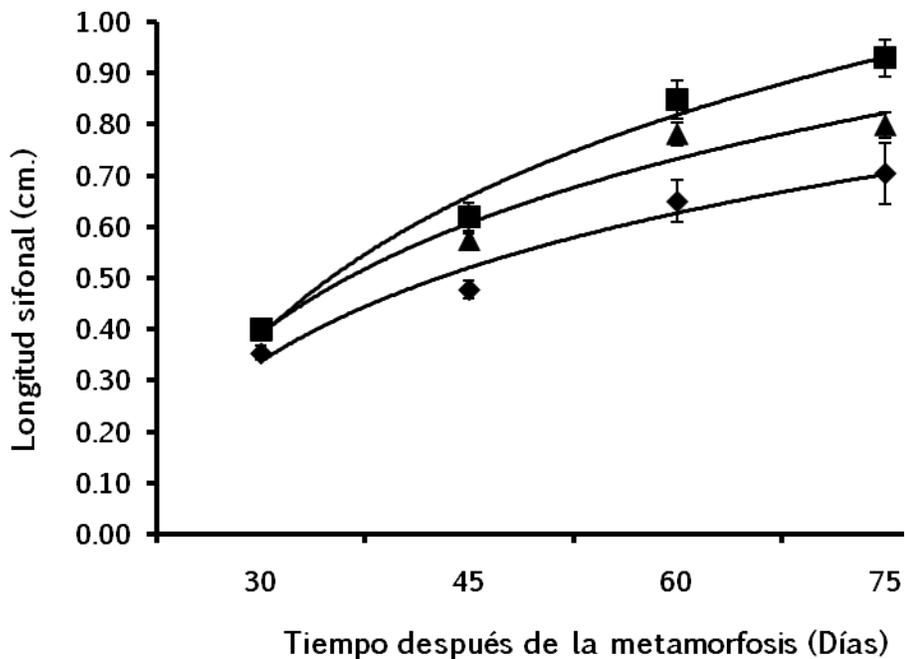


Figura 38. Crecimiento de juveniles de *Lobatus gigas* después de la inducción a la metamorfosis a diferentes tiempos: (■) Juveniles con *Symbiodinium* inducidos a los 30 días $y=0.3939\ln(x)+0.3857$ $R^2=0.9843$; (▲) Juveniles con *Symbiodinium* inducidos a los 40 días $y=0.3109\ln(x)+0.304$ $R^2=0.963$ y (◆) Juveniles en ausencia de *Symbiodinium* inducidos a los 30 días $y=0.2629\ln(x)+0.337$ $R^2=0.9665$. Se grafican los promedios con errores de desviación estándar. Las líneas representan ajustes de los datos a una función logarítmica y en la gráfica se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

En las heces de los caracoles juveniles, quienes fueron inoculados con *Symbiodinium* en etapa larval, presentaron simbiontes morfológicamente intactos

(Fig. 39 a). Las heces de caracoles juveniles quienes no fueron inoculados con *Symbiodinium* en etapa larval se observan en la figura 39 b.

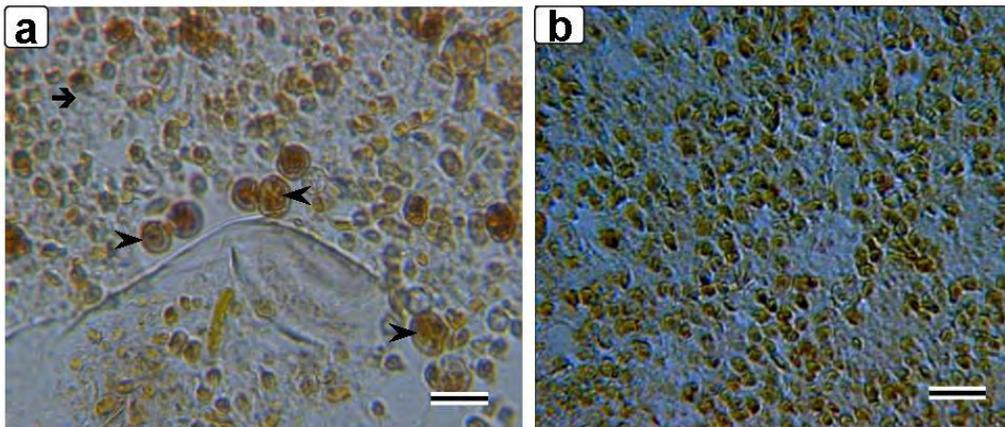


Figura 39. (a) Heces de juveniles de *Lobatus gigas* quienes fueron inoculados con *Symbiodinium* durante la etapa larval mostrando la presencia de *Symbiodinium* intactos y (b) heces fecales de juveniles de *Lobatus gigas* que en etapa larval no fueron inoculados con *Symbiodinium* mostrando la ausencia del mismo. Barras = 20 µm. (Fotos tomadas por Maribel García Ramos).

Discusión

En esta investigación se determinó que el establecimiento de una relación mutualista con *Symbiodinium* juega un papel importante en etapas posteriores a la eclosión de las larvas en el ciclo de vida de *L. gigas*, en este estudio se determinó que *Symbiodinium* no es heredado por el caracol *L. gigas* a su progenie por vía materna debido a la ausencia del dinoflagelado en la masa ovígera en donde se



lleva acabo el proceso de desarrollo embrionario (Fig. 26 a) hasta la etapa trocófora (Fig. 26 b). Tampoco se encuentra *Symbiodinium* en el delgado filamento pegajoso que rodea los embriones como protección aislándolos del medio que los rodea. No se encontró dinoflagelados en la gónada de caracoles adultos de *L. gigas* (Capítulo 1) lo que confirma que no hay herencia materna hacia la progenie y que la adquisición de simbiosis debe ser del ambiente natural.

En tres especies de los moluscos bivalvos del género *Tridacna* (*T. maxima*, *T. gigas*, *T. squamosa*) y en las especies *Hippopus hippopus* y *Corculum cardissa* no hay evidencia de presencia de *Symbiodinium* ni en el huevo ni en la larva trocófora, por lo que cada generación de bivalvos en simbiosis con *Symbiodinium* adquiere los dinoflagelados simbiosis del ambiente (Fitt y Trench, 1981; Fitt et al., 1984, 1986). Estos resultados para bivalvos y para *Lobatus gigas* contrastan con los de Berner et al. (1986b) para 9 especies de gasterópodos del Mar Rojo incluyendo a *Strombus tricornis* en donde reportaron algas simbiosis en las gónadas con pigmentos característicos de dinoflagelados. Estructuralmente la glándula digestiva, que contiene aproximadamente 95% de los *Symbiodinium* en *L. gigas*, se encuentra envuelta por la gónada (Little, 1967; Barnes, 1989), por lo que al realizar disecciones se pudo haber contaminado la gónada con el contenido de la glándula digestiva.



Fitt y Trench (1981) y Hirose et al. (2006) al no observar la presencia de *Symbiodinium* en el huevo fertilizado ni en la larva trocófora de los moluscos bivalvos *Tridacna squamosa*, *T. crocea* y *T. derasa*, expusieron larvas veliger de 48 h de eclosión al simbiote recién aislado del mismo hospedero. La adquisición del simbiote por las larvas fue por vía oral siendo visible hasta el tercer día de la inoculación, observándose en el tracto digestivo. Asimismo, Fitt et al. (1986) expusieron larvas veliger del molusco bivalvo *H. hippopus* con 24 h de eclosión a *Symbiodinium* observando la presencia de éste en el estómago de las larvas al tercer día de la inoculación.

Al ser liberadas de la masa ovígera, las larvas veliger del caracol *L. gigas* podrían ser una etapa que adquiere el simbiote del medio ambiente ya que varias clades de *Symbiodinium* en forma de vida libre han sido encontradas en las aguas circundantes en la laguna de Puerto Morelos (Manning y Gates, 2008). La mayoría de las células encontradas pertenecen a clade B lo cual refleja la clade dominante de *Symbiodinium* que forman simbiosis con invertebrados en la laguna de Puerto Morelos (LaJeunesse, 2002; Manning y Gates, 2008). Debido a que las larvas veliger recién eclosionadas son difíciles de encontrar en el mar, las etapas subsecuentes a



la eclosión fueron manejadas en sistemas experimentales para determinar si son capaces de adquirir el simbiote.

En los sistemas experimentales se encontró que en los primeros 72 h después de la eclosión, el momento óptimo para la infección de las larvas veliger de *L. gigas* con *Symbiodinium* es a las 48 h. *Symbiodinium* fue visible después de la inoculación en los tratamientos con larvas inoculadas a las 24h y en las larvas inoculadas a las 48 h de eclosión, pero no en los tratamientos de larvas inoculadas inmediatamente después de la eclosión y en las larvas inoculadas a las 72h. El hecho de que el simbiote sólo sea adquirido por las larvas veliger de *L. gigas* inoculadas a las 24 y 48 h de eclosión, indica que posiblemente existe una "ventana" o un tiempo óptimo para la adquisición de *Symbiodinium* por las larvas. Cabe notar que no se realizaron pruebas de adquisición con etapas mayores de 72 h de edad por lo que existe la posibilidad de otras ventanas de adquisición de los simbiotes.

Aunque las larvas veliger de los tratamientos L₂₄ y L₄₈ adquirieron *Symbiodinium* presentaron diferencias significativas entre las supervivencias (Fig. 27 y 28), siendo mayor en el tratamiento L₄₈. Esto puede ser el resultado de que las larvas del tratamiento L₄₈ presentan un desarrollo adecuado de sus órganos para poder



mantener el simbiote en su interior. Las larvas recién eclosionadas, estructuralmente cuentan con un corazón, células glandulares, células digestivas, tubo intestinal y una boca (Davis, 1994) y puede ser que las larvas recién eclosionadas no presentan el desarrollo adecuado para introducir o sostener el dinoflagelado en su cuerpo o bien que la "boca" no está suficientemente desarrollada. Esto no explica porque las larvas del tratamiento L₇₂ presentaron 100% mortalidad.

Las larvas de los tratamientos L₂₄ y L₄₈ presentaron un crecimiento exponencial en el número de células de *Symbiodinium* en el interior de las larvas veliger tanto en la glándula digestiva (Fig. 29 b) como en el estómago (Fig. 29 c y Fig. 30) lo cual indica que el simbiote se está reproduciendo (Fig. 29 d y e) dentro de las larvas. Fitt y Trench (1981), concluyeron que el hecho de que las larvas veliger de *Tridacna* adquieran *Symbiodinium* y éste se divida y crezca en el manto, en el estómago y en la glándula digestiva, sugiere una asociación simbiótica. Los resultados similares para la relación entre *L. gigas* y *Symbiodinium* indica que también forman una asociación simbiótica. De esta forma, las larvas tienen la ventaja de sobrevivir hasta que encuentren alimento, con respecto a los moluscos que se desarrollan en



ausencia de simbiosis, dado que las larvas veliger viven en ambientes oligotróficos (Stoner, 1997; Pérez et al., 2003).

Una vez establecido que la edad ideal de la adquisición de los simbiosis es 48 h se procedió a determinar el papel de *Symbiodinium* en las etapas subsecuentes de *L. gigas*. Se determinó que la presencia de *Symbiodinium* en las larvas veliger mejora la supervivencia en comparación a larvas que fueron únicamente alimentadas con *Isochrysis* sp. Sin embargo, la presencia de *Symbiodinium* en conjunto con alimento presentó la mejor supervivencia de los tres tratamientos.

Esto indica que la presencia de *Symbiodinium* es un factor importante porque una larva (0.003%) infectada con *Symbiodinium* sin alimento sobrevivió hasta la metamorfosis. La combinación de presencia de *Symbiodinium* y la administración de alimento mejoró significativamente la supervivencia (55%) hasta concluir la etapa veliger a los 30 días (Fig. 31 y 32). Aunque hubo crecimiento exponencial en las larvas de los tres tratamientos había diferencias significativas porque el mayor crecimiento fue en las larvas L_{1/5} en comparación con los otros dos tratamientos (Fig. 34). Por separado, ni el suministro de *Isochrysis* sp. diario ni la presencia de *Symbiodinium* cubren los requerimientos necesarios para concluir la etapa larval



veliger del caracol *L. gigas*. Aunado a la presencia o ausencia de *Symbiodinium*, la manipulación de las larvas fue un factor importante que determinó la supervivencia de las larvas ya que en esta etapa hay mortalidades hasta del 90% (Davis, 1994).

Fitt y Trench (1981) compararon la supervivencia y el crecimiento de dos lotes experimentales de larvas veliger de *Tridacna* en presencia y ausencia de *Symbiodinium* observando que las larvas inoculadas con el simbiote presentaron mayor supervivencia en comparación a las larvas no inoculadas. Fitt et al. (1986) compararon tres lotes experimentales de larvas veliger de *H. hippopus* para determinar el desarrollo, la supervivencia y el crecimiento longitudinal. Al primer lote se le administró como alimento la microalga *Isochrysis galbana*, el segundo lote fue inoculado con *Symbiodinium* proveniente de un cultivo aislado de *T. maxima* y el tercer lote fue inoculado con *Symbiodinium* aislado al momento de la inoculación de un macerado del manto de *H. hippopus*.

La supervivencia y el crecimiento en las larvas inoculadas con el simbiote del mismo hospedero, fue significativamente más alto con respecto a los dos lotes experimentales restantes. Este resultado "sugiere" que hay especificidad y reconocimiento celular del simbiote al hospedero, lo que otorga ventaja en la supervivencia y crecimiento en las larvas. Asimismo, mediciones de asimilación de



^{14}C en las algas aisladas de *Strombus tricornis* del Mar Rojo muestran que los dinoflagelados producen fotosintetatos que podrían ser utilizados por el hospedero pero no se demostró la traslocación de carbono (Berner et al., 1986a).

Davis (1994) determinó que el tiempo óptimo para inducir a las larvas veliger de *L. gigas* al proceso de metamorfosis en sistemas experimentales es a los 21 días después de la eclosión. Sin embargo, en el CRIP-Puerto Morelos se ha observado que las larvas veliger se inducen a la metamorfosis con éxito entre los 28 y 30 días después de la eclosión (Padilla-Souza y Martínez-Vázquez, com. pers.).

En esta investigación, se determinó que *Symbiodinium* no juega un papel directo en la inducción del proceso de metamorfosis. Se comparó el éxito de la inducción de la metamorfosis en larvas con el simbiote tanto en presencia de un inductor natural (*L. poitei*) como en ausencia de este inductor. Las larvas en presencia del inductor tuvieron 54.21% de éxito mientras que durante 10 días en ausencia del inductor ninguna larva realizó metamorfosis. Además, ninguna de estas larvas mostró las señales indicativas del inicio del proceso de metamorfosis como es la absorción de los velos hasta que a los 40 días se expusieron las mismas larvas al inductor logrando un 77.10% de éxito de metamorfosis (Fig. 36). En la presencia del inductor las larvas presentan modificaciones obvias como son asentamiento de las



larvas al alga y cambios en la opacidad y forma de la concha. Cualquier mortalidad durante el proceso de metamorfosis probablemente se debe a que una larva planctónica al cambiarse a una vida bentónica tiene que sufrir una transformación estructural drástica (Eckert et al., 1989; Davis, 2005). Fitt y Trench (1981) y Hirose et al., (2006), observaron que en *Tridacna squamosa*, *T. crocea* y *T. derasa*, el *Symbiodinium* en el estómago durante la etapa veliger, al momento de la metamorfosis no se observa la presencia de dinoflagelados y nuevamente aparece en el organismo después de la metamorfosis formando hileras en el borde del manto por lo que no juega un papel directo en la metamorfosis. Sin embargo este patrón de comportamiento de *Symbiodinium* no se pudo observar en *L. gigas* en el proceso metamórfico.

Una vez que se concluyó el proceso de metamorfosis, se observó una mortalidad alrededor del 30% a los 75 días en los juveniles que adquirieron *Symbiodinium* en etapa larval y fueron alimentados con la microalga *Isochrysis* sp. e inducidos a la metamorfosis a los 30 y 40 días (Fig. 37). Juveniles que no adquirieron *Symbiodinium* en la etapa veliger (proporcionados por la Dra. Claudia Padilla-Souza) tuvieron crecimiento significativamente menor que los juveniles con *Symbiodinium*. Además, los juveniles inducidos al proceso de metamorfosis a los



30 días tuvieron un crecimiento significativamente mayor que los juveniles inducidos a los 40 días a partir del día 75 (Fig. 38). Fitt y Trench (1981) observaron un mayor incremento en la longitud sifonal en los juveniles de *Tridacna* que adquirieron *Symbiodinium* en la etapa veliger, en comparación con los juveniles que no los adquirieron. Los juveniles en ausencia de *Symbiodinium* presentaron también mayor mortalidad después de la tercera semana de la metamorfosis. Fitt et al. (1986) observaron que los juveniles de *H. hippopus* inoculados en la etapa veliger con *Symbiodinium* aislados del mismo hospedero presentaron una tasa de crecimiento mayor con respecto a los juveniles que en la etapa larval no fueron inoculados con *Symbiodinium*.

Las heces de los caracoles juveniles de *L. gigas* presentaron *Symbiodinium* morfológicamente intactos lo que indica que los dinoflagelados no son fuente de alimentación para el caracol. En las almejas del género *Tridacna*, *Symbiodinium* se encuentra en el manto, en un sistema tubular que se origina en el estómago, y se ramifica hasta desembocar en el manto, considerado parte del tracto digestivo (Norton et al., 1992) por lo que estos dinoflagelados son expulsados acompañando las heces por el ano. Se ha observado que las heces de *Tridacna* contienen



Symbiodinium morfológicamente intactos, fotosintéticamente funcionales y pueden ser cultivados (Fitt y Trench, 1981; Murayama y Heslinga, 1997).

Conclusión

Los resultados de esta investigación han avanzado el conocimiento sobre la biología básica de *Lobatus gigas* mostrando que la supervivencia de las larvas es mayor si ya ha establecido una relación mutualista con *Symbiodinium*, al igual que en la supervivencia de los juveniles. *L. gigas* no cubre sus necesidades metabólicas con la actividad fotosintética del alga ya que necesita comer, pero esto no excluye que aunque el caracol coma, la presencia de *Symbiodinium* claramente mejora la supervivencia del caracol en etapas tempranas de su ciclo de vida.

CAPITULO 3

Preferencia de la larva veliger de *Lobatus gigas* por *Symbiodinium* aislado de diferentes hospederos



Introducción

Los dinoflagelados *Symbiodinium* se encuentran asociados a una gran variedad de invertebrados marinos en los arrecifes de coral (Trench 1979 y 1993). Los simbiontes en estas asociaciones son adquiridos por la progenie del hospedero mediante dos procesos: a) adquisición maternal en donde el simbionte se pasa directamente de generación en generación es decir la progenie recibe directamente una porción de la población maternal de algas (sistema de adquisición cerrado) o, b) donde la progenie adquiere los simbiontes del medio ambiente (sistema de adquisición abierto) (Trench 1979, 1987, Davy y Tuner, 2003). Cuando la adquisición del simbionte es del ambiente, es probable que suceda por quimiotaxis positiva del simbionte hacia un huésped adecuado, o por adquisición indirecta cuando en hospedero ingiere zooplancton, presas o material fecal que contiene simbiontes (Muller- Parker y D'Elías, 1997). El hecho de que el hospedero adquiriera al simbionte del ambiente le da la oportunidad de obtener una variedad de estos. La adquisición del simbionte generalmente ocurre en alguna etapa larval del hospedero. Las larvas adquieren los simbiontes, posteriormente hay un reconocimiento y una selectividad antes de la fagocitosis, el hospedero retiene los



simbiontes que le aportan algún beneficio y los demás son desplazados o digeridos (Rowan y Knowlton 1995). Este grado de selectividad, mantiene una especificidad en la asociación, lo que le permite al hospedero seleccionar al simbiote adecuado que da como resultado una asociación estable. La especificidad es definida como un proceso selectivo por el cual una entidad interactúa específicamente con otra (Trench, 1987). Esta se lleva a cabo por moléculas específicas en la superficie del alga llamado ligandos que están asociados con la pared celular y que interactúan con receptores en el plasmalema de células animales. Esta selectividad está basada en el reconocimiento por el hospedero de especies de microalgas específicas que muestran una señal molecular apropiada (Trench, 1993). La adquisición del simbiote por una variedad de hospederos se ha estudiado en Cnidarios como *C. xamachana* (Trench y Fitt, 1981), en moluscos como *T. gigas*, *Hippopus hippopus* (Baillie et al., 1999) *T. derasa*, *T. squamosa*, *T. maxima*, *T. crocea*, y *H. porcellanus* (Baillie et al., 1998), en corales gorgonáceos como *Plexaura kuna* y *Pseudoplexaura porosa* (Coffroth., 2001), en coral blando *Heteroxenia fuscescens* (Yacobovitch, et al., 2003), y en plánulas de los corales escleractíneos *Fungia scutaria* (Rodríguez et al., 2006), *Acropora nobilis* y *A. microphthalmia* (Hirose et al., 2008), *Acropora digitifera*, *A. Florida*, *A. intermedia*, *A. tenuis*, *Isopora palifera*, *Favia pallida*, *F. lizardensis*,



Pseudosiderastrea tayamai y *Ctenactis echinata* (Harii et al., 2009). En los hospederos mencionados anteriormente se determinó que la adquisición de simbiontes de la misma especie (homólogos) les confiere mayor supervivencia y mayor crecimiento en comparación con los hospederos que adquieren simbiontes de otras especies (heterólogos). En algunas ocasiones el hospedero no sólo se ve beneficiado incrementando su supervivencia o crecimiento como ocurre en *C. xamachana* donde *Symbiodinium* ayuda a concluir ciclos de vida (Trench y Fitt, 1981). En los corales escleractíneos blanqueados las algas *Symbiodinium* estimulan la calcificación en un ambiente oxigenado y en presencia de glicerol producidos mediante la fotosíntesis (Colombo et al., 2010). Los nudibranchios *Melibe pilosa*, *Melibe* sp., *Pteraeolidea ianthina* y *Berghia major* llevan acabo la adquisición de *Symbiodinium* del medio por las larvas cada generación y se ha comprobado la traslocación de nutrientes producidos por *Symbiodinium* al hospedero (Kempf, 1984).

Recientemente LaJeunesse (2001) mediante técnica molecular, usando ITS (Espaciadores Internos de Transcripción) determinó la diversidad de *Symbiodinium*, en donde no sólo diferenció clades (A, B, y C), sino también diferentes tipos 1, 2, 3, 4 7 5... etc. y subtipos a, b, c, d... etc. (LaJeunesse, 2002). Hasta la fecha se han



reconocido 9 clades distintas de *Symbiodinium* (A, B, C, D, E, F, G, H e I) (Santos y Coffroth, 2003, 2006, 2013). Estas clades se han encontrado en una gran variedad de hospederos como son Cnidaria (corales, octocorales y anémonas) Moluscos (Tridacnas), Poríferas (esponjas) y Protozoa (foraminíferos LaJeunesse 2005; Stat et al., 2006; 2013).

Lajeunesse (2002) determinó la presencia de *Symbiodinium* en una variedad de invertebrados representados principalmente por el Phylum Cnidaria (Scleractinia, Actinaria, Gorgonacea, Zoanthidae, Corallimorpharia, Rhizostomae, Milleporina) y un molusco gasterópodo *L. gigas*, en 69 especies recolectadas de la laguna arrecifal de Puerto Morelos se determinó la presencia de diferentes tipos de *Symbiodinium* (B1, C1, A3, A4a, A4... etc.) de los cuales 33 presentaban el tipo B1. Según estos resultados Lajeunesse (2002) determinó que el simbionte tipo B1 es dominante en el arrecife ya que fue asociado con una alta diversidad de hospederos. La presencia de este linaje en un amplio número de invertebrados podría explicar su flexibilidad para adaptarse a cambios de temperaturas y tolerar una variedad de ambientes como luz variable y escasos nutrientes. Debido a que las larvas veliger de *L. gigas* son planctónicas y eclosionan sin simbiontes es posible que su adquisición ocurra en los primeros días de vida libre en la columna de agua y el hecho de que



diferentes linajes de *Symbiodinium* ocurran en la laguna de Puerto Morelos abre la posibilidad que una larva pueda adquirir clades de orígenes distintos. El objetivo de esta investigación, fue determinar si las larvas veliger de *L. gigas* establecen simbiosis con diferentes tipos de *Symbiodinium* aislados de diferentes hospederos, bajo condiciones controladas y determinar si cambios en el filotipo o clade con el que se establece la relación simbiótica resultante en diferencias en las ventajas que adquiere *Lobatus gigas*.

Hipótesis General de Investigación

Symbiodinium aislados de hospederos que no son *Lobatus gigas* no confieren beneficios a larvas o juveniles de *L. gigas*.

Objetivo General

Determinar si existe algún beneficio para *L. gigas* por inoculación con *Symbiodinium* aislados de diferentes hospederos bajo condiciones controladas.

Objetivos particulares

Determinar si las larvas veliger de *L. gigas* pueden adquirir simbiontes aislados de diferentes hospederos.



Determinar si la larva veliger de *L. gigas* obtiene algún beneficio al adquirir simbiontes aislados de otros hospederos.

Determinar si los juveniles de *L. gigas* obtiene algún beneficio al adquirir simbiontes aislados de otros hospederos.

Materiales y Métodos

La masa de huevo de *Lobatus gigas*, fue recolectada por el personal del CRIP- Puerto Morelos (Centro Regional de Investigaciones Pesqueras) en el campamento pesquero María Elena (19° 18' N, 87° 27' O) ubicado en el municipio de Felipe Carrillo Puerto, frente a Punta Herrero en Quintana roo, mediante técnicas de buceo durante la época de desove. La profundidad en la que se recolectó la masa de huevo fue de 5 m.

Los dinoflagelados utilizados en este experimento fueron identificados por LaJeunesse (2002) de la laguna arrecifal de Puerto Morelos. Se utilizó el dinoflagelados tipo B1 aislados de *Pterogorgia anceps* (gorgonáceo) ya que este tipo se identificó también en *L. gigas*. El dinoflagelado C1 aislado de *Bartholomea annulata* (anémona) se identificó en otros invertebrados en conjunto con el

dinoflagelado B1 por lo que es probable que sea adquirido por el *L. gigas* y finalmente se utilizaron dinoflagelados aislados de *Millepora alcicornis* (hidrozoario) (A) para determinar si *L. gigas* es capaz de adquirirlos (LaJeunesse, 2002).

Aislamiento de *Symbiodinium*. Para la inoculación de larvas de *L. gigas* con *Symbiodinium* se recolectaron ejemplares de las especies *Bartholomea annulata* (anémona), *Millepora alcicornis* (hidrozoario), *Pterogorgia anceps* (gorgonáceo) y *Lobatus gigas* (molusco) en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (20°50'50" N, 86°52'30" W) a una profundidad de 3 m.

Se aislaron *Symbiodinium* de los tentáculos de *B. annulata* (C1) y de la glándula digestiva de *L. gigas* (C4) (ver capítulo 2). Las ramas de *M. alcicornis* (A) y de *P. anceps* (B1) se rasparon con una navaja con el fin de separar el tejido del animal con simbiontes del esqueleto. Los tentáculos de la anémona, la glándula digestiva del caracol y los tejidos obtenidos del hidrozoario y del gorgonáceo fueron cortados finamente con una navaja y suspendidos en agua de mar filtrada con filtros GF/F (Whatman, Inglaterra). Posteriormente, las muestras fueron licuadas con una homogeneizadora (Tissue Tearor™ Biospec Products, Inc. EUA) hasta que



presentaron un aspecto homogéneo y fueron centrifugadas a 100 g durante 3 min (Sorvall*Heraeus Primo R, Alemania). Las pastillas fueron lavadas con agua de mar filtrada y se homogeneizaron con un molinillo de vidrio. El proceso de lavado se repitió 4 veces. Con el procedimiento mencionado, se rompió el tejido de los hospederos y los *Symbiodinium* quedaron libres. La presencia de dinoflagelados libres de tejido del hospedero fue corroborada con observaciones bajo el microscopio compuesto (Olympus CH20, Japón). El conteo de los dinoflagelados se realizó en un hemocitómetro.

Inoculación de larvas veliger. Se utilizaron 1200 larvas veliger de *L. gigas* de 48 h después de la eclosión distribuidas en 4 tratamientos, cada uno replicado 3 veces. Además, se contaba con un sistema anexo formado por una réplica para cada tratamiento de donde se sacaban muestras cada dos días para seguir el incremento en el número de las células de *Symbiodinium*. Las condiciones experimentales fueron las mismas con la finalidad de no intervenir con los resultados de supervivencia de las larvas en el experimento principal. Se inocularon 1×10^6 células de *Symbiodinium* provenientes de diferentes hospederos: *B. annulata* (C1), *M. alcornis* (A), *P. anceps* (B1) y *L. gigas* (C4) por cada 100 larvas veliger.



Sistemas experimentales. En este experimento se utilizó el mismo sistema de circulación cerrado que se describió en el capítulo 2 (Fig. 25). Los organismos fueron expuestos a una intensidad de luz de $36 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 8:16 hrs. (luz-oscuridad) por medio de una lámpara fluorescente (Sera Deep Sea, Mod: Sera Blue Sky Royal, Alemania) encendida y apagada por un temporizador (timer) durante todo el tiempo de experimentación. La irradiancia fue medida con un sensor plano corregido por coseno conectado a un fluorómetro sumergible (Diving PAM, Walz, Alemania). Los cambios de agua del sistema se realizaron cada 4 días (Fitt y Trench, 1981) y se monitoreó la temperatura a lo largo del experimento. Las larvas veliger de cada tratamiento fueron alimentadas con 2000 a 3000 células de *Isochrysis* sp. cada 24 h (Fitt y Trench, 1981; Aldana et al., 1994). Las algas fueron cultivadas según la técnica de Guillard (1975). Se trató que el suministro de alimento fuera todos los días aproximadamente a las 10:00 am.

Monitoreo de larvas veliger. A diario se cuantificó el número de larvas veliger supervivientes todos los días durante el experimento. Asimismo, se tomaron cinco larvas al azar de cada sistema para observarlas y fotografiarlas en un microscopio PCScope digital (Kosmos Scientific, Japón). A partir de las fotografías, se llevó un registro de las larvas y se midió la longitud sifonal de la concha (longitud total),



desde el ápice de la concha hasta el borde exterior del canal sifonal (Randall, 1964 a o b; Creswell, 1984, en García y Aldana, 1999). Esta operación fue realizada cada dos días y las larvas fueron regresadas al acuario después de cada observación.

Con el objeto de determinar la adquisición del dinoflagelado *Symbiodinium* aislado de diferentes hospederos por la larva veliger, se tomaron muestras de tres larvas cada dos días, de un sistema anexo al experimento con las mismas condiciones experimentales, con la finalidad de no intervenir con los resultados obtenidos de supervivencia del experimento principal. Las muestras fueron fijadas en formol al 4% en agua de mar filtrada, para su conteo posterior en el microscopio compuesto (Olympus CH20, Japón).

Una vez fijadas las larvas, se descalcificaron las conchas con una solución de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1.88 μM), tartrato de potasio y sodio (0.034 μM), tartrato de sodio (0.608 μM) y ácido clorhídrico (1.19 N). Posteriormente se realizó la disección de las larvas para determinar la localización de dinoflagelados en las mismas separando la masa visceral. De la masa visceral se extrajo la glándula digestiva, el intestino, el estómago, los ocelos (ojos), el manto, los velos y la



branquia. Una vez localizados los dinoflagelados en las larvas veliger se llevó a cabo el conteo de los simbioses.

Inducción de metamorfosis. A las larvas veliger de 30 días de edad que sobrevivieron el experimento de inoculación con diferentes clades de *Symbiodinium* se indujo la metamorfosis con la macroalga roja *Laurencia poitei* utilizando la misma técnica y el mismo sistema de circulación cerrada que en capítulo 2. Posteriormente, las larvas fueron observadas en un microscopio PCScope digital (Kosmos Scientific, Japón) para determinar si llevaron a cabo el proceso de metamorfosis. Se registró la supervivencia cada tres días durante los primeros 15 días y posteriormente cada 15 días.

Monitoreo de juveniles. Se monitoreó el crecimiento medido como el incremento de la longitud sifonal en caracoles juveniles sobrevivientes al proceso de metamorfosis con un Vernier (Scienceware, EUA). La medición de la longitud sifonal se realizó cada 4 días durante los primeros 16 días después del proceso de metamorfosis y a partir del día 16 el incremento fue registrado cada 15 días. Sin embargo, en el lote experimental de juveniles inoculado con *Symbiodinium* aislado de *P. anceps* (B1), sólo se registró una medición después de los 16 días de la



metamorfosis, debido a la muerte de las larvas por la presencia de cianobacterias. Las cianobacterias crecieron debido a fallas en el sistema de filtración de agua del acuario del CRIP-Puerto Morelos, por lo que el agua tuvo que ser filtrada mediante una bomba de vacío (GF/F, Whatman Inglaterra) en el laboratorio de fotobiología de la Unidad Académica Sistemas Arrecifales de Puerto Morelos y ser llevada en contenedores al acuario.

Metodología estadística

Se utilizó el programa de The statistical discovery software JMP 5.1 para los análisis estadísticos. Las pruebas estadísticas utilizadas fueron Log-rank, Wilcoxon, ajuste de datos a función sigmoidea, lineal y coeficientes de determinación.

Log-rank.

(Prueba de rango logarítmico): Comparación de curvas de Supervivencia

La prueba no paramétrica log-rank compara dos o más curvas de supervivencia, el método calcula para cada tiempo el número de eventos terminales que se esperarían asumiendo que no hay diferencias entre ambas curvas de supervivencia).



Se obtiene un valor final que puede compararse mediante una distribución de χ^2 (ji-cuadrada): considerada como una prueba no paramétrica que mide la discrepancia entre una distribución observada y otra teórica (bondad de ajuste), indicando si hay o no diferencias estadísticamente significativas entre ambas curvas, de haberlas, se debe al azar (Rebasa, 2005; Arribalzaga, 2007).

Wilcoxon.

(Prueba de la suma de rangos)

La prueba no paramétrica wilcoxon (suma de rangos) compara dos o más curvas de supervivencia, útil para detectar diferencias tempranas en las probabilidades de supervivencia.

Resultados

En las larvas veliger de *L. gigas* inoculadas con *Symbiodinium* aislado de *P. anceps* (B1) y *L. gigas* (C4) se observaron simbioses en el estómago en el tercer día después de la inoculación. Al quinto día los simbioses se localizaron en la glándula digestiva en ambos lotes experimentales sin observar células del simbiote en división (Fig. 40 b y c).



Las larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* aislado de *B. annulata* (C1) presentaron el dinoflagelado en el estómago a partir del segundo día (24 h) después de la inoculación. Estos dinoflagelados no fueron observados después de 96 horas de la inoculación en las larvas.

En las larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* aislado de *M. alcicornis* (A) no se observó la presencia de los dinoflagelados después de la inoculación ni en el estómago ni en la glándula digestiva. Un factor importante en la supervivencia de las larvas es la temperatura del medio, por lo que esta variable fue monitoreada a lo largo de todo el experimento.

Las larvas veliger inoculadas con *B. annulata* (C1) y *M. alcicornis* (A) presentaron mortalidades de 100% para el día 6 del experimento. Los lotes de larvas veliger inoculadas con *P. anceps* (B1) y *L. gigas* (C4) presentaron mortalidades del 96% y 93% respectivamente al final de la fase experimental (30 días) debido a problemas en el control de la temperatura (Fig. 41a).

En el día 6 del experimento, la temperatura descendió de 28 a 23°C (Fig. 41 b), debido a fallas en el sistema de enfriamiento en el acuarios del CRIP-Puerto

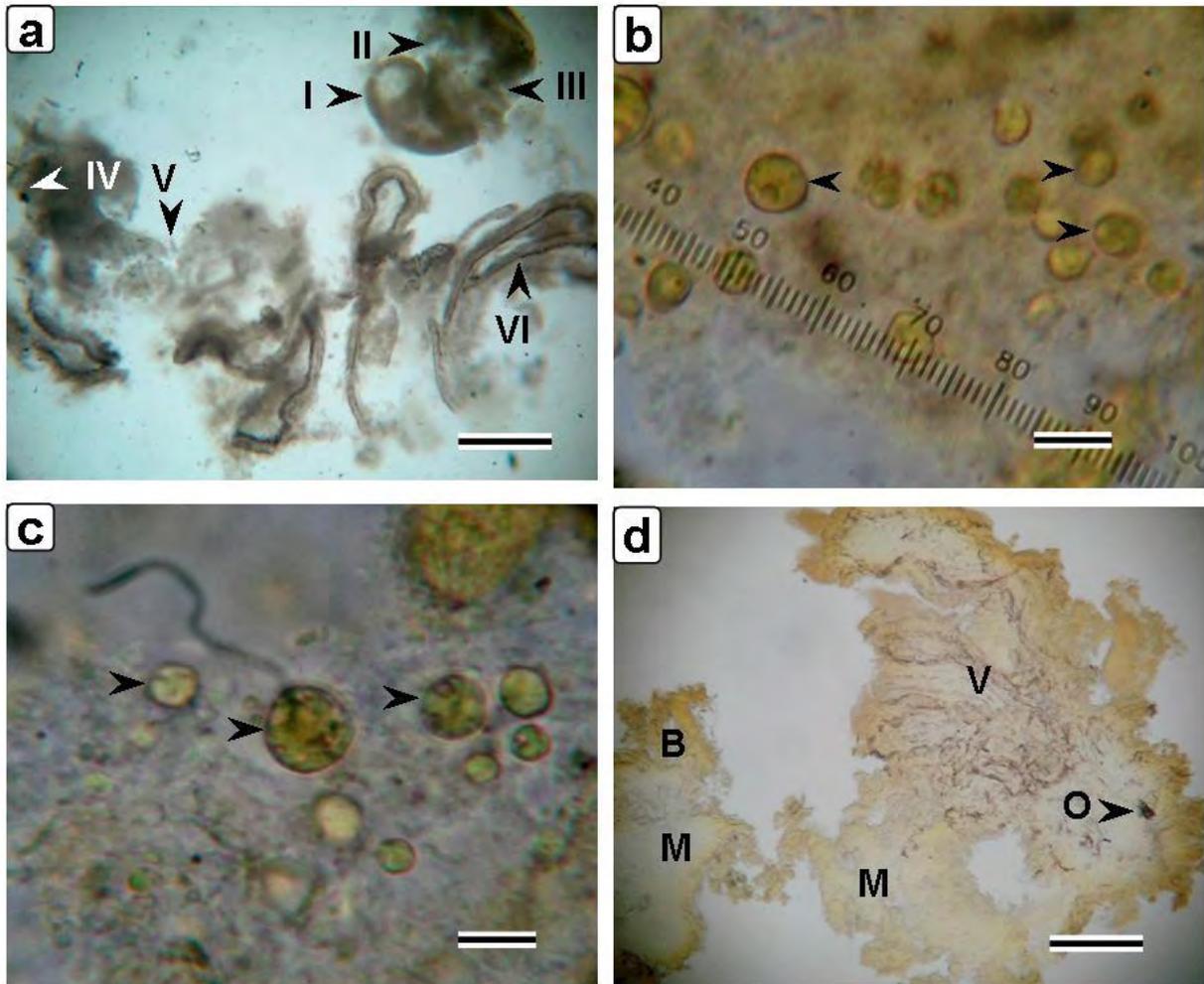


Figura 40. (a) Disección de larva veliger de *Lobatus gigas* inoculada a las 48 h después de la eclosión con *Symbiodinium* aislado de *Lobatus gigas*, larva con 27 días de edad. (I) Glándula digestiva, (II) intestino, (III) estómago, (IV) ocelos, (V) manto y (VI) velos. Barra = 100 µm. (b) *Symbiodinium* presente en la glándula digestiva y (c) en el estómago. Barras = 10 µm. (d) Ausencia de *Symbiodinium* en (V) velo, (B) branquia, (M) manto y (O) ocelo. Barra = 100 µm. (García Ramos Maribel).

Morelos. El decremento en la temperatura dió como resultado una brusca disminución en la supervivencia en las larvas.

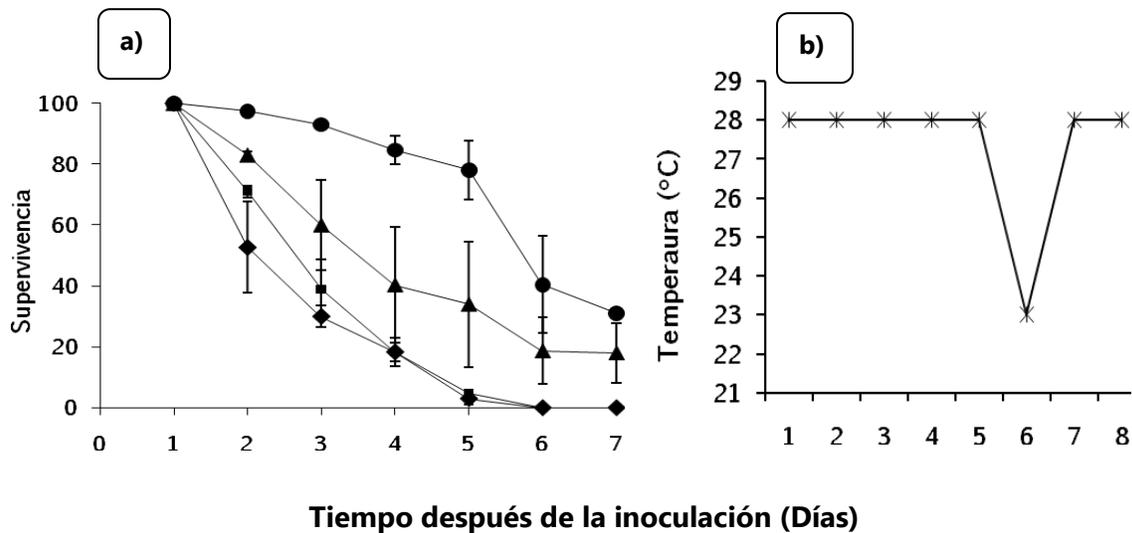


Figura 41. a) Supervivencia de larvas veliger de *Lobatus gigas* inoculadas con *Symbiodinium* aislados de diferentes hospederos: (◆) *Bartholomea annulata* (C1), (■) *Millepora alcicornis* (A), (▲) *Pterogorgia anceps* (B1) y (●) *Lobatus gigas* (C4). Los valores graficados son los promedios con sus respectivas barras de desviación estándar. b) Registro de temperatura durante el tiempo en experimentación.

Por lo anterior, para el análisis de los resultados, sólo se tomó en cuenta la supervivencia hasta el día 5, tiempo en el cual la temperatura se mantuvo constante a 28° C.

La prueba de log-rank y wilcoxon mostraron que en las curvas de supervivencias de la figura 42, existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$) entre los



diferentes tratamientos (larvas veliger inoculadas con simbiontes de *Bartholomea annulata* (clade C1); *Millepora alcicornis* (clade A4a y A3); *Pterogorgia anceps* (clade B1) y *Lobatus gigas* (clade B1 y C4).

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se determinaron al realizar comparaciones entre ellos, por medio del estadístico de Log-rank y Wilcoxon. Al comparar el grupo experimental de larvas veliger inoculadas con simbiontes de *B. annulata* y larvas veliger inoculadas con simbiontes de *M. alcicornis*, se determinó diferencias significativas al inicio del experimento según la prueba de Wilcoxon ($p < 0.0003$), y al final según la prueba de Log-rank ($p < 0.0155$).

Las larvas veliger inoculadas con simbiontes de *M. alcicornis* y las larvas veliger inoculadas con el simbionte de *P. anceps*, por medio de la prueba de Wilcoxon se determinaron diferencias estadísticas al inicio del experimento ($p < 0.0006$) y al final de este mediante las pruebas estadísticas de Log-rank ($p < 0.0001$).

Igualmente ocurrió al comparar grupos experimentales. Larvas veliger inoculadas con simbiontes de *B. annulata* y larvas veliger inoculadas con el simbionte de *P. anceps*, larvas veliger inoculadas con simbiontes de *B. annulata* y larvas veliger



inoculadas con simbionte de *L. gigas*; larvas veliger inoculadas con simbiontes de *M. alcicornis* y larvas veliger inoculadas con el simbionte de *L. gigas*; y larvas veliger inoculadas con simbiontes de *P. anceps* y larvas veliger inoculadas con el simbionte de *L. gigas* según la prueba de Wilcoxon y Log-rank existen diferencias estadísticamente significativas al inicio y al final de los experimentos ($p < 0.0001$) (Fig. 42).

El número de células de *Symbiodinium* en el interior de las larvas veliger inoculadas con simbiontes del gorgonacéo *P. anceps* y del caracol *L. gigas* presentaron un crecimiento lineal durante el tiempo de experimentación, siendo similar este incremento en ambos lotes (Fig. 43).

El crecimiento, medido como incremento en la longitud sifonal se observa en la Figura 44. Para las larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* aislados de la anémona *B. annulata* (C1) se obtuvieron pocos datos por lo que no fue posible obtener información estadística.

El crecimiento de larvas inoculados con *Symbiodinium* aislado de *P. anceps* y de *L. gigas* presentó un incremento hasta el día 21 y 23 respectivamente, posterior a

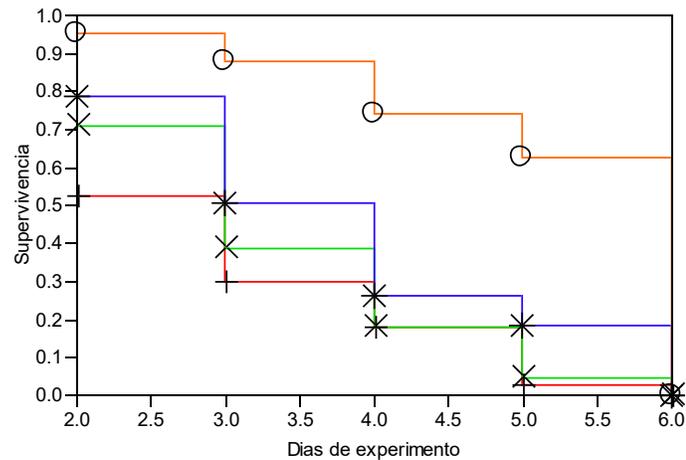


Figura 42. Variación de la supervivencia de larvas veliger de *Lobatus gigas* inoculadas con dinoflagelados aislados de diferentes hospederos: *Bartholomea annulata* (clade C1) (+); *Millepora alcicornis* (clade A4a y A3) (×); *Pterogorgia anceps* (clade B1) (*) y *Lobatus gigas* (clade B1 y C4) (o).

esos días el crecimiento se mantiene constante, aunque las larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* de *L. gigas* alcanzaron primero una mayor longitud sifonal (Fig. 44).

Al final del desarrollo larvario, sobrevivieron 12 larvas veliger inoculadas con el simbionte aislado de *P. anceps* (B1) y 21 larvas inoculadas con el simbionte aislado de *L. gigas* (clade C4). El 75% de las larvas sobrevivientes inoculadas con el *Symbiodinium* B1 llevaron a cabo la metamorfosis únicamente en presencia del dinoflagelado, mientras que el 25% restante murió.

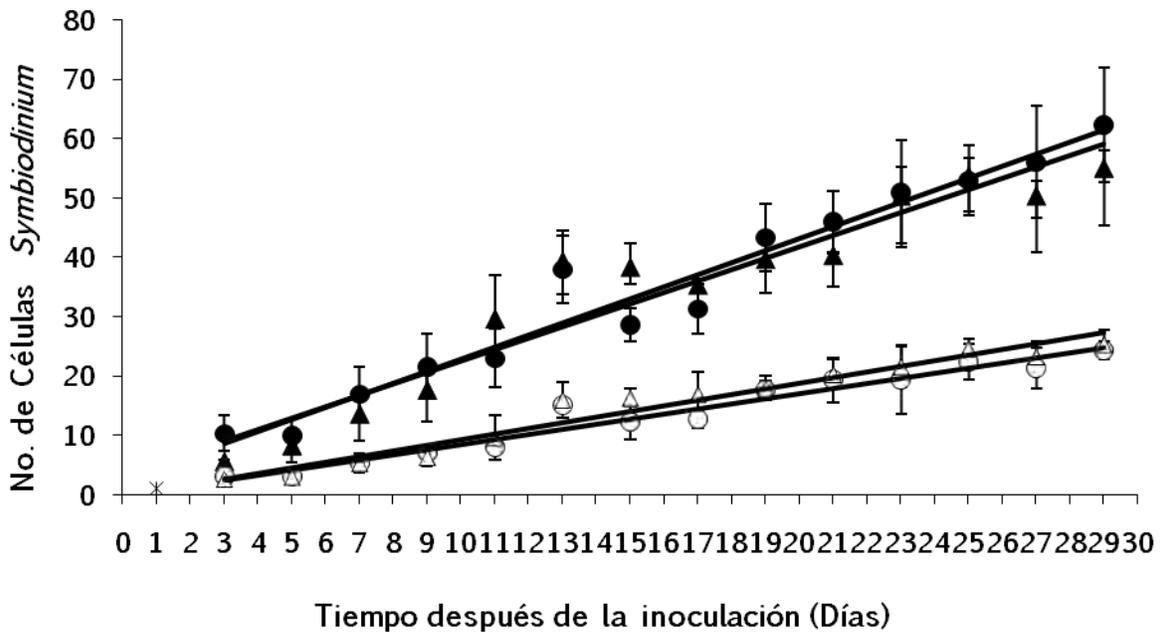


Figura 43. Número de células de *Symbiodinium* en el interior de las larvas veliger de *Lobatus gigas* inoculadas con *Symbiodinium* aislados de diferentes hospederos. Graficados son los promedios con barras de desviación estándar. Los símbolos representan larvas inoculadas con el simbiote de *Pterogorgia anceps* (B1) con la presencia de *Symbiodinium* en la glándula digestiva (▲) $y=1.9158x+3.4432$ $R_2=0.9168$ y (△) en el estómago $y=0.9447x-0.1388$ $R_2=0.9538$; y larvas inoculadas con el simbiote de *Lobatus gigas* (C4) con la presencia de *Symbiodinium* en la glándula digestiva (●) $y=2.0275x+2.6795$ $R_2=0.9591$ y (○) en el estómago $y=0.8608x-0.1538$ $R_2=0.9551$. Las líneas representan el ajuste de los datos a una función lineal y en la grafica se presenta la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

Las larvas veliger inoculadas con el *Symbiodinium* C4, sólo llevaron a cabo el proceso de metamorfosis cuando se les indujo con el alga roja *L. poitei*. Como resultado de este proceso, el 72% de las larvas experimentaron metamorfosis, el 14% murieron y el 14% restante permanecieron en estado larval. La tendencia de

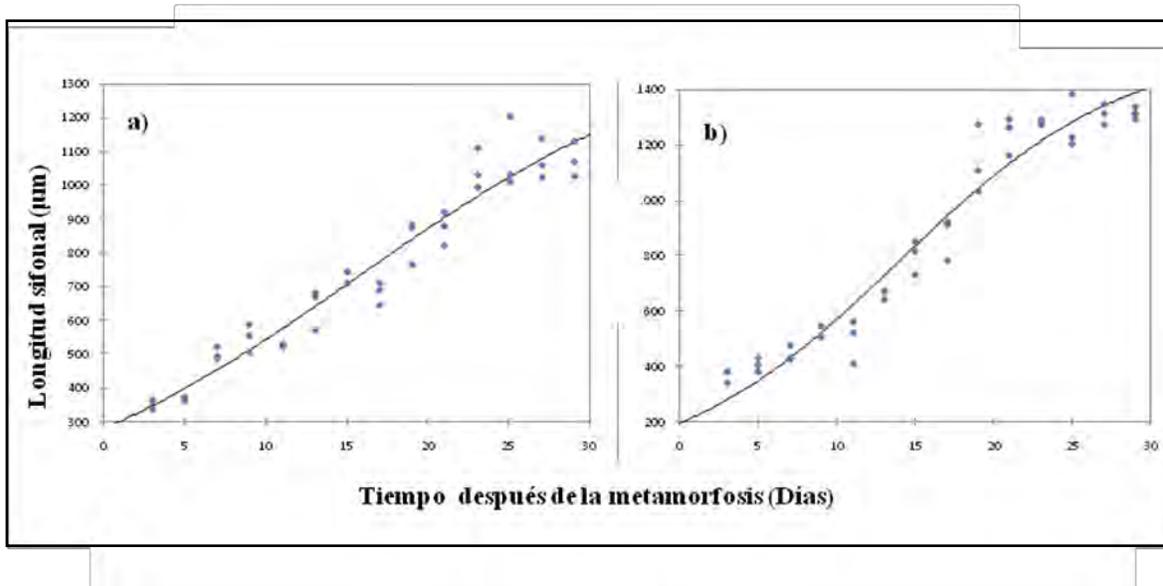


Figura 44. Crecimiento de las larvas veliger de *Lobatus gigas* inoculadas con *Symbiodinium* aislado de diferentes hospederos: **a)** *Pterogorgia anceps* (B1) $r = 0.942$ y **b)** *Lobatus gigas* (C4) $r = 0.947$. Graficados son los promedios con barras de desviación estándar. Las líneas representan el ajuste de los datos a una función sigmoidea.

la supervivencia de juveniles después de la metamorfosis se observa en la figura 45.

Después de una mortalidad inicial en los primeros 3 días, la mortalidad disminuyó.

La supervivencia de los juveniles provenientes de larvas inoculados con el *Symbiodinium* B1 fue de 89%, mientras que aquellos con *Symbiodinium* C4 presentaron una supervivencia de 93% a los 15 días posteriores a la metamorfosis.

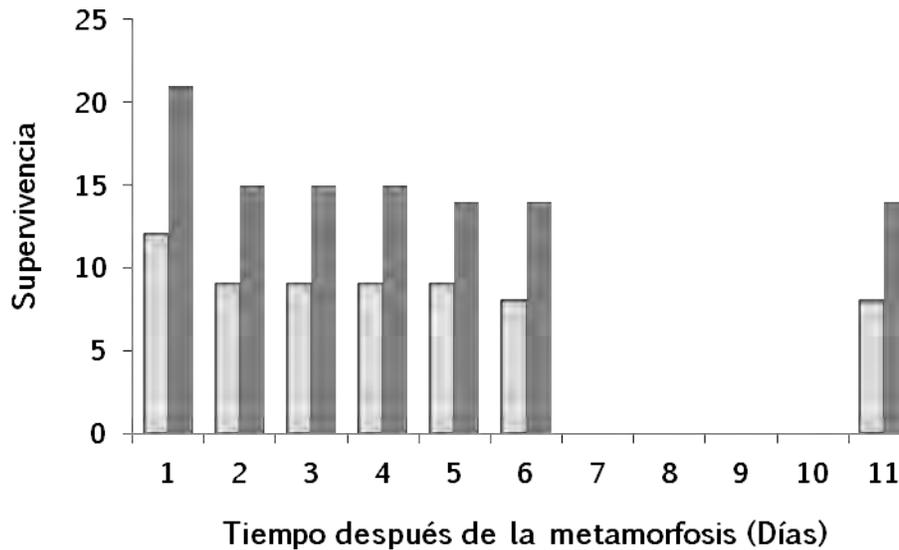


Figura 45. Supervivencia de juveniles de *Lobatus gigas* después de la inducción a la metamorfosis para caracoles inoculados en etapa larval con *Symbiodinium* aislado del hospedero (■) *Pterogorgia anceps* (B1) y (■) *Lobatus gigas* (C4).

Durante los primeros 16 días no hubo crecimiento de los juveniles independientemente del tipo de *Symbiodinium* adquirido en la etapa larval. Sin embargo, a los 30 días los juveniles inoculados con *Symbiodinium* aislado de *P. anceps* en estado larval presentaron mayor incremento en la longitud sifonal con respecto a los caracoles inoculados con el *Symbiodinium* aislado de *L. gigas* (Fig. 46). En las heces fecales de los caracoles inoculados en etapa larval con *Symbiodinium* aislado del gorgonáceo *P. anceps* (B1) y de *L. gigas* (C4), se observó que ambos grupos presentaron *Symbiodinium* morfológicamente intacto sin observar células en proceso de división (Fig. 47).

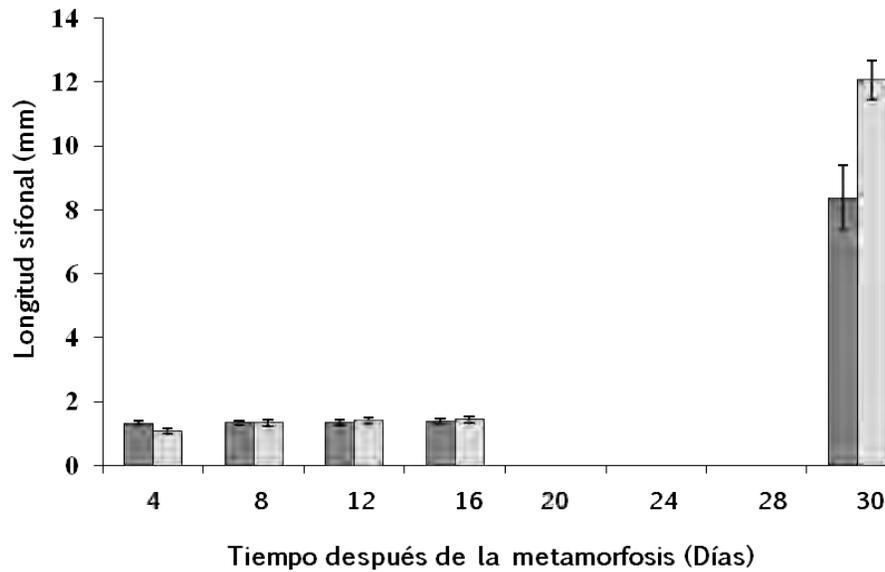


Figura 46. Aumento del crecimiento en juveniles de *Lobatus gigas* después de la metamorfosis inoculados con *Symbiodinium* aislado del hospedero (■) *Pterogorgia anceps* (clade B1) y del (■) *Lobatus gigas* (clade C4). Graficados son los promedios con barras de desviación estándar.

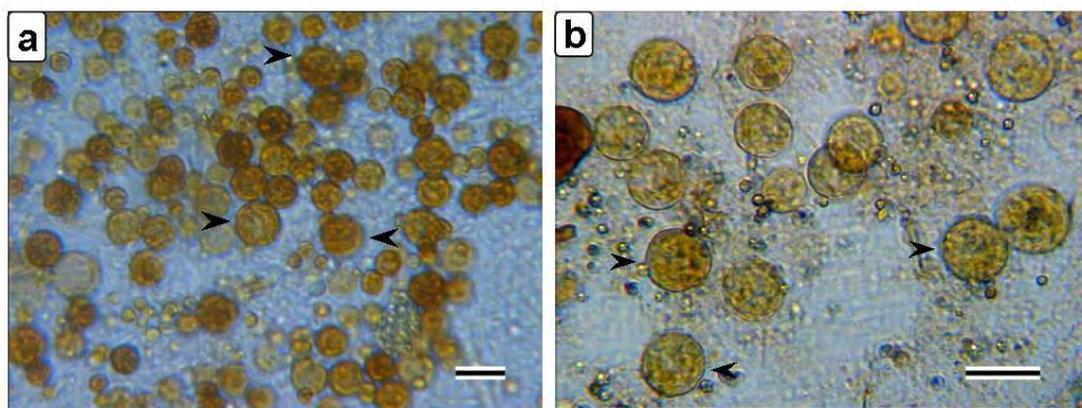


Figura 47. Heces fecales de juveniles de *Lobatus gigas* inoculados con *Symbiodinium* aislados de *Pterogorgia anceps* b) y de *Lobatus gigas*. Barras = 20 μ m (a) y 10 μ m (b). (García Ramos Maribel).



Discusión

Los simbioses que son adquiridos por invertebrados marinos en cada generación del medio ambiente requieren de un proceso de varias etapas de reconocimiento y selección (Trench, 1979, 1987) lo cual se evidencia en la selección de simbioses por la larva veliger de *L. gigas*. En este estudio se ha demostrado que las larvas veliger fueron selectivas al adquirir *Symbiodinium* debido a que nunca se encontraron los simbioses de *M. alcicornis* (A) en el estómago ni en ninguna otra estructura de *L. gigas*. Sin embargo, los simbioses de tipo B y C se encontraron en el estómago de las larvas al día siguiente de la inoculación. Para la formación de la asociación simbiótica después de la adquisición inicial del simbiote, es la de su establecimiento e integración de forma estable dentro de las larvas de *L. gigas*. A las 24 h después de la inoculación con simbioses aislados de *B. annulata* (C1) se encontraron los dinoflagelados en el estómago de la larva, sin embargo, a las 96 h ya no se observaron los dinoflagelados ni en el estómago ni en ninguna otra estructura de *L. gigas*. Es claro que es mucho mas fuerte el establecimiento de la simbiosis, ya que se observó mayor especificidad.



La ausencia de los dinoflagelados puede ser explicada por la falta de reconocimiento y el rechazo y expulsión de las algas del tejido de la larva a través de sus heces fecales. Otra posibilidad que no hay que descartar es la digestión de los dinoflagelados por parte de las larvas de *L. gigas* como ya se ha reportado para varias especies de moluscos bivalvos (Fitt y Trench 1981; Fitt et al., 1986). De cualquier modo, aunque todavía no se conoce el mecanismo de rechazo, los datos sugieren que hay reconocimiento celular y selección preferente de una determinada clade de *Symbiodinium*, lo que permite que se establezca o no la relación simbiótica después de la adquisición del simbiote (Trench, 1981; Trench et al., 1981a; Trench, 1998).

Las larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* aislado de *B. annulata* (C1) presentaron 100% de mortalidad el día 6, exactamente el mismo tiempo de supervivencia que las larvas inoculadas con el dinoflagelado aislado de *M. alicornis* (A) donde nunca se observó la presencia de este. Esto implica que hay una ventana menor a 6 días en donde las larvas veliger tienen que adquirir los dinoflagelados y formar una asociación simbiótica. Si no hay reconocimiento durante el contacto entre las células del simbiote y el hospedero (Pool, 1979) o no se establece una comunicación bioquímica entre el hospedero y el alga (Meints y



Pardy, 1980; Warr y Cohen, 1990) el resultado es la expulsión o digestión de los dinoflagelados.

Por otro lado, las larvas veliger de *L. gigas* inoculadas con *Symbiodinium* aislados del gorgonáceo *P. anceps* (B1) y de *L. gigas* (C4) persistieron en el interior de las larvas de *L. gigas* (Fig. 40) hasta terminar las observaciones de juveniles de 30 mm de longitud sifonal. Resultados similares fueron realizadas en la medusa *Cassiopeia xamachana* en la adquisición de diferentes tipos de *Symbiodinium* aislados del mismo organismo y de diferentes hospederos. En todos los casos excepto uno fueron adquiridos lo que indica que el proceso de asimilación es selectivo ya que reconoció a 2 de las 4 clades a las que fue expuesta la larva (clade B1 de *P. anceps* y clade C4 de *L. gigas*) (Trench et al., 1981a). Asimismo, se han reportado datos similares para larvas veliger de los moluscos bivalvos *Tridacna squamosa*, *T. gigas* e *H. hippopus* inoculadas con *Symbiodinium* aislado del mismo organismo y de diferentes hospederos (Fitt y Trench 1981; Fitt et al., 1986).

En los primeros seis días de experimentación se observó una mayor supervivencia de las larvas veliger inoculadas con *Symbiodinium* de *L. gigas* (Fig. 41 y Fig. 42), en comparación a las larvas veliger inoculadas con simbiontes aislados del



gorgonáceo *P. anceps* y de los otros dos hospederos La supervivencia significativamente diferente en los 4 tratamientos ($p < 0.0001$) indica que la procedencia y filotipo de *Symbiodinium* es un factor importante para la supervivencia de la larva veliger de *L. gigas* durante su desarrollo. Sin embargo, en el ambiente natural la larva puede adquirir *Symbiodinium* no sólo de su mismo hospedero sino también de otro hospedero, lo que le confiere mayor probabilidad de supervivencia.

El número de células de *Symbiodinium* aisladas de *P. anceps* y de *L. gigas* en el interior de las larvas veliger se incrementó con respecto a la edad de las larvas (Fig. 43). Ambos lotes presentaron un incremento en el crecimiento (Fig. 44) con diferencias significativas entre los tiempos de muestreo ($P < 0.05$), pero las larvas inoculadas con *Symbiodinium* aislado de *L. gigas* alcanzaron mayor tamaño (Fig. 44).

De acuerdo a lo anterior, Fitt y Trench (1981) y Fitt et al. (1986) inocularon larvas veliger de diferentes especies de moluscos bivalvos con dinoflagelados de diferentes hospederos y observaron mayor supervivencia y crecimiento en las larvas que adquirieron *Symbiodinium* aislado de la misma especie.



Los dos tratamientos tuvieron el mismo suministro de alimento (*Isochrysis*) diario a lo largo de todo el experimento, entonces las larvas con mayor crecimiento podrían ser explicado por la presencia de los diferentes dinoflagelados adquiridos.

En algunos casos, aunque el hospedero tenga más de una clade de *Symbiodinium* siempre es fiel a mantener la asociación con los mismos clades, por lo que hay menor flexibilidad en la asociación (Rowan y Knowlton 1995; Baker, 2003). Esto significa que, aunque las larvas veliger de *L. gigas* pueden establecer una asociación simbiótica con *Symbiodinium* de diferentes orígenes la que aporta mas ventaja en términos de supervivencia y de crecimiento es el *Symbiodinium* proveniente de *L. gigas*.

Esta relación se cambia durante el proceso de la metamorfosis porque el *Symbiodinium* proveniente del gorgonáceo induce la metamorfosis de las larvas veliger de *L. gigas* sin ayuda de un inductor externo lo que no sucede en larvas veliger con *Symbiodinium* provenientes de *L. gigas*. Estas últimas larvas requieren de un inductor externo como *Laurencia poitei* para concluir el proceso de metamorfosis.



Posteriormente, las larvas veliger inoculadas con el *Symbiodinium* aislado de *L. gigas* (C4), presentaron un mayor crecimiento sifonal (Fig. 44). Sin embargo la adquisición de simbiontes del gorgonáceo (B1) por la larva veliger de *L. gigas* es ventajosa después de la metamorfosis en comparación a las larvas veliger que adquirieron *Symbiodinium* de *L. gigas* (Fig. 45 y Fig. 46).

En comparación a este estudio, Fitt y Trench (1981) observaron que la metamorfosis se lleva a cabo en todas las larvas veliger de *Tridacna*, ya sean inoculadas con *Symbiodinium* del mismo hospedero como en las inoculadas con simbiontes aislados de otros hospederos. La ventaja radica en que las larvas veliger inoculadas con simbiontes del mismo hospedero llevan acabo la metamorfosis más rápido.

La mayoría de los juveniles que no adquirieron simbiontes en estado larval mueren a las 3 semanas después de la metamorfosis y los juveniles que sobreviven presentan menor incremento longitudinal en comparación con los juveniles inoculados con *Symbiodinium* (Fitt et al., 1986). Por lo tanto, la adquisición del simbionte antes de la metamorfosis (etapa larval veliger) es crucial para la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de los juveniles (Fig. 45 y 46).



La observación de las heces fecales de los juveniles inoculados en fase larval con el simbiote del gorgonáceo *P. anceps* (clade B1) o con el simbiote de *L. gigas* (clade C4) mostró que los *Symbiodinium* liberados por este medio, no presentan daño aparente ni señales de digestión. Lo anterior indica que no son una fuente alimenticia (Fig. 47).

Conclusión

La clade B1 es clasificada como generalista en el arrecife de coral de Puerto Morelos (LaJeunesse, 2002). Lo anterior es importante porque la larva veliger de *L. gigas* eclosiona libre de dinoflagelados, por lo que éstos pueden ser adquiridos del ambiente. La adquisición de dinoflagelados clade B1 confieren ventajas a los invertebrados que los adquieren. Por lo que la adquisición de estos puede asegurar la supervivencia en etapa veliger, la inducción de metamorfosis y el crecimiento de los juveniles del caracol rosado *L. gigas*.



Bibliografía citada

- Adams, J. E. 1970. Conch fishing industry of Union Island, Granadines, West Indies. J. Trop. Sci. 12:279.
- Alcolado, P. M. 1976. Crecimiento, variaciones morfológicas de la concha y algunos datos biológicos del Cobo *Strombus gigas*. Ser. Oceanol., No. 34. Acad. Cienc. Cuba, Instituto Ocean. 36.
- Aldana, A. D., Patiño, S. V. and Brulé, T. 1994. Ingestion and digestion of eight algae by *Strombus gigas* larvae (Mollusca, Gasteropoda) studied by epifluorescence microscopy. Aquaculture. 126:151-158.
- Álvarez, L. R., Gutiérrez, B. F. P., José Fernando Ospina, A. J. F. Chiquillo, E. E. 2007. El caracol de pala (*Strombus gigas* Linnaeus, 1758) en el Caribe Colombiano: Revisión monográfica* Boletín Científico - Centro de Museos - Museo de Historia Natural Vol. 11. Pág. 301-332.
- Appeldoorn, R. S. 1985. Growth, mortality and dispersion of juvenile laboratory reared conch, *Strombus gigas*, and *Strombus costatus*, released at an offshore site. Bull. Mar. Sci. 37(3):785-793.
- Appeldoorn, R. S. 1988. Age determination, growth, mortality, and age of first reproduction in adult queen conch, *Strombus gigas* L., off Puerto Rico. Fish Res. 4:363-378.
- Appeldoorn, R. S. and Sanders, Y. M. 1984a. The effect of size on mortality of small juvenile conch *Strombus gigas* Linné and *Strombus costatus*? Gemlin. J. Shellfish Rev. 4(1):37-43.



- Appeldoorn, R. S. and Sanders, Y. M. 1984b. Quantification of the density – growth relationship in hatchery reared juvenile conch *Strombus gigas* Linné and *costatus* Gemlin. *J. Shellfish Res.* 4(1):63.
- Arribalza, B. E. 2007. Interpretación de las curvas de supervivencia *Revista Chilena de Cirugía.* 59(1) 75-86.
- Bachman, S. and Muller-Parker, G. 2007. Viable algae released by the seastar *Dermasterias imbricate* feeding on the Symbiotic sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Mar. Biol.* 150:369-375.
- Baghdasarin, G. and Muscatine, L. 2000. Preferential expulsion of dividing algal cells as a mechanism for regulating algal-cnidarian symbiosis. *Biol. Bull.* 199: 278–286.
- Baillie, B. C. A., Leggat, W., Yellowlees., 1998. Growth and metabolic responses of de giant clam zooxanthellae symbiosis in a reeffertilisation experiment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170:131-141.
- Baillie, B. C. A., Sicon, M., Silvestre, V., Villamor, K., Monje, V., Gómez, E. D., Baillie, B. K., 1999. Evidence for changing symbiotic algae in juvenile tridacnids. *Exp. Mar. Biol. Ecol.* 241, 207–221.
- Baker, A. C. 2003. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium* *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34:661–689.
- Ballantine, D. L. and Appeldoorn, R. S. 1983. Queen conch culture and future prospects in Puerto Rico. *Proc. Gulf Caribbean Fish Inst.* 35:57.
- Banaszak, A. T. 1985. The importance of zooxanthellae at various estages of development of the intertidal, burrowing clam, *Tridacna crocea* Lamarck 1819.



- Thesis of Bachelor of science. Departments of Botany and Zoology at the James Cook University of North Queensland. Australia. 80.
- Banaszak, A. T., Iglesias P. R. y Trench, R. K. 1993. *Scrippsiella velellae* sp. nov. (Peridiniales) and *Gloeodinium viscum* sp. nov. (Phytodiniales). Dinoflagellate symbionts of two hydrozoans (Cnidaria). J. Phycol. 29(4):517-528.
- Banaszak, A. T., Ayala, S. N., Rodríguez, R. A., Enríquez, S. and Iglesias, P. R. 2003. The response of *Millepora alcicornis* to two bleaching events in the Mexican Caribbean. *Rev. Biol. Tropical* 51:57-66.
- Barnes, R. S. K. 1980. Coastal lagoons. Cambridge: Cambridge University Press. 106.
- Barnes, D. J. 1983. Profiling coral reef productivity and calcification using pH and oxygen electrodes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 66:149-161.
- Barnes, D. R. 1989. Zoología de los invertebrados. 5a. Edición. Ed. Interamericana. México. 957.
- Batley, J. F. and Patton, J. S. 1984. A reevaluation of the role of glycerol in carbon translocation in zooxanthellae-coelenterate symbiosis. *Marine Biology*. 79:27-38.
- Batley, J. F. 1992. Carbon metabolism in zooxanthellae-coelenterate symbioses. *Algae and Symbioses*. Edited W. Reisser. England. pp 154-182.
- Berg, C. J. 1974. A comparative ethological study of *Strombus gastrops*. *Behavior* 51:274-322.
- Berg, C. J. 1976. Growth of the queen conch *Strombus gigas*, with a discussion of the practicality of its mariculture. *Mar. Biol.* 34:199-198.
- Berner, T., Wishkovsky, A. and Dubinsky, Z. 1986 (a). Endozoic algae in shelled gastropods – a new symbiotic association in coral reefs?. I.



- Photosynthetically active zooxanthellae in *Strombus tricornis* Coral Reefs 5:103-106.
- Berner, T., Wishkovsky, A. and Dubinsky, Z. 1986 (b). Endozoic algae in shelled gastropods – a new symbiotic association in coral reefs? II. Survey of distribution of endozoic algae in red sea snails. Coral Reefs 5:107-109.
- Blakesley, H. L. 1977. A contribution of the fisheries and biology of the queen conch, *Strombus gigas* in Belize. Abstract American Fish Soc. Annual Meeting, Vancouver Canada. pp 33-37.
- Boettcher, A. A. and Targett, M. N. 1996. Induction of metamorphosis in queen conch, *Strombus gigas* Linnaeus, larvae by cues associated with red algae from their nursery grounds. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 196:29-52.
- Boettcher, A. A. and Targett, M. N. 1998. Role of chemical inducers in larval metamorphosis of queen conch, *Strombus gigas* Linnaeus: Relationship to other marine invertebrate systems. Biol. Bull. 194: 132-142.
- Britos, M. N. and Aldana, A. D. 2000. Desarrollo embrionario de *Strombus pugilis* (Mesogastropoda: Strombidae) en el laboratorio. Rev. Biol. 48 supl 1:59-64.
- Brownell, W. N. 1976. Fisheries and aquaculture of the conch *Strombus gigas* in the Caribbean. Fundación Científica los Roques. Caracas, Venezuela. 59-69.
- Brownell, W. N. 1977. Reproduction laboratory culture and growth of *Strombus gigas*, *S. costatus* and *S. pugilis* in los Roques, Venezuela. Bull. Mar. Sci. 27:668-680.
- Brownell, W. N. and Stevely, J. M. 1981. The biology, fisheries and management of the queen conch *Strombus gigas*. Mar. Fish. Rev. 42(7):14-19.



- Buitrago, J. 1985. Cría en cautiverio, del huevo al adulto del botuto *Strombus gigas*. La Salle de Ciencias Naturales. Estación de Investigación Marina. Punta Piedras Margarita, Venezuela. pp. 9-18.
- Chanley, P. 1982. Queen conch culture: is it practical? Shellfisheries Newsletter. 82(16):12-13.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species) 2012. Evaluation of the review of significant trade (Dec 13.67) (Rev COP 14). AC26/PC 20 D.
- Coats, W. D. 2000. Dinoflagellate life-cycle complexities. J. Phycol. 38:417-419.
- Coffroth, M. A., Santos, S. R., Goulet, T. L. 2001. Early ontogenetic expression of specificity in a cnidarian-algal symbiosis. Mar Ecol Prog Ser.222:85–96.
- Coffroth, M. A and Santos, S. 2005. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. Protist. 156:19-34.
- Colombo, M. F., Rodríguez, A., Iglesias, P. I. 2010. Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. Coral Reefs. 29:899–907 DOI 10.1007/s00338-010-0638-x.
- Cook, C. B., D’Elia, C. F. and Muller-Parker, G. 1988. Host feeding and nutrient sufficiency for zooxanthellae in the sea anemone *Aiptasia pallida*. Marine Biology. 98:253-262.
- D’Asaro, C. N. 1965. Organogenesis, development and metamorphosis in the queen conch *Strombus gigas*, with notes on the breeding habits. Bull. Mar. Sci.15:359-416.
- Danilatos, G. D. 1998. Foundation of environmental scanning electron microscopy. Adv. Electron Phys. 71:109–250.
- Davis, M. 1994. Mariculture techniques for queen conch (*Strombus gigas* L.): Egg mass to juveniles stage. R. S. Appeldoorn B. Rodriguez Q. (Editors). Queen



- Conch Biology. Fisheries and Mariculture. Fundación Científica Los Roques, Caracas, Ven. 231-252.
- Davis, M. 2005. Species prolife queen conch, *Strombus gigas*. Publications, by the Southern Regional Aquaculture Center through Grant No. 2003-38500-12997 from the United States Department of Agriculture. SRAC Publication No. 7203.
- Davis, M., Heyman, D. W., Harvey, W and Withstandley, A. C. 1990. A comparison of two inducers, KCl and *Laurencia* extracts, and techniques for the commercial scale induction of metamorphosis in queen conch *Strombus gigas* Linnaeus, 1758 larvae. J. Shell. Res. 9:67-73.
- Davis, M., Mitchell, B. A. and Brown, J. L. 1984. Breeding behavior of the queen conch *Strombus gigas* held in a nature enclosed habitat. J. Shellfish Res. 4(1): 17.
- Davis, M. and Stoner W. A. 1999. Metamorphosis of queen conch larvae is triggered by trophic cues found in the nursery habitat. Proceeding of the 45th Gulf and Caribbean fisheries institute. 45:913-917.
- Davy, K. S. and Turner, R. J. 2003. Early Development and Acquisition of Zooxanthellae in the Temperate Symbiotic Sea Anemone *Anthopleura ballii* (Cocks). Biol. Bull. 205: 66-72.
- De Castillo, Z. y Lopetto, C. 1983. Los invertebrados. Tomo I. Los protistas de filiación animal. Ed. Universitaria Buenos Aires. Buenos Aires. 386.
- De La Rivas, J. 2000. La luz y el aparato fotosintético. En Bieto, A. J; Talón, M. Fundamentos de Fisiología Vegetal. (Eds.) McGraw-Hill, Madrid, España. 203-216.
- De La Torre, R. 1984. Pesquerías de caracol en el estado de Quintana Roo. Ciencias Pesqueras. Secretaria de Pesca México. 14:1-21.



- Dimond, J and Carrington, E. 2008. Symbiosis regulation in a facultatively symbiotic temperature coral: zooxanthellae division and expulsion.
- Dotts, D and Jacobs, J. 2000. Evolution of reef-building scleractinian corals in turbid environments: a paleo-ecological hypothesis. Proceedings 9th International Coral Reef Symposium. Bali, Indonesia.
- Dunbar, R. S. 1975. Stages in the life history of a symbiotic zooxanthella in pellets extruded by its host *Aiptasia tagetes* (duch and mich) (Coelenterata, anthozoa). Biol. Bull. 149:590-600.
- Eckert, R., Randall, D. and Augustine, G. 1989. Fisiología animal. Mecanismos y adaptaciones. 3ra. Edición. Ed. Interamericana McGraw-Hill. Nueva York. 683.
- Enríquez, S., Méndez, R. E., Ove Hoegh, G. O., Iglesias, P. R. 2017. functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. The Royal Society Publishing. Proc. R. Soc. B 284: 20161667.
- Falkowski, P. G., Dubunsky, Z., Muscatine, L. and Porter, J. W. 1984. Light and the bioenergetics of a symbiotic coral. BioScience. 34:705-709.
- Falkowski, P. G., Dubinsky, Z., Muscatine, L. and McCloskey, L. 1993. Population control in symbiotic corals. Bioscience. 43: 606-611.
- Falkowski, P. G. and Raven, J. A. 1997. Aquatic photosynthesis. Blackwell science, Massachusetts. US. 375.
- Faust, M. A. and R. A. Gulledge. 2002. Identifying harmful marine dinoflagellates. Smithsonian Contr. U.S. Natl. Herb. 42: 1-144.
- Ferrándiz, F. (1970). Elementos de Ecología Marina, Ed. Acribia. Zaragoza España.
- Fisher, C. R., Fitt, K. W and Trench, R. K. 1985. Photosynthesis and respiration in *Tridacna gigas* as a function of irradiance and size. Biol. Bull. 169:230-245.



- Fitt, W. K. 1984. The role of chemosensory behavior of *Symbiodinium microadriaticum*, intermediate host, and host behavior in the infection of coelenterates and molluscs with zooxanthellae. *Marine Biology*. 81:9-17.
- Fitt, W. K. 2000. Cellular growth of host and symbiont in a cnidarian-zooxanthellar symbiosis. *Biol. Bull.* 198:110-120.
- Fitt, K. W and Trench R. K. 1981. Spawning, development, and acquisition of zooxanthellae by *Tridacna squamosa* (Mollusca, Bivalvia). *Biological Bulletin*. 161(2):213-235.
- Fitt, K. W. and Trench, K. R. 1983. The relation of diel patterns of cell division to diel patterns of motility in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal in culture. *New Phytol.* 94: 421-432.
- Fitt, W. K., Fisher, C. R. and Trench, R. K. 1984. Larval biology of tridacnid clams. *Aquaculture*. 39: 181-195.
- Fitt, W. K., Fisher, C. R. and Trench, R. K. 1986. Contribution of the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* to the nutrition, growth and survival of larval and juvenile tridacnid clams. *Aquaculture*. 55:5-22.
- Freudenthal, H. D. 1962. *Symbiodinium* gen. nov. and *Symbiodinium microadriaticum* sp. nov., a zooxanthella. *Taxonomy, life cycle and morphology*. *J Protozool* 9: 45-52.
- Fournier, A. 2013. The story of symbiosis with zooxanthellae, or how they enable their host to thrive in a nutrient poor environment. *BioSciences Master Reviews*. 1-8.
- Fusetani, N. 2004. Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.* 21:94-104.



- García, S. E. y Aldana, A. D. 1999. El crecimiento en larvas de *Strombus gigas* (Mollusca, Gasteropoda) desde la eclosión hasta el asentamiento. Proceedings of the 45th Gulf and Caribbean Fisheries Institute. 45:859-870.
- García, S. J. R., Sabater, C. J., Esteves, R., Carlo, R. (2012). Fishery independent survey of commercially exploited fish and Shell fish populations from mesophotic reefs within the Puertorican EEZ. Submitted to CFMC, San Juan PR. 91 p.
- Goodwin, M. H. 1983. Overview of conch fisheries and culture. Proc. Gulf Caribbean Fish Inst. 35:43-45.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate In: Smith and M. H. Chanley (Editors), Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum, Nueva York. USA. 26-60.
- Hahn, K. O. 1989. Culture of queen conch *Strombus gigas*, in the Caribbean. Pp. 317-331. In Hanh K. O. (Ed.) Handbook of Culture of Abalone and other Marine Gastropods. C.R.C. Press Inc. Florida. USA. 347.
- Harii, S. N., Yasuda, M., Lodoriguez, L., T Irie, T., Hidaka, M. 2009. Onset of symbiosis and distribution patterns of symbiotic dinoflagellates in the larvae of scleractinian corals. Mar. Biol. 156: 1203-1212.
- Hesse, C. O. and Hesse, O. K. 1977. Conch industry in the turks and caicos islands. Underwater Nat. 10:4-9.
- Hirose, E., Iwai, K. and Maruyama, T. 2006. Establishment of the photosymbiosis in the early ontogeny of three giant clams. Mar. Biol. 148: 551-558.
- Hirose, M., Yamamoto, H., Nonaka, M. 2008. Metamorphosis and acquisition of symbiotic algae in planula larvae and primary polyps of *Acropora* spp. Coral Reefs. 27:247-254.



- Hochberg, J. E. and Atkinson, J. M. 2000. Spectral discrimination of coral reef benthic communities. *Coral reefs*. 19:164-171.
- Hodin, J. 2006. Expanding networks: Signaling components in and a hypothesis for the evolution of metamorphosis. *Integrative and Comparative Biology*. 46:719-742.
- Hoegh-Guldberg, O. 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshwat. Res.* 50:839-866.
- Hofmann, D.K. and Brand, U. 1987. Induction of metamorphosis in the symbiotic scyphozoan *Cassiopea andromeda*: role of marine bacteria and of biochemicals. *Symbiosis* 4: 99-116.
- Huang, H. J., Wang, L. H., Chen, W. N. U., Fang, L. S. and Chen, C. S. 2008. Developmentally regulated localization of endosymbiotic dinoflagellates in different tissue layers of coral larvae. *Coral Reefs*. 27: 365–372.
- Huston, M. 1985. Variation in coral growth rate with depth at Discovery Bay, Jamaica. *Coral Reefs*. 4: 19-25.
- Hughes, R. N. 1986. A functional biology of marine gastropods. Croom Helm Ltd. London and Sydney. 245.
- Iglesias-Prieto, R., Govind, N. S. and Trench, R. K. 1993. Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Phil. Trans. R. Soc Lond B*. 340:381-392.
- Iversen, E. S. 1983. Feasibility of increasing Bahamian conch production by mariculture. *Proc. Gulf Caribbean Fish Inst.* 35:83-88.
- Jameson, C. S. 1976. Early Life History of the Giant Clams *Tridacna crocea* Lamarck, *Tridacna maxima* (Röding), and *Hippopus hippopus* (Linnaeus). *Pacific Science*. 30:219-233.



- Jantzen, C., Wild, C., El-Zibdah, M., Roa-Quiaoit, H., Haacke, C., Richter, C. 2008. Photosynthetic performance of giant clams, *Tridacna maxima* and *T. squamosa*, Red Sea. *Mar Biol.* 155:211–222.
- Jeong, H. J., Lee, S. Y., Kang, N. S., Yoo, Y. D., Lim, A. S. Lee, M. J., Kim, H. S., Yih, W., Yamashita, H., Lajeunesse, T. C. 2014. Genetics and morphology characterize the dinoflagellate *Symbiodinium voratum*, n. sp., (Dinophyceae) as the sole representative of *Symbiodinium* clade E. *J. Eukaryotic Microbiology.* 61:75-94.
- Jory, D. E. and Iversen, E. S. 1988. Shell strength of queen conch, *Strombus gigas* aquaculture implications. *Aquac. Fish. Manag.*, 19:45–51.
- Jung, P. 1971. *Strombus gigas* from the bowden formation, Jamaica. *Nautilus* 84(4):129-131.
- Kempf, S. C. 1984. Symbiosis between the zooxanthella *Symbiodinium* (=Gymnodinium) *microadriaticum* (Freudenthal) and four species of nudibranchs. *Biol. Bull.* 166: 110- 126.
- Klumpp, W. D and Griffiths, L. C. 1994. Contributions of phototrophic and heterotrophic nutrition to the metabolic and growth requirements of four species of giant clam (Tridacnidae). *Mar. Ecol. Prog.* 115:103-115.
- Krause, G and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 42:313-349.
- Kruger, A. and Schleyer, M. H. 1998. Sexual reproduction in the coral *Pocillopora verrucosa* (Cnidaria: Scleractinia) in KwaZulu-Natal, South Africa. *Marine Biology.*132:703-710.
- Kumar, S. and Singh, S., 1979. Discovery of micro-organisms from the bedded cherts of the Deoban Limestone (Late Precambrian), Lesser Himalaya, Uttar Pradesh. *Curt. Sci.* 48: 209-211.



- LaJeunesse, C. T. 2001. Investigating the biodiversity, ecology, and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the region: in search of a "species" level marker. *J. Phycol.* 37:866-880.
- LaJeunesse, T. C. 2002. Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Mar. Biol.* 141:387-400.
- LaJeunesse, T. 2005. Species radiations of symbiotic dinoflagellates in the Atlantic and Indo-Pacific since the Miocene-Pliocene transition. *Mol Biol Evol* 22: 570–581.
- LaJeunesse, T. C; Trench, R. K. 2000. The biogeography of two species of *Symbiodinium* (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone, *Anthoplaura elegantissima* (Brandt). *Biol Bull.* 199:126-134.
- LaJeunesse, T. C., Parkinson, J. E., Reimer, J. D. 2012. A genetics-based description of *Symbiodinium minutum* sp. nov. and *S. psygmophilum* sp. nov. (Dinophyceae), two dinoflagellates symbiotic with cnidaria. *J. Phycol.* 48, 1380–1391. doi:10.1111/j.1529-8817.2012.01217.x.
- LaJeunesse, T. C., Lee, S. Y., Gil-Agudelo, D. L., Knowlton, N., Jeong, H. J. 2015. *Symbiodinium necroappetens* sp. nov. (Dinophyceae): an opportunist zooxanthella found in bleached and diseased tissues of Caribbean reef corals. *European Journal of Phycology*, (ahead-of-print), 1-16.
- Landau, B. M., Kronenberg, G. C., Herbert, G. S. 2008. A large species of *Lobatus* (Gastropod: Strombidae) from the Neogene of the Dominican Republic, with note on the genus. *El Veliger*. Santa Bárbara: California Malacozoological Society, Inc. 50:31–38.



- Laughlin, R. A. and Weil, M. E. 1983. Queen conch mariculture and restoration in the archipelago of Roques: Preliminary results. Proc. Gulf. Caribbean Fish Inst. 35-64.
- Lee, T. E. and Go, T. O. 1997. Survival analysis in public. Annu. Rev. Public Health. 18:105-34.
- Leroy, C. 1984. Ingestion, assimilation and growth of juveniles of the queen conch *Strombus gigas* Linne fed experimental diets. J. Shellfish Res. 4(1):23-30.
- Lee, S. Y., Jeong, H. J., Kang, N. S., Jang, T. Y., Jang, S. H., Lajeunesse, T. C. 2015. *Symbiodinium tridacnidorum* sp. nov., a dinoflagellate common to Indo-Pacific giant clams, and a revised morphological description of *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, emended Trench & Blank. European Journal of Phycology, (ahead-of-print), 1-18.
- Lewis, J. B. 1989. Spherical growth in the Caribbean coral *Siderastrea radians* and its survival in disturbed habitats. Coral Reefs. 7: 161-167.
- Little, C. 1965. Notes on the anatomy of the queen conch, *Strombus gigas*. Bull. Mar. Sci. 15:338-358.
- Manning, M. M. and Gates, R. D. 2008. Diversity in populations of free-living *Symbiodinium* from a Caribbean and Pacific reef. Limnology and Oceanography. 53:1853-1861.
- Margulis, L. y Schwartz, K. 1985. Cinco reinos: Guía ilustrada de los pila de la vida en la tierra. Labor, Barcelona.
- Martínez, V. D M. 1990. Utilización de un alimento balanceado en el cultivo masivo de juveniles de caracol *Strombus gigas*. Memorias. VIII Congreso Nacional de Oceanografía. Escuela de Ciencias del Mar, Sinaloa. p. 12.



- Marshall, A. T. 1996. La calcificación en hermatípicos y ahermatípicos corals.-
Science, 271: 637-639.
- Murayama, T. and Heslinga, A. G. 1997. Fecales discharge of zooxanthellae on the
giant clam *Tridacna derasa*, with reference to their in situ growth rate. Mar.
Biol. 127:473-477.
- Máximo, R. A., Alvarenga, A. B: Física general. 4ta edición. Editorial Oxford
University. Reino Unido. 2002. p 1220.
- Maxwell, K and Johnson, N. G. 2000. Chlorophyll fluorescente- a practical guide. J.
of Exp. Bot. 345:659-668.
- Meints, R. H and Pardy, R. L. 1980. Quantitative demonstration of cell surface
involvement in a plant animal symbiosis: Lectin inhibition of reassociation. J.
Cell Set. 43:239-251.
- Muller, P. G and Elia, C. D. 1997. Interactions between corals and their symbiotic
algae. In C Birkeland, ed. Life and death of coral reefs. New York: Chapman
and Hall. 96-113.
- Muller-Parker G., D'Elia, F. C., Cook, B. C. 2015. Interactions Between corals and their
symbiotic algae. C. Birkeland (ed.). Coral reefs in the anthropocene. Springer
Science.
- Muscatine, L., McCloskey, L. R. and Marian, R. E. 1981. Estimating the daily
contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. Limnol.
Oceanogr. 26, 601-611.
- Muscatine, L., Wilkerson, P. W. and McCloskey, R. L. 1986. Regulation of population
density of symbiotic algae in a tropical marine jellyfish (*Mastigias* sp.). Mar.
Ecol. 32:279-290.



- Muscantine, L. 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in coral reefs. In: Dubinsky, Z. (Ed.), *Ecosystems of the World 25: Coral Reefs*. Elsevier, Amsterdam, pp. 75-84.
- Norton, J. H., Shepherd, M. A., Long, H. M. and Fitt, W. K. 1992. The zooxanthella tubular system in the giant clam. *Biological Bulletin* 183:503-506.
- Ogawa, Y. and Coral, J. 1987. Asentamiento de larvas de *Strombus gigas* en estanquería de concreto. Gulf and Caribbean Fish Institute. Martinique.
- Palincsar, J. S., Jones, W. R., and Palincsar, E. E. 1988. Effects of isolation of the endosymbiont *Symbiodinium microadriaticum* (Dinophyceae) from its host *Aiptasia pallida* (Anthozoa) on cell wall ultrastructure and mitotic rates. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 107:53-66.
- Paracer, S. and Ahmadjian, V. 2000. *Symbiosis: An introduction to biological associations*. Edition 2th. Oxford University Press, Inc. USA. 153-167.
- Peel, J. R and Aranda, A. D. 2012. Growth assessment of the pink Queen Conch *Strombus gigas* by direct methods in two nursery ground of a natural protected area of the Mexican Caribbean. *Proceeding of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute*. 64:383-390.
- Pérez, P. M. and Aldana, A. D. 2003. Actividad reproductiva de *Strombus gigas* (Mesogasteropoda: Strombidae) en diferentes hábitats del Arrecife Alacranes, Yucatán. *Rev. Biol. Trop.* 51, Supl. 4: 119-126.
- Pinzón, J. H., Devlin-Duarte, M. K., Weber, X. M., Baums, I. B., LaJeunesse, T. C. 2011. Microsatellite loci for *Symbiodinium* A3 (*S. fitti*) a common algal symbiont among Caribbean Acropora (stony coral) and Indo-Pacific giant clams (*Tridacna*). *Conservation Genetic Resources*. 3:45-47.



- Pool, R. R. 1979. The role of algal antigenic determinants in the recognition of potential algal symbionts by cells of *Chlorohydra*. *J. Cell. Set.* 35:367-379.
- Randall, J. E. 1964a. Contribution to the biology of the queen conch *Strombus gigas*. *Bull. Mar. Sci.* 14:246-295.
- Randall, J. E. 1964b. The habits of the queen conch. *Sea Front.* 10:230-239.
- Rebasa, P. 2005. Conceptos básicos del análisis de supervivencia. *Cirugía española: Órgano oficial de la Asociación Española de Cirujanos.* 78: 222-230.
- Pochon, X., Putnam, H. M., Burki, F., Gates, R.D. 2012. Identifying and characterizing alternative molecular markers for the symbiotic and free-living dinoflagellate Genus *Symbiodinium*: e29816. [doi: 10.1371/journal.pone.0029816].
- Reisser, W. 1992. Basic mechanism of signal Exchange recognition, specificity, and regulation in endosymbiotic systems. In: *Algae and Symbiosis: Plants, Animals Fungi, Viruses, Interaction Explored* (Reisser W., Ed.). Biopress, Bristol. 657-674.
- Rodríguez, L. A. 1986. Desarrollo embrionario y metamorfosis del caracol rosado *Strombus gigas*. Tesis de Maestría. Cinvestav – Unidad Merida, México. 43.
- Rodríguez, L. M., Wood, C. E. M., Hollingsworth, L. L., Krupp, D. A., Weis, V. M. 2006. Temporal and spatial infection dynamics indicate recognition events in the early hours of a dinoflagellate/coral symbiosis. *Mar. Biol.* 149:713-719.
- Rowan, R. and Knowlton, N. 1995. Intraspecific diversity and ecological zonation in coral algal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci.* 92: 2850-2853.
- Rowan, R. and Powers, A. D. 1992. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Plant Biology.* 89:3639-3643.
- Sandt, J. V. and Stoner, W. A. 1993. Ontogenetic shift in habitat by early juvenile queen conch, *Strombus gigas* patterns and potential mechanisms. *Fish. Bull.* 91:516-525.



- Santos, S. R y Coffroth M. A. 2003. Molecular genetic evidence that dinoflagellates belonging to the genus *Symbiodinium* freudenthal are haploid. Biol. Bull. 204: 10–20.
- Santos, S. R y Coffroth M. A. 2006. Genetic diversity of symbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium*. Protist.156: 19-34.
- Scaget, R. F., Bandoni, R. J., Rouse, G.E., Schofield, W. B., Stein, J. R. and Taylor, T. M. C. 1987. El Reino Vegetal. Los grupos de plantas y sus relaciones evolutivas. Omega. Barcelona, España.
- Sidall, S. E. 1983. Biological and economic outlook for hatchery production of juvenile queen conch. Proc. Gulf Caribbean Fish Inst. 35:46-52.
- Sidall, S. E. 1984. Synopsis of recent research on the queen conch *Strombus gigas* Linné. J. Shellfish Res. 4(1).
- Smith, D. C. 1979. From extracellular to intracellular: the establishment of a symbiosis. R. Soc. Lond. B. 204: 115-130.
- Sosa, C. E. 1997. Problema y perspectiva del cultivo de langosta en Quintana Roo. 19-37 pp. En Caro, C. C. I y Sosa, C. E. (Ed.). La acuicultura en el sureste mexicano. Colegio de la frontera sur (ECOSUR) Chetumal, Quintana Roo.
- Stat, M., Carter, D., Hoegh, G. O. 2006. The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts—symbiosis, diversity, and the effect of climate change. Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics, 8:23–43.
- Stoner, A. W. 1989. Winter mass migration of juvenile queen conch *Strombus gigas* and their influence on the benthic environment. Mar. Ecol. Prog. Ser. 56:99-104.
- Stoner, A. W. 1997. The status of queen conch, *Strombus gigas*, research in the Caribbean. Marine Fisheries Review. 59(3): 14-22.



- Stoner, A. W., Mehta, N. and Lee, T. N. 1997. Recruitment of *Strombus* veligers to the Florida Keys reef tract: relation to hydrographic events. *J. Shellfish res.* 16:1-6.
- Stoner, A.W., Ray, M. and Waite, J. M. 1995. Effects of a large herbivorous gastropod on macrofauna communities in tropical seagrass meadows. *Mar Ecol Prog Ser* 121: 125-137.
- Stoner, A. W. and Sandt, J. V. 1991. Experimental analysis of habitat quality for juvenile queen conch in seagrass meadows. *Fish. Bull. U.S.* 89:693-700.
- Stoner, A. W. and Waite, M. J 1990. Distribution and behavior of queen conch *Strombus gigas* relative to seagrass standing crop. *Fishery Bulletin, U. S.* 88:573-585.
- Stone, A. and Davis, M. 2010. Queen Conch stock assessment historical fishing grounds Andres Island, Bahamas. Report produced by Community Conch for: The Nature Conservancy Northern Caribbean Office Nassau, Bahamas.
- Taylor, D. L. 1973. The cellular interactions of algal-invertebrate symbiosis. *Advances in Marine Biology.* 11: 1-56.
- Trench, K. R. 1974. Nutritional potentials in *Zoanthus socuathus* (Coelenterata, Anthozoa). *Helgolander wiss. Meeresunters.* 26:174-216.
- Trench, R. K. 1979. The cell biology of plant-animal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:485–531.
- Trench, R. K. 1981. Cellular and molecular interactions in symbioses between dinoflagellates in marine invertebrate. *Pure and Appi. Chem.* 53:819-835.
- Trench, K. R. 1987. Dinoflagellates in non-parasitic symbioses. *The biology of dinoflagellates* (Ed) Oxford. 530-570.



- Trench, K. R. 1993. Microalgal-invertebrate symbioses: a review. *Endocytobiosis & Cell Res.*, 9:135-175.
- Trench, R. K. 1998. Microalgas-invertebrate symbiosis, current trends. *Encyclopedia of Microbiology*, Vol 3. By Academic Press, Inc. 129-142.
- Trench, R. K. and Fitt, K.W. 1981. Recognition phenomena in symbioses between marine invertebrates and "zooxanthellae"; uptake, Sequestration and persistence. *Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd.* 94:529-545.
- Trench, R. K., Colley, N. J. and Fitt, W. R. 1981(a). Recognition phenomena in simbioses between marine invertebrate and "zooxanthellae"; uptake, sequestration and persistence. *Ber. Deutsch. Ges. Bd.* 94:529-545.
- Trench, K. R., Wetthey, S. D. and Porter, J. W. 1981(b). Observations on the symbiosis with zooxanthellae among the tridacnidae (Mollusca, Bivalvia). *Boil. Bull.* 161:180.
- Trench, R. K and Blank, R. J. 1987. *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, *S. goreauii* sp. Nov., *S. Kawagutii* sp. Nov. and *s. pilosum* sp. Nov.: Gymnodinioid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. *J. Phycol.* 23:469-481.
- Vázquez, N. G. y Echeverría, O. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. México DF: Fondo de Cultura Económica.
- Van Den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H. M. 1995. *Algae: An Introduction to Phycology.* (Cambridge University Press, Cambridge, UK).
- Van Oppen, M. J. H. 2007. Perspective: hidden diversity in coral endosymbionts unveiled. *Molecular Ecology*, 16, 1125–1126.
- Warr, G. W and Cohen, N. 1990. *Phylogenesis of Immune Functions.* Publicado por CRC Press. 326.



- Weil, M. E. and Laughlin, G. R. 1984. Biology, population dynamics, and reproduction of the queen conch *Strombus gigas* Linné in the archipelago the Roques National Park. J. Shellfish Res. 4(1).
- Wham, D. C., Pettay, D. T., Lajeunesse, T. C. 2011. Microsatellite loci for the host-generalist "zooxanthella" *Symbiodinium trenchi* and other clade D *Symbiodinium*. Conservation Genetic Resources. 3:541-544.
- Wilkens, A. L. 1986. The visual system of the giant clam *Tridacna*: Behavioral adaptations. Biol. Buil. 170:393-408.
- Wilkerson, P. F., Kobayashi, D. and Muscatine, L. 1988. Mitotic index and size of symbiotic algae in Caribbean reef corals. Coral Reefs. 7:29-36.
- Yacobovitch, T., Weis, M., Benayahu, Y. 2003. Development and survivorship of zooxanthellate and azooxanthellate primary polyps of the soft coral *Heteroxenia fuscescens*: laboratory and field comparisons. Mar. Biol.142:1055-1063.
- Yakovleva, I. and Hidaka, M. 2004. Differential recovery of PSII function and electron transport rate in symbiotic dinoflagellates as a possible determinant of bleaching susceptibility of corals. Mar Ecol Prog Ser. 268:43-53.
- Yamada, N., Nagato, M., Murakami S., Ikeuchi M., Oho E. and Baba N. 1983. Preparation for observation on the fine structure of biological specimens by high resolution SEM. J Electron Micros. 32:321-330.
- Yellowlees, D. and Warner, M. 2003. Photosynthesis in symbiotic algae. Photosynthesis in algae. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp 437-455.
- Zar, H. J. 1999. Biostatistical analysis. 4th. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 663.