

03065

1



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO  
PROYECTO ACADÉMICO ESPECIALIZACIÓN, MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS DEL MAR  
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**“VARIACIONES INTERESPECÍFICAS EN LA  
SENSIBILIDAD TÉRMICA DE DINOFLAGELADOS  
SIMBIOTES DE INVERTEBRADOS  
Y SU RELACIÓN CON EL  
BLANQUEAMIENTO DE CORAL”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR  
ÁREA OCEANOGRAFÍA QUÍMICA**

**P R E S E N T A:**

**BLANCA NATALIA AYALA SCHIAFFINO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO**

279795



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Unidad Académica Puerto Morelos, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Roberto Iglesias Prieto, gracias a la beca crédito otorgada por el CONACyT con número de registro 96105 y al financiamiento de la DGPA con número de registro IN-215197.

*Euclides le propuso que se quitara la ropa y bajara con él, aunque sólo fuera para ver ese otro cielo debajo del mundo que eran los fondos de corales...*

*Gabriel García Márquez*

*Con todo mi amor a mis padres,  
a mi hermana Vivian y a Daniel.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

Especialmente al Dr. Roberto Iglesias Prieto por su excelente asesoría durante la realización de este trabajo, su gran entusiasmo, apoyo incondicional, y sobre todo por su confianza.

Al Dr. Martín Merino Ibarra por confiar en mí, brindándome su gran apoyo y fraternal amistad desde que ingresé a la maestría.

A los revisores de este trabajo, cuyas sugerencias fueron muy importantes para el mejoramiento de este trabajo:

Dra. Susana Enríquez Domínguez, por su motivación y apoyo incondicional.

Dra. Anastazia Teresa Banaszak, por su afectuosa y amable dedicación.

Dr. Eric Jordán Dahlgren, por sus observaciones y gentil atención.

A la Dra. Patricia Briones Fourzan, al Dr. Antonio Peña, y al Dr. Adolfo Gracia, por las facilidades otorgadas para realizar este trabajo en la Unidad Académica Puerto Morelos, recibiendo cordial atención y un agradable ambiente de trabajo.

Al Dr. Robert Trench y a Todd LaJeunesse por su amistad y valiosa colaboración en este trabajo.

A la Dra. Patricia Thomé Ortiz por su gran apoyo, cariño y gratos momentos compartidos.

Al Cand. Dr. Miguel Angel Alatorre Mendieta por ser un gran amigo de sabios consejos y por aunque sea a distancia recibir su afecto e interés en mi superación integral.

A la Dra. María de Jesús Cerecer, quien influyó notablemente para mi ingreso a la maestría con su motivación e interés en mi superación, ...gracias por su cariño y amistad.

A la Dra. Brigitta Van Tussenbroek, por su amable orientación para los análisis estadísticos.

A la Biól. Verónica Monroy Vázquez, mi gran amiga, por su confianza y cariño, pero sobre todo por su compañía en los ratos buenos y tolerancia en mis ratos malos.

A la M. en C. Aime Rodríguez Román por su amistad y apoyo con sus oportunos consejos.

A la M. en C. Rosa Rodríguez por su amistad y ayuda en la búsqueda bibliográfica.

A Judith Vázquez, Marcy Durán, Norma Suazo, Gabriela Almaraz, Maricarmen y Dolores, así como al M. C. Francisco Escobar y al Sr. Ramón Ramos, por su gentileza y atención en mis trámites administrativos.

Al M. en C. Francisco Ruiz y al Técnico Gabriel Rosado por sus asesorías en aspectos de computación y por los amenos momentos.

A mis compañeros estudiantes y al personal que labora en la U. A. Puerto Morelos:

Karla P., Tito P., Miguel Angel M., Víctor Hugo B., Lupita B., Alejandro S., Norma P., Gaby R., Dra. Lulú Segura, Dra. Judith Sánchez, Dr. Enrique Lozano, Dr. José Alvarez, Dn. José Martín, Dn. Felipe Cat, Dn. Manuel Chim, Amauri, Eutimio, Ricardo, Margarito, ...con cariño a todos quienes me han brindado su ayuda y compañía.

A mis abuelos, tíos y primos a quienes extraño y quiero mucho, por su cariño y apoyo fraternal.

A mis amigos de antaño y por siempre:

Juan Z., Toño S., Norma Angélica M., Quique, Alejandro G., por aquellos momentos inolvidables en que convivimos tanto ...los extraño mucho.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque en ella alcancé otra de mis metas más importantes.

Muy especialmente a Daniel Gasca Flores, por su gran apoyo incondicional y todos los gratos momentos que con amor nos hemos brindado.

## ÍNDICE DE TEXTO

RESUMEN .....	i
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	8
III. OBJETIVOS .....	13
IV. MATERIAL Y MÉTODOS .....	16
Inducción de fluorescencia .....	16
Fluorómetro de alta resolución temporal.....	17
Fluorómetro de amplitud modulada .....	20
PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	25
1ª PARTE Localización del daño en el FSII por el aumento de la temperatura en dinoflagelados en cultivo .....	25
2ª PARTE Estimación de la sensibilidad térmica de dinoflagelados simbiotes en corales intactos y su variación interespecífica .....	26
3ª PARTE Análisis de la posible relación sinérgica entre los efectos de la temperatura y la irradiancia .....	29
V. RESULTADOS .....	33
1ª PARTE Señales de daño en el fotosistema II .....	33
2ª PARTE Variaciones interespecíficas de la sensibilidad térmica.....	45
3ª PARTE Relación entre los efectos de la temperatura y la irradiancia.....	56
VI. DISCUSIÓN.....	69
Localización del daño .....	72
Variación de $V(j)$ y el área sobre la curva .....	76
Variación interespecífica de la sensibilidad térmica .....	80
Relación entre los efectos de la temperatura y la irradiancia.....	87
Relación entre los efectos de la temperatura y el tiempo de exposición .....	89
VII. CONCLUSIONES.....	93
VIII. PERSPECTIVAS .....	94
BIBLIOGRAFÍA .....	95
ANEXO	
Origen de la señal de fluorescencia del FSII .....	A-1

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 4.1</b> Diagrama del fluorómetro de alta resolución temporal PEA	19
<b>Fig. 4.2</b> Señal de fluorescencia de dinoflagelados simbioses en cultivo registrada por un fluorómetro de amplitud modulada, PAM Hansatech.	22
<b>Fig. 4.3</b> Aparato posicionador para la fibra óptica del fluorómetro Diving-PAM.	24
<b>Fig. 4.4</b> Mesa de experimentos para muestras de coral a diferentes temperaturas	31
<b>Fig. 4.5</b> Cámara donde se expusieron las muestras de coral a las diferentes temperaturas bajo luz subsaturante	31
<b>Fig. 4.6</b> Diagrama de la cámara de acrílico utilizada en la medición de fluorescencia en muestras de dinoflagelados simbioses en cultivo, con el fluorómetro PAM de Hansatech	32
<b>Fig. 4.7</b> Equipo para la medición de fluorescencia en dinoflagelados aislados, con el fluorómetro PAM de Hansatech	32
<b>Fig. 5.1</b> Curvas de inducción de fluorescencia variable de dinoflagelados en cultivo	35
<b>Fig. 5.2</b> Fluorescencia variable relativa a los 0.9 ms [V(j)] y cosecha cuántica máxima de separación de carga del FSII (Fv/Fm), en función de la temperatura después de exposiciones de 15 min, de <i>S. pilosum</i> y de <i>S. pulchrorum</i>	35
<b>Fig. 5.3</b> Cosecha cuántica máxima de la separación de carga en el FSII Fv/Fm y área sobre la curva de inducción con exposiciones de 15 min, en muestras de <i>S. pilosum</i> en oscuridad	36
<b>Fig. 5.4</b> Fluorescencia variable relativa [V(t)] de <i>S. pilosum</i> en cultivo	37
<b>Fig. 5.5</b> Fluorescencia variable relativa [V(t)] de <i>S. pulchrorum</i> en cultivo	38
<b>Fig. 5.6</b> Fluorescencia variable relativa [V(t)] de <i>S. corculorum</i> en cultivo	41
<b>Fig. 5.7</b> Fluorescencia variable relativa [V(t)] de <i>Symbiodinium</i> sp. (de <i>Pocillopora damicornis</i> ) en cultivo	41
<b>Fig. 5.8</b> Fluorescencia variable relativa a los 0.9 ms [V(j)] para las cuatro especies de dinoflagelados en cultivo	42
<b>Fig. 5.9</b> Variaciones de fluorescencia variable relativa a los 0.9 ms [V(j)], después de exposiciones de 15 y 45 min a cada temperatura. en <i>S. pilosum</i> y <i>S. pulchrorum</i> .	43
<b>Fig. 5.10</b> Cosecha cuántica relativa de separación de carga del FSII (Fv/Fm) de dinoflagelados en cultivo, con exposiciones de 45 min	44
<b>Fig. 5.11</b> Identificación genética de los filotipos a los que pertenecen los simbioses examinados, realizada por Todd LaJeunesse (sin publicar).	46
<b>Fig. 5.12</b> Cosecha cuántica relativa en función de la temperatura, registrada con el fluorómetro Diving-PAM sobre organismos intactos	48
<b>Fig. 5.13</b> Cosecha cuántica máxima (Fv/Fm) en función de la temperatura en dinoflagelados de <i>Montastrea cavernosa</i> , ajustados a una función sigmoide	50
<b>Fig. 5.14</b> Temperaturas críticas T <sub>c50</sub> y T <sub>i</sub> , para las cosechas cuánticas máxima y efectiva de la separación de carga del FSII de los diferentes dinoflagelados	52
<b>Fig. 5.15</b> Ajustes y límites de confianza (90-95%) a las funciones sigmoidales que describen la variación de la cosecha cuántica	53
<b>Fig. 5.16</b> ETR relativo en función de la temperatura y de la irradiancia actínica en <i>Symbiodinium</i> sp. (de <i>Pocillopora damicornis</i> ), con exposiciones de 45 min.	57

<b>Fig. 5.17</b> Fotoprotección relativa de <i>Symbiodinium</i> sp. (de <i>Pocillopora damicornis</i> ), en función de la irradiancia actínica y con exposiciones de 45 min	57
<b>Fig. 5.18</b> Tasa de transporte de electrones de dinoflagelados en <i>Porites astreoides</i>	60
<b>Fig. 5.19</b> ETR máxima en función de la temperatura de dinoflagelados simbiotes en <i>Porites astreoides</i>	60
<b>Fig. 5.20</b> Desactivación no fotoquímica de dinoflagelados en <i>Porites astreoides</i> en exposiciones de 45 min	61
<b>Fig. 5.21</b> Tasa de transporte de electrones de dinoflagelados en <i>Porites astreoides</i> , en función de la irradiancia y tiempo de exposición a 33°C	62
<b>Fig. 5.22</b> ETR máximo y cosecha cuántica relativa en función del tiempo de exposición a 33°C de dinoflagelados en <i>Porites astreoides</i>	62
<b>Fig. 5.23</b> Desactivación no fotoquímica NPQ, en función de la irradiancia y del tiempo de exposición a 33°C de dinoflagelados en <i>Porites astreoides</i>	63
<b>Fig. 5.24</b> Tasa de transporte de electrones de dinoflagelados en <i>Diploria clivosa</i> con exposiciones de 45 min	66
<b>Fig. 5.25</b> ETR máxima de dinoflagelados simbiotes en <i>Diploria clivosa</i>	66
<b>Fig. 5.26</b> Desactivación no fotoquímica de dinoflagelados en <i>Diploria clivosa</i>	67
<b>Fig. 5.27</b> ETR en función de la temperatura y de la irradiancia de dinoflagelados en <i>Diploria strigosa</i>	68
<b>Fig. 5.28</b> Desactivación no fotoquímica de dinoflagelados en <i>Diploria strigosa</i> bajo luz subsaturante	68
<b>Fig. 6.1</b> Curvas de inducción de fluorescencia de <i>S. kawagutii</i> obtenidas con un fluorómetro de amplia resolución temporal	70
<b>Fig. 6.2</b> Variación de la cosecha cuántica máxima relativa de dos especies en función del tiempo de exposición	91
<b>Fig. A.1</b> Estructura del Fotosistema II	A-3
<b>Fig. A.2</b> Separación de carga en el Fotosistema II	A-3

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 4.1</b> Ecuaciones para determinar diferentes parámetros derivados de la señal de fluorescencia registrada por un fluorómetro PAM.	22
<b>Tabla 4.2</b> Especies de invertebrados que se estudiaron en este trabajo.	28
<b>Tabla 5.1</b> Características de las curvas de inducción de fluorescencia de cuatro especies de dinoflagelados simbiotes en cultivo.	40
<b>Tabla 5.2</b> Temperaturas críticas $T_i$ y $T_{c50}$ para las cosechas cuánticas $F_v/F_m$ y $\Delta F/F_m'$ .	51
<b>Tabla 5.3</b> Clasificación de los invertebrados según la sensibilidad y tolerancia térmica de los dinoflagelados simbiotes considerando su respuesta fisiológica.	55
<b>Tabla 6.1</b> Temperaturas críticas $T_i$ y $T_{c50}$ obtenidas de los tratamientos a diferentes temperaturas (45 min de exposición).	78

## RESUMEN

La mayoría de los eventos de blanqueamiento de coral registrados han ocurrido asociados a anomalías térmicas, es decir, a aumentos excepcionalmente extremos de la temperatura del agua. Junto al aumento de temperatura aparecen a menudo asociados otros factores ambientales como son el aumento de la penetración de luz en la columna de agua, especialmente luz ultravioleta, una disminución de la turbulencia y, por tanto de la difusividad del carbono proveniente del CO<sub>2</sub> hacia la superficie del coral, etc. De entre todos los factores ambientales que pudieran estar implicados en el surgimiento de eventos de blanqueamiento de coral se ha seleccionado en este trabajo a la temperatura con el fin de poder evaluar su importancia y grado de asociación con la aparición de dicho fenómeno. El efecto de la temperatura podría ser sinérgico al efecto de otros factores ambientales como la luz, la radiación ultravioleta o el estrés oxidativo. En este trabajo se ha examinado también el efecto sinérgico de la temperatura y la luz y su asociación con el blanqueamiento de coral.

Inicialmente se expusieron células aisladas de cuatro especies diferentes de dinoflagelados simbiotes en cultivo a varias temperaturas (25 a 40°C), y bajo condiciones controladas de luz (60  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y oscuridad. A partir del análisis de la curva de inducción de la señal de fluorescencia, se determinó el daño por estrés térmico en el aparato fotosintético de dichos dinoflagelados simbiotes. Se confirmó que el sitio de daño en muestras de dinoflagelados simbiotes mantenidas en oscuridad es el lado donador del FSII del aparato fotosintético, y que el sitio de daño en muestras mantenidas bajo luz subsaturante es el lado aceptor del FSII. El evidente deterioro del FSII en la oscuridad, demostró que el sitio inicial de daño por estrés térmico en dinoflagelados simbiotes, es previo al posible daño localizado a nivel de la enzima fijadora de carbono.

Exposiciones breves (45 min) a diferentes temperaturas (25 a 40°C) de dinoflagelados simbiotes dentro de su respectivo hospedero (15 especies de invertebrados marinos), permitieron evaluar diferencias interespecíficas en su respuesta al aumento de temperatura. Estas exposiciones se hicieron tanto en luz como en oscuridad. Las diferencias en la

sensibilidad térmica entre especies se evaluaron utilizando como descriptores la temperatura de inicio de la disminución de la cosecha cuántica máxima ( $T_i$ ) y la temperatura crítica ( $T_{C50}$ ) definida como aquella a la cual la cosecha cuántica efectiva presentaba una disminución del 50%. Se identificó un amplio rango de sensibilidades térmicas, las cuales no presentaron correlación con el filotipo de los respectivos dinoflagelados. Este resultado permitió concluir que los filotipos no determinan la respuesta fisiológica de los dinoflagelados simbioses ante el aumento de la temperatura.

Finalmente, se describió por primera vez la reciprocidad entre los efectos que causan la temperatura y la luz, con estimaciones de las tasas de transporte de electrones e índices de fotoprotección en función de la temperatura y de la luz. Este análisis permitió concluir que el efecto sinérgico de la luz y la temperatura está fuertemente relacionado con la inducción del blanqueamiento de coral. La fotoprotección registrada indicó que a mayor temperatura, menores intensidades de luz producen efectos similares a los que se presentan a una temperatura menor y con una intensidad mayor de luz.

La identificación del sitio de daño en la actividad de los dinoflagelados simbioses por estrés térmico, contribuye a aumentar el conocimiento del efecto del aumento de la temperatura sobre los invertebrados simbióticos y su asociación con los eventos de blanqueamiento de coral. Ésto ofrece la posibilidad de utilizar estos organismos como indicadores de cambios ambientales en particular por estrés térmico, examinando su alejamiento del óptimo fisiológico. Es importante considerar para este análisis que no todas las especies tienen la misma sensibilidad a las variaciones de temperatura ambientales, como hemos podido constatar para el aumento de la temperatura.

Con este trabajo se apoya la hipótesis de que la pérdida de la actividad fotosintética de los dinoflagelados simbioses es el evento clave que desencadena la ruptura de la asociación simbiótica, y por lo tanto induce el blanqueamiento de coral, y que el factor principal responsable de este daño es el estrés térmico en sinergia con la irradiancia. La variabilidad interespecífica encontrada en la sensibilidad térmica de los dinoflagelados simbioses, podría explicar la heterogeneidad de respuestas que normalmente se observan en condiciones naturales en la comunidad arrecifal durante un evento de blanqueamiento.

# I. INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral se encuentran entre los ecosistemas más diversos y complejos de la Tierra. Éstos se desarrollan comúnmente en los océanos tropicales y subtropicales oligotróficos a temperaturas entre 25 y 29°C, en plataformas insulares y continentales (Goenaga 1988). Su complejidad biótica los hace comparables con ecosistemas terrestres como las selvas tropicales. La importancia socioeconómica de estos ecosistemas radica en que aún cuando ocupan menos del 0.2% de los océanos del mundo, su función está relacionada a actividades que generan grandes beneficios para la población humana. Los arrecifes de coral, por su belleza natural, representan un atractivo turístico que resulta en un valioso recurso económico (billones de dólares) para los países asociados a estos ecosistemas (Hoegh-Guldberg 1999). Ofrecen además un importante recurso pesquero explotable pues proveen el 25% de la captura pesquera de los países en desarrollo (Sale 1999). Los productos de las pesquerías asociadas al arrecife son frecuentemente básicos para el mantenimiento de las poblaciones insulares y costeras, ya que para algunas son su fuente esencial de proteína. Son también fuente de productos farmacéuticos (biocompuestos altamente activos cuya aplicabilidad en la investigación médica está siendo cada vez más importante); y finalmente tienen un papel protector de la línea costera frente al efecto erosivo del mar y las tormentas.

Debido a que la estructura de los arrecifes de coral está compuesta predominantemente por carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), el ecosistema coralino desempeña un papel fundamental en el ciclo del carbono de la biósfera al estar íntimamente relacionado con las concentraciones de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera y en los océanos (Hallock 1997). Por ello resulta un sistema muy importante para investigar los efectos del Cambio Climático Global. Gattuso *et al.* (1998) y Kleypas *et al.* (1999) han pronosticado una disminución de la calcificación en los corales en el siglo XXI, como consecuencia de un decremento en el nivel de saturación de aragonita. Esto es debido al incremento del 0.4% año<sup>-1</sup> que se ha registrado en la presión parcial de  $\text{CO}_2$  en la atmósfera por emisiones antropogénicas. Los combustibles fósiles, así como las estructuras calcáreas, rocosas o coralinas, representan un sumidero de  $\text{CO}_2$  a largo-plazo.

Sin embargo, a escala de tiempo humana, el papel de los arrecifes en la variación de la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> es probablemente irrelevante (Hallock 1997).

Finalmente, los arrecifes proveen refugio para especies amenazadas tales como tortugas marinas y manatíes y realizan un relevante papel en el ciclo de vida de especies marinas migratorias de importancia económica (UNEP 1999).

Hasta hace algunos años se consideraba que los principales factores causantes de daño a los arrecifes de coral eran directamente antropogénicos, tales como la sedimentación, la contaminación y la sobreexplotación, especialmente con el uso de dinamita y cianuro. A partir del evento masivo de blanqueamiento de coral de 1998 asociado a mortalidades masivas en algunas regiones del océano Índico, esta visión cambió radicalmente, ya que el aumento global de la temperatura en combinación con las perturbaciones antropogénicas directas, se reconoció como el principal peligro para estos ecosistemas a escala planetaria (Wilkinson 1999). En la actualidad hay suficientes evidencias para considerar que los arrecifes de coral están entre los ecosistemas más sensibles al cambio climático (UNEP 1999).

Aún cuando algunos de los arrecifes están protegidos legalmente como santuarios marinos, o como áreas de manejo para uso sostenible de sus recursos, en general los arrecifes de coral se están viendo afectados por el Cambio Climático Global. Se ha sugerido que los arrecifes protegidos de perturbaciones antropogénicas, podrían ser más resistentes al estrés añadido del cambio climático (UNEP 1999).

Indudablemente los corales son la parte central del arrecife. Ahí, los corales hermatípicos (constructores de arrecife) son los responsables de la gran producción que caracteriza a los arrecifes de coral (Muscatine y Weis 1992). De su crecimiento depende la construcción y el mantenimiento de la estructura arrecifal. Los corales han sido la base de la estructura de los ecosistemas de arrecifes de coral por 200 millones de años (Wood 1998), aunque también dependen de otros organismos capaces de soldar su estructura (algas calcáreas), o de habitarla (peces, algas e invertebrados).

Los corales escleractinios son organismos coloniales cuya constitución permite recordar aquellos seres mitológicos que resultan de la unión de dos organismos completamente diferentes y son por ello considerados por Iglesias-Prieto (comunicación personal) como “monstruos”. Efectivamente, en los arrecifes de coral predominan las asociaciones simbióticas entre invertebrados (cnidarios) y dinoflagelados (algas unicelulares) comúnmente llamados “zooxantelas” (Muscatine 1980), que se consideran entre los principales productores primarios de las transparentes aguas someras. Los corales representan sistemas bióticos complejos particularmente sensibles a cambios que pueden perturbar a la simbiosis por ejemplo, son especialmente sensibles al aumento en la temperatura superficial del mar (Iglesias-Prieto 1997).

La relación simbiótica entre estos invertebrados y los dinoflagelados es una asociación mutualista y muchos ejemplos de simbiosis dinoflagelado-invertebrado ocurren en aguas oligotróficas. En condiciones normales los dinoflagelados simbioses contribuyen a la nutrición y calcificación de los corales (Muscatine y Weis 1992).

Por medio de la fotosíntesis, los dinoflagelados proveen de materia orgánica [más del 95% de su producción fotosintética (Muscatine 1990)] al hospedero, el cual a su vez les aporta nutrientes (amonio y fosfato) como desechos metabólicos (Trench 1979). Esto último parece ser imprescindible para la sobrevivencia de estos productores primarios que se encuentran normalmente en aguas oligotróficas. Hay otros aspectos de la simbiosis que pueden tener implicaciones importantes a nivel de ecosistema. Aún cuando un coral individual puede sobrevivir sin dinoflagelados simbioses, e incluso formar estructuras arrecifales, como el caso del bioherma formado por el coral ahermatípico cosmopolita *Lophelia pertusa* en el mar de Noruega (Hovland *et al.* 1997), los arrecifes de coral actuales probablemente no existirían en ausencia de la simbiosis (Trench 1992). Además, la distribución de las especies de corales en los arrecifes puede depender de las especies de simbioses albergadas por tales especies de coral, y de las restricciones adaptativas de los simbioses (Trench 1992).

Al activarse la fotosíntesis, los dinoflagelados absorben el CO<sub>2</sub> disuelto en el agua circundante, favoreciendo que el pólipo precipite CaCO<sub>3</sub> en forma de aragonita. Lo anterior,

es uno de los mecanismos propuestos para explicar la influencia de los dinoflagelados simbioses en la calcificación del coral. Se ha señalado la translocación de productos orgánicos al coral, así como la absorción de fosfatos los cuales son inhibidores potenciales de la calcificación, como dos de las funciones de la “zooxantela” que pueden estimular la calcificación (Muscatine 1971).

Por otra parte, el color o pigmentación que presentan los corales se debe en gran parte al contenido de pigmentos fotosintéticos en las células de dinoflagelados simbioses. Por eso, el color no sólo depende de la concentración de pigmentos por célula de simbiote, sino también de la densidad de dinoflagelados que presente el coral, la cual normalmente se encuentra entre  $5 \times 10^5$ - $10^6$  cél  $\text{cm}^{-2}$  (Hoegh-Guldberg y Smith 1989). Se ha observado que en condiciones normales los corales aclimatados a alta luz se distinguen por presentar un color más claro que el de los aclimatados a baja luz (Falkowski *et al.* 1993).

Los dinoflagelados simbioses normalmente muestran bajas tasas de migración o vida libre en la columna de agua, sin embargo también llegan a presentar cambios estacionales dentro del hospedero que dependen probablemente de diferentes variables físicas en el ambiente circundante (Hoegh-Guldberg 1999). Aún cuando estos cambios generalmente son graduales, y probablemente representen ajustes lentos en la simbiosis para optimizar el desarrollo fisiológico, dentro de cierto rango de condiciones físicas y químicas pueden ocurrir reducciones drásticas en la densidad de simbioses. La salinidad reducida (causada por intensas lluvias), el aumento o descenso de la luz o el aumento en la temperatura ambiental, pueden ocasionar que los corales y otros invertebrados simbióticos se tornen pálidos rápidamente (Glynn 1993). Así mismo, los efectos de cianuro, herbicidas, pesticidas y factores biológicos como las bacterias (Rosenberg *et al.* 1999), pueden ocasionar una pérdida de pigmentos en los dinoflagelados simbioses.

Por lo anterior, los corales no siempre mantienen su color característico, principalmente cuando se rompe la asociación simbiótica entre el dinoflagelado y su respectivo hospedero, fenómeno denominado blanqueamiento de coral (“*coral bleaching*”) (Yonge y Nicholls 1931, citado en Hoegh-Guldberg y Smith 1989). El blanqueamiento de coral se manifiesta como una pérdida de coloración del invertebrado simbiótico, la cual puede ser el resultado

de la expulsión de los dinoflagelados endosimbiontes y/o de la reducción en las concentraciones intracelulares de pigmentos fotosintéticos en los dinoflagelados, sin cambios en la densidad de población de los mismos (Hoegh-Guldberg y Smith 1989). De manera que es posible identificar dos fenómenos involucrados en el blanqueamiento de coral: el blanqueamiento del hospedero y el del simbiote. La disociación de la simbiosis dinoflagelado-invertebrado parece ser una respuesta límite frente a condiciones ambientales adversas. El hecho de que estas simbiosis involucren dinoflagelados y hospederos taxonómicamente diversos sugiere que las diferentes asociaciones pudieran poseer diferentes niveles de tolerancia a cambios en parámetros ambientales (Iglesias-Prieto *et al.* 1992).

Es importante señalar que este fenómeno natural no sólo afecta a los corales hermatípicos, sino también a la mayoría de los invertebrados simbióticos arrecifales (Hoegh-Guldberg y Smith 1989). Su efecto podría manifestarse a escala local, afectando sólo partes de arrecifes, o a una escala geográfica más amplia involucrando a sistemas arrecifales completos, lo que se conoce en este último caso como blanqueamiento masivo (Glynn 1993, Hoegh-Guldberg y Salvat 1995).

Aún cuando el blanqueamiento de coral puede ser producido por el límite de tolerancia a la variación en diversos parámetros ambientales (temperatura, salinidad, tensión de oxígeno, radiación, exposición aérea, contaminación), se ha propuesto que la temperatura elevada actuando en sinergia con otros factores (irradiancia, presión elevada de oxígeno, radiación ultravioleta) puede ser el agente causal principal del blanqueamiento. Yonge y Nicholls (1931, citado en Jokiel y Coles 1990) fueron los primeros en reportar el blanqueamiento de coral como el resultado de la temperatura elevada en el campo, y también ellos realizaron experimentos clásicos donde describieron la expulsión de las zooxantelas (dinoflagelados) por corales bajo estrés térmico. La interacción de temperatura elevada con la irradiancia parece ser un rasgo común en los eventos de blanqueamiento (Jokiel y Coles 1990, Lesser *et al.* 1990, Iglesias-Prieto *et al.* 1992, Brown 1997). Como mencionó Glynn (1993), se han reportado blanqueamientos de coral durante períodos de baja velocidad del viento, mares en

calma, y baja turbidez, condiciones que favorecen el calentamiento de aguas someras y la alta penetración de radiación solar.

La duración y escala de la perturbación ambiental determina la severidad de la respuesta de blanqueamiento y la habilidad del coral de recuperarse (Gates 1990). Los corales blanqueados se pueden recuperar cuando las condiciones de temperatura regresan a sus valores normales (Yonge y Nicholls 1931 en Jokiel y Coles 1990). Además, se ha observado que las concentraciones de zooxantelas en los tejidos de corales blanqueados pueden reducirse al mínimo, pero generalmente permanecen suficientes células sobrevivientes en el coral que inician la recuperación cuando las condiciones ambientales subóptimas han cesado (Jokiel y Coles 1990).

La identificación de temperaturas superficiales anormalmente altas como agente causal de los recientes eventos de blanqueamiento de coral, tiene implicaciones ecológicas muy importantes. Tales eventos han ocurrido en regiones geográficas muy grandes, y frecuentemente han resultado en mortalidades elevadas de algunas especies de coral y de su fauna asociada (Glynn 1993, UNEP 1999).

Desde la descripción del blanqueamiento de coral realizada por Glynn (1984) donde planteó la relación del mismo con el fenómeno El Niño-Oscilación del Sur (ENSO), se han reportado eventos globales de blanqueamiento. Diversos estudios indican una correlación positiva entre los eventos de blanqueamiento masivo de corales y temperaturas superficiales del mar anormalmente elevadas (Glynn 1993). La mayoría de estos eventos han sido recurrentes con aumento en su frecuencia, intensidad y distribución geográfica (Brown 1997, UNEP 1999).

De los eventos de blanqueamiento reportados hasta ahora, los que ocurrieron en 1998 se consideran los más severos, ya que afectaron a todos los sistemas de arrecifes de coral en el mundo (NOAA 1998). Así mismo, durante 1998 se registraron las temperaturas superficiales del mar más altas de las registradas hasta la fecha asociadas con el fenómeno ENSO, y la mayoría de los sitios donde se presentó blanqueamiento de coral coinciden con áreas de temperatura superficial del mar elevada (UNEP 1999). La amenaza que representa

el calentamiento global para los corales comprende los impactos de más factores antropogénicos que ya colocan a los arrecifes en riesgo (UNEP 1999).

Incrementos en la severidad y frecuencia de eventos de blanqueamiento por temperaturas superficiales anormalmente elevadas, como los que se presentan con la incidencia del fenómeno de El Niño, preferentemente en épocas de verano, así como los que, según las predicciones ocurran debido al aumento del efecto invernadero (Hoegh-Guldberg 1999), pueden resultar en importantes catástrofes ecológicas y económicas. La mortalidad subsecuente a eventos severos y prolongados de blanqueamiento podría amenazar la supervivencia de los organismos que habitan los arrecifes, y las poblaciones humanas que dependen de sus recursos, tanto de las pesquerías cuyos beneficios se reducirían por la pérdida de la diversidad biológica marina local, como del turismo relacionado con el arrecife que se vería negativamente afectado por su degradación. También la protección costera se vería fuertemente alterada. Por lo tanto, dada la importancia ecológica y económica de estos ecosistemas, la severidad de los recientes eventos de blanqueamiento de coral y su relación con el Cambio Climático Global presentan preguntas cuya respuesta es cada vez más necesaria.

## II. ANTECEDENTES

Los mecanismos celulares que involucra el blanqueamiento constituyen una variedad de procesos que incluyen: la mortalidad de dinoflagelados *in situ*; la expulsión de algas desde los filamentos mesenteriales; y la separación de células del endodermo del hospedero que contienen células simbiotes y su posterior excreción al medio (Brown 1997). Para entender como las asociaciones responden al estrés ambiental independientemente de cual sea su origen, es necesario analizar las respuestas de sus miembros aislados, así como las respuestas de las asociaciones intactas (Iglesias-Prieto *et al.* 1992). Se han propuesto dos mecanismos para explicar el blanqueamiento inducido por temperaturas elevadas a nivel celular.

Por un lado, se ha demostrado que el estrés por temperatura causa la separación y liberación de células intactas del endodermo que contienen dinoflagelados simbiotes. En cuanto se excretan las células del hospedero, éstas se hidrolizan rápidamente en el ambiente liberando a las zooxantelas (dinoflagelados). No se conocen todavía las causas de esta excreción celular pero se especula que sea debida a una acumulación de daño en el mecanismo responsable de la adhesión celular en el hospedero (Gates *et al.* 1992). Este mecanismo podría explicar la disminución en la densidad de simbiotes (blanqueamiento del hospedero), pero no explica las reducciones en la concentración de pigmentos fotosintéticos que se observan en las algas sobrevivientes (blanqueamiento del simbiote). Si la temperatura elevada afectara la fisiología del coral directamente sería posible esperar que especies de coral idénticas genéticamente, al estar expuestas al mismo estrés térmico, presentaran la misma respuesta, sin embargo hay muchos reportes sobre la distribución espacial heterogénea o de mosaico con que ocurre el blanqueamiento de coral, aún entre las mismas especies.

Por otra parte, considerando el importante significado trófico de la fotosíntesis del dinoflagelado simbiote para el invertebrado, se han realizado estudios para examinar los efectos de exposiciones breves a temperaturas elevadas sobre el aparato fotosintético del dinoflagelado simbiote *Symbiodinium microadriaticum* (en cultivo). Estos estudios han indicado que la fotosíntesis se inhibe a temperaturas mayores que 30°C con una completa

disfunción a los 36°C (Iglesias-Prieto *et al.* 1992). Por esto, Iglesias-Prieto *et al.* (1992) propusieron que una reducción o interrupción en el movimiento de metabolitos desde el alga al hospedero podría resultar en la ruptura de las interacciones entre ellos, conduciendo a la eventual expulsión de las células simbiotes. La reducción en la fotosíntesis a temperaturas superiores a los 30°C se puede explicar como una reducción en la capacidad de transporte de electrones en el aparato fotosintético, probablemente relacionada con un aumento en la fluidez de los lípidos de las membranas del tilacoide. Al comparar señales de fluorescencia de células estresadas térmicamente con células en las que los lados aceptor y donador del fotosistema II (FSII) habían sido dañados químicamente, se demostró que las exposiciones a temperaturas elevadas provocaban la inactivación del FSII del aparato fotosintético, debido al daño secuencial de los lados aceptor y donador del FSII (Iglesias-Prieto 1997).

Posteriormente Warner *et al.* (1999) al determinar la eficiencia fotosintética y analizar las proteínas del tilacoide de dinoflagelados en corales blanqueados por estrés térmico, tanto experimentalmente como bajo condiciones naturales, reportaron daño severo en el FSII de dinoflagelados simbiotes. Estos resultados se observaron tanto en células dentro del hospedero, como aisladas en cultivo. Los dinoflagelados con la mayor pérdida de actividad fotosintética mostraron una significativa disminución en la proteína D1 del centro de reacción del FSII, aportando evidencia directa del daño irreversible por estrés térmico en el FSII en dinoflagelados simbiotes viviendo dentro de los corales durante un evento de blanqueamiento natural. Aún cuando no se conoce la secuencia de eventos que conducen a la pérdida de la proteína D1, lo anterior sugiere que el estrés térmico tiene un efecto primario sobre la desestabilización del centro de reacción del FSII, siendo su tasa de daño superior a su tasa de reparación, y que estas alteraciones fisiológicas en el funcionamiento de los dinoflagelados simbiotes son la causa fundamental del blanqueamiento de coral (Warner *et al.* 1999).

Jones *et al.* (1998) después de exponer muestras de *Styllophora pistillata* a temperaturas elevadas y analizar las respuestas de los dinoflagelados simbiotes dentro del hospedero, explicaron que se bloqueó la NADP reductasa, lo cual causó: (1) un desvío del flujo de electrones hacia otras vías consumidoras de oxígeno como el ciclo Mehler-Ascorbato-

Peroxidasa (MAP) responsable de la fotorespiración; y (2) un fuerte aumento de la tasa de separación de carga del FSII con respecto a la capacidad del ciclo MAP bajo luz saturante para absorber los electrones desviados. El aumento en el gradiente de pH entre la membrana tilacoidal induce un aumento de la disipación fotoprotectiva como calor de la energía luminosa absorbida en exceso, la cual se puede monitorear midiendo la actividad de un desactivador no fotoquímico de la fluorescencia dependiente de la energía. Estos autores, como causa del blanqueamiento de coral, propusieron un modelo basado en el deterioro inicial por estrés térmico en la tasa de reacciones oscuras (ciclo de Calvin) de la fotosíntesis de los dinoflagelados, que se observa precede al daño en el FSII. Esto es, se sugieren como sitios potenciales de daño como consecuencia del incremento de la temperatura, las enzimas del ciclo de Calvin, específicamente la enzima Rubisco (*Ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase*), efecto deletéreo que tendría lugar antes de que el daño sea detectable sobre la tasa de transporte de electrones en el FSII. Aspectos importantes de este modelo son: que el daño en el FSII no es el efecto inicial en la secuencia de estrés térmico en zooxantelas y que la luz ejerce una influencia secundaria.

Por otro lado, y considerando que los cnidarios simbióticos comúnmente experimentan una elevada presión parcial de O<sub>2</sub> dentro de sus tejidos como resultado del oxígeno liberado fotosintéticamente (Dykens y Shick 1982), se ha planteado la hipótesis de que bajo temperaturas elevadas, en sinergia con la hiperoxia fisiológica y exposición a radiación UV, la energía absorbida en las membranas fotosintéticas produciría formas activas de oxígeno [oxígeno molecular singlete excitado (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>\*), radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)], que subsecuentemente causarían daño celular y la expulsión de los simbioses (Lesser *et al.* 1990, Lesser 1997). Este estrés oxidativo inducido por temperatura sería la causa de la fotoinhibición de la fotosíntesis en las zooxantelas, y traería como consecuencia el blanqueamiento en los cnidarios simbióticos (Lesser *et al.* 1990).

Los dinoflagelados simbioses, parte esencial de la asociación microalga-invertebrado, son organismos flagelados eucariontes unicelulares y ahora reconocidos como un grupo diverso de especies de algas, representado por ocho géneros pertenecientes a cinco o seis órdenes (Banaszak 1993, Trench 1993, Iglesias-Prieto y Trench 1997). Los dinoflagelados simbioses del género *Symbiodinium* Freudenthal están distribuidos entre hospederos

filética y ecológicamente diversos (Trench 1993). A partir del análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen que codifica para la subunidad pequeña ribosomal (SSU rDNA) del grupo de los 16s, se han colocado dentro de tres grupos ó tipos filogenéticos llamados clades o filotipos (A, B, y C), las cuales, hay que resaltar, no son unidades de identidad taxonómica (Rowan y Powers 1991).

Se ha propuesto la existencia de una asociación entre la fisiología de las “zooxantelas” y sus filotipos. Las “zooxantelas” de filotipos A y B, que se encuentran comúnmente en corales que crecen en ambientes someros, se sugirió que están adaptadas a alta irradiancia, por lo que se presumiría que son más resistentes a cambios en la temperatura. Las “zooxantelas” del filotipo C, por otro lado, predominan en corales localizados en ambientes profundos, por lo que se presumiría adaptadas a baja irradiancia y, por lo tanto presentarían una mayor sensibilidad térmica (Rowan *et al.* 1997). Sin embargo se sabe que diferentes especies de *Symbiodinium* están adaptadas a diferentes regímenes de luz, no habiendo correlación entre los filotipos de las algas y su capacidad de foto-aclimatación (Iglesias-Prieto y Trench 1994, 1997). Estudios de los mismos autores han mostrado que el flujo de electrones en el aparato fotosintético de las algas (para una descripción más detallada del aparato fotosintético ver el Anexo) y en diferentes hospederos invertebrados, presenta diferentes sensibilidades térmicas (Iglesias-Prieto y Trench sin publicar), y que, en los pocos casos analizados, parece no haber correlación entre el filotipo del alga y su tolerancia a la temperatura. Por ejemplo, algas pertenecientes al filotipo C de *M. annularis* (de 15 m) y de *Agaricia lamarckii* mostraron poca tolerancia a la temperatura, mientras que las de *Siderastrea radians*, también del filotipo C y creciendo en ambientes muy someros mostraron una tolerancia más alta a la temperatura (Fitt y Warner 1995, Warner *et al.* 1996). Además, *S. kawagutii* del coral *Montipora verrucosa* y *Symbiodinium* sp. de *Pocillopora damicornis* (ambas del filotipo C) exhibieron una mayor tolerancia a la temperatura que *S. microadriaticum* (del filotipo A) (Iglesias-Prieto *et al.* 1992, Iglesias-Prieto 1997). Análisis de la composición específica de los eventos de blanqueamiento indican variaciones en la sensibilidad de las diferentes especies de invertebrados simbióticos ante estrés térmico (Glynn 1993). Varios estudios han demostrado que los dinoflagelados simbiotes aislados de diferentes hospederos son genéticamente diferentes (Trench y Blank 1987, Rowan y Powers 1991).

Precisamente estos organismos forman un grupo heterogéneo que incluye a miembros de por lo menos 8 géneros distribuidos en 5 órdenes (Banaszak *et al.* 1993). Estas variaciones genéticas probablemente resulten en sensibilidades diferenciales al estrés térmico, y por lo tanto expliquen los patrones específicos de blanqueamiento y recuperación observados en el campo (Glynn 1993).

### III. OBJETIVOS

Tomando como base los antecedentes que se han presentado se plantearon las siguientes preguntas:

- 1) ¿Cuál es el sitio de daño en los dinoflagelados simbioses? hasta ahora se ha identificado un daño por estrés térmico en el lado donador y aceptor del fotosistema II en una sola especie de dinoflagelado.
- 2) ¿Los filotipos A, B y C están asociados a variaciones de la fotofisiología de los dinoflagelados simbioses?
- 3) ¿Existe sinergia o amplificación de efectos entre la temperatura y la irradiancia, posibles agentes inductores del blanqueamiento de coral?

Por lo tanto, para responder a lo anterior se fijaron los siguientes objetivos:

- 1) Documentar los principales sitios de daño que el aumento de temperatura genera en el aparato fotosintético de los dinoflagelados simbioses de invertebrados en condiciones de oscuridad y de exposición a luz subsaturante.
- 2) Determinar la relación entre el filotipo del alga y su sensibilidad térmica, examinando un amplio número de algas *Symbiodinium* spp. representando los tres filotipos. Así mismo, evaluar la importancia de la variación interespecífica en la sensibilidad térmica de los dinoflagelados simbioses del género *Symbiodinium*, lo cual permitirá entender la diversidad de respuestas ante el blanqueamiento encontradas en campo entre especies de invertebrados que constituyen la comunidad arrecifal, y el por qué no todos los corales presentan este fenómeno bajo condiciones ambientales idénticas.
- 3) Evaluar la importancia del efecto combinado temperatura-irradiancia para explicar el fenómeno de blanqueamiento de coral, y documentar la interacción de estos dos factores que, en sinergia, pudieran ser agentes inductores del blanqueamiento de coral.

Para estudiar la respuesta de una asociación simbiótica ante estímulos ambientales, se requiere determinar cuál de los dos miembros percibe primariamente el estímulo, y la manera en que a partir de su reacción se origina la respuesta observada. Se ha propuesto que la disociación de la simbiosis ocurre bajo condiciones ambientales que exceden la tolerancia para las condiciones genéticas, bioquímicas y fisiológicas de alguno o ambos miembros de la simbiosis (Iglesias-Prieto *et al.* 1992). Como los límites de tolerancia de los invertebrados simbióticos ante cualquier parámetro ambiental están determinados por los límites individuales de tolerancia de sus miembros, es difícil a partir de experimentos empleando asociaciones intactas, detectar cuál de los dos elementos de la simbiosis es el primer afectado por las condiciones ambientales. En este sentido, primero se determinaron las respuestas frente al aumento de temperatura de cuatro especies de dinoflagelados aislados, bajo control experimental en el laboratorio. Se mantuvieron en oscuridad para evaluar el efecto en condiciones de relajación de la maquinaria fotosintética, evitando así la función de la enzima fijadora de carbono. Y en exposiciones de luz subsaturante para, al contrario, evaluar el efecto bajo condiciones que promueven el funcionamiento del aparato fotosintético (inducción total).

En una segunda fase se estimaron las sensibilidades térmicas de los dinoflagelados simbioses en 15 asociaciones intactas, midiendo tanto la cosecha cuántica máxima (en muestras mantenidas en oscuridad), como la cosecha cuántica efectiva (en muestras expuestas a luz subsaturante), también a temperaturas elevadas controladas. Con la identificación genética de los dinoflagelados que se consiguió por parte de un colaborador (Todd LaJeunesse, sin publicar) fue posible analizar la existencia de una correlación entre las diferentes sensibilidades térmicas y los filotipos a los que pertenecen los dinoflagelados simbioses de los distintos invertebrados que se estudiaron.

Por último, en una tercera fase se pretendió evaluar la relación sinérgica entre los efectos de la temperatura y de la luz, seleccionados por ser los dos factores ambientales más importantes implicados en el blanqueamiento de coral. En esta fase se propuso además que, como resultado de la pérdida observada en la capacidad para transportar electrones a temperaturas elevadas (Iglesias-Prieto *et al.* 1992), una mayor resistencia al estrés térmico

involucraría un incremento de las vías de desactivación no fotoquímicas de los estados excitados, con el fin de minimizar la fotodestrucción. Con el propósito de cuantificar las variaciones dependientes de la temperatura en la fotoprotección y en la tasa de transporte de electrones del aparato fotosintético se ha utilizado un fluorómetro de amplitud modulada.

La respuesta de los dinoflagelados ante cambios ambientales depende de su tolerancia a tales cambios, la cual estará en función de su capacidad de aclimatación. Para comprender los mecanismos de daño por condiciones extremas, en este caso de temperatura, y la causa de la variación en su sensibilidad térmica, es necesario tener en cuenta la conformación y funcionamiento del aparato fotosintético de estos organismos. Esto a su vez servirá para entender las señales que describen la tasa de transporte de electrones y los mecanismos de protección, que el mismo aparato fotosintético dispone (para una explicación detallada ver el Anexo).

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Debido al papel importante que desempeñan los dinoflagelados simbiotes como organismos fotosintéticos en el balance energético de la asociación intacta, y que tal función es un indicador muy sensible de estrés en productores primarios, se examinó el efecto de la temperatura sobre el aparato fotosintético de dinoflagelados simbiotes, empleando técnicas no destructivas de análisis de la señal de fluorescencia.

### Inducción de fluorescencia

La fluorescencia de Chl *a* *in vivo* de organismos fotosintéticos es una de las técnicas más poderosas para el estudio de la estructura y funcionamiento del aparato fotosintético (Karukstis 1991). Aunque la conversión fotoquímica de la energía absorbida por los complejos colectores de luz es en general muy alta, la reemisión de una pequeña fracción de esta energía es proporcional a la que se incorpora a las distintas vías de disipación de la excitación, tanto fotoquímicas como no fotoquímicas. Su variación es sumamente sensible y está acoplada a las condiciones de funcionamiento del aparato fotosintético, por lo que constituye una señal no invasiva que permite estudiar la variación en tiempo y espacio de una gran variedad de procesos fisiológicos relacionados con la fotosíntesis.

Cuando a una superficie fotosintética se le aplica un pulso de luz saturante, la señal de fluorescencia alcanza rápidamente un valor máximo ( $F_{max}$ ,  $F_m$  o  $P$ ) desde un nivel basal o nivel 0 ( $F_0$ ), para disminuir progresivamente, aunque de un modo más lento, hasta alcanzar valores próximos al nivel basal  $F_0$ . Este patrón de variación se conoce como “curva de inducción de Kautsky”. El análisis de esta señal de fluorescencia ha permitido un gran desarrollo del conocimiento tanto de la cinética de la fotoquímica primaria, como de la estructura y características de los distintos elementos implicados. En concreto el aumento rápido de la señal de fluorescencia a un máximo  $F_{max}$  se interpreta como la cinética de reducción del “*pool*” de plastoquinona en el sitio de anclaje de  $Q_B$  (para una descripción más detallada ver Anexo). La inducción de la fluorescencia es acelerada en presencia del herbicida 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU), el cual desplaza a  $Q_B$  de la proteína

$D_1$  de tal manera que  $Q_A$  no puede ser oxidada por  $Q_B$ . En lugar de que la fuente de plastoquinona llegue a reducirse sobre un período de 1 s, la acción fotoquímica se detiene y la inducción de fluorescencia se completa en milisegundos con la reducción de una molécula de  $Q_A$  por centro de reacción (Gregory 1989). Originalmente se denotó al desactivador de la fluorescencia con el símbolo  $Q$  por la palabra *quenching*, siendo coincidencia que precisamente el desactivador sea la plastoquinona, la cual también se denota por  $Q$ .

En el fotosistema II la plastoquinona  $Q_A$  oxidada es un eficiente desactivador de la fluorescencia, originándose una señal mínima (fluorescencia mínima,  $F_0$ ), mientras que su estado reducido induce altas emisiones de fluorescencia (fluorescencia máxima,  $F_m$  ó  $F_{max}$ ). La fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) es un indicador del estado redox del FSII.

Actualmente la medición de fluorescencia variable es una de las técnicas más empleadas para evaluar el funcionamiento del aparato fotosintético, tanto en el laboratorio como en el campo ya sea en plantas terrestres o acuáticas, o en organismos pluricelulares o unicelulares. Este trabajo se ha basado en gran parte en la utilización de esta técnica dado su carácter no invasivo, su facilidad y rapidez de uso y el enorme valor de la información que ofrece sobre el estado fisiológico de las membranas fotosintéticas, fundamentalmente para el seguimiento del estrés (Guissé *et al.* 1995). A continuación se describe la información que se obtiene utilizando los diferentes tipos de fluorómetro que se utilizaron en este trabajo.

### **Fluorómetro de alta resolución temporal**

El fluorómetro *PEA (Plant Efficiency Analyser*, de Hansatech, Kings Lynn, England-U.K. Tipo MK2), es un fluorómetro de alta resolución temporal, diseñado específicamente para obtener una descripción cualitativa de la dinámica del FSII. Provee una luz de excitación cuya intensidad máxima es de  $600 \text{ W m}^{-2}$ , con un arreglo de seis diodos emisores de luz roja (con pico en 650 nm). El sensor ilumina la superficie de la muestra (~4 mm de diámetro) de manera homogénea y captura automáticamente la señal de fluorescencia de la clorofila *a* con un fotodiodo, el cual tiene un filtro que evita el paso de longitudes de onda menores a 705 nm hacia el detector (Fig. 4.1). Este instrumento es capaz de capturar datos

con una resolución temporal que va de los 10  $\mu$ s hasta los 120 s. La señal de fluorescencia emitida por la muestra es registrada cada 10  $\mu$ s durante los primeros 2 ms, cada ms entre 2 ms y 1 s, y cada 100 ms de ahí en adelante (Strasser *et al.* 1995). La curva de inducción de fluorescencia que se obtiene, en escala semilogarítmica, se muestra en la figura 5.1(a y b). El análisis de esta curva ofrece información sobre la cinética de la fase rápida de la curva de inducción de Kautsky, siendo necesario, para una buena interpretación, que las muestras estén relajadas (mantenidas en oscuridad). El cociente  $F_v/F_m$  que se obtiene de la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_o$ ) y la fluorescencia máxima ( $F_m$ ) es un estimador de la cosecha cuántica máxima de separación de carga del fotosistema II.

Los organismos fotosintéticos presentan una curva de inducción polifásica en la fase rápida de incremento de la señal de fluorescencia de la curva de inducción de Kautsky. Tales fases o eventos se han nombrado con la secuencia O-J-I-P (fig. 5.1a). Dependiendo de las condiciones experimentales, se puede observar una caída en la fluorescencia después de cada evento (Strasser *et al.* 1995). La secuencia O-J-I-P representa la tasa de captura de la excitación del FSII y de transferencia de electrones hasta la cadena de transporte de electrones que comunica al FSII con el FSI (Strasser *et al.* 1995), es decir, representa la sucesiva reducción del reservorio aceptor de electrones del FSII (Govindjee 1993).

El análisis de los cambios en la fluorescencia variable relativa  $V(t) = (F_t - F_o) / (F_m - F_o)$ , donde  $F_t$  es la fluorescencia en el tiempo  $t$  de la curva, provee una descripción detallada de las respuestas cinéticas del fotosistema II a temperaturas elevadas (Guiseé *et al.* 1995; Strasser *et al.* 1995). Esta fluorescencia variable se normaliza de manera que los valores se encuentren entre 0 y 1 para hacer posible la comparación entre cada medición (Fig. 5.1b).

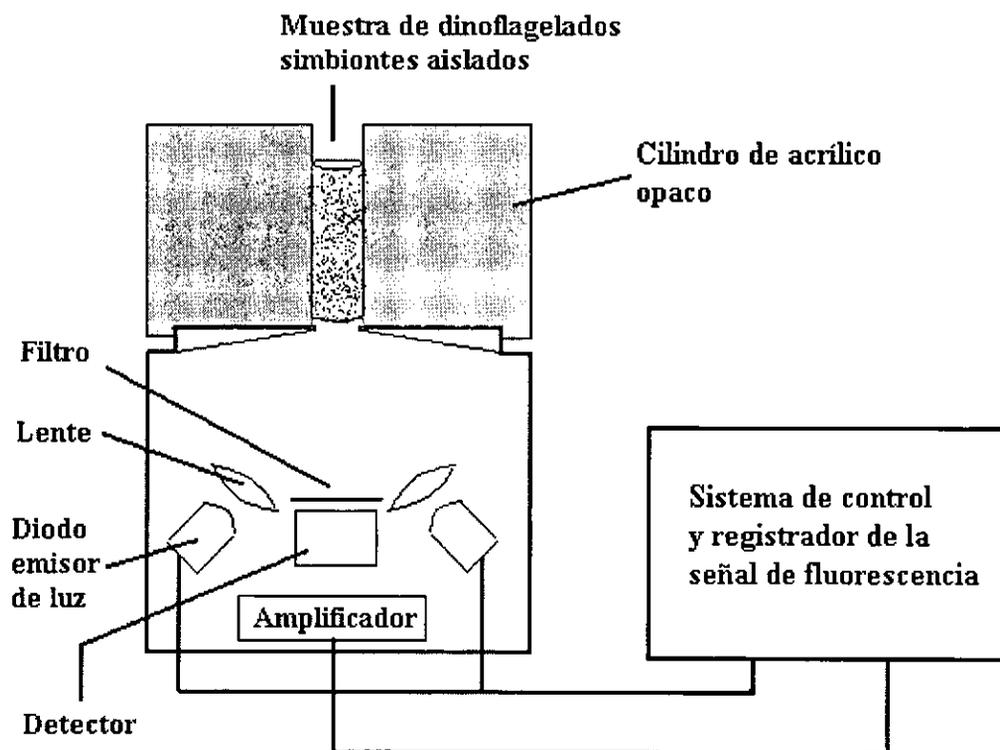
La relación de los eventos fotoquímicos que tienen lugar en el FSII con la secuencia polifásica que se observa en la curva de inducción de la señal de fluorescencia registrada por un fluorómetro de alta resolución temporal, es el siguiente:

- **O** emisión mínima de fluorescencia (máxima producción fotoquímica), es una medida de la eficiencia de la antena en la transmisión de excitación al centro de reacción del FSII.
- **O a J**, fase fotoquímica dependiente del equilibrio entre  $Q_A$ ,  $Q_A^-$  y  $Q_B^-$ . Se considera regulada por la intensidad de excitación, la eficiencia de separación de carga en el FSII

y también influenciada por los estados redox del complejo de Mn del lado donador del FSII. No requiere más de 1 ms para completarse.

- **J a I a P**, fases no-fotoquímicas ó fases térmicas, requieren más de 30 ms para completarse y parecen estar limitadas por un evento térmico, probablemente la tasa de difusión de la PQ en la membrana (Schreiber *et al.* 1977, Strasser *et al.* 1995). Se especula que el evento intermedio I y el final P se deben a la heterogeneidad en el lado aceptor producida posiblemente por una mezcla de diferentes estados redox del reservorio de plastoquinona. Además algunos complejos del FSII reducen el reservorio de plastoquinona más rápido que otros.

Las mediciones de fluorescencia en este estudio se realizaron con una sola intensidad de luz saturante de  $600 \text{ Wm}^{-2}$ .



**Fig. 4.1** Diagrama del fluorómetro de alta resolución temporal PEA de Hansatech Instruments Ltd; King's Lynn, UK (Hall y Rao 1994a) y adaptador de la celda con muestra de dinoflagelados simbiotes aislados.

## Fluorómetro de amplitud modulada

El espectro de emisión de la fluorescencia de la clorofila varía entre 660 y 800 nm, con un pico alrededor de 685 nm. La radiación entre 660-800 nm contenida en la luz actínica blanca utilizada por los organismos fotosintéticos para fijar carbono, es considerablemente mayor que la cantidad de fluorescencia emitida. Como la radiación del rojo proveniente de la luz actínica no puede ser distinguida de la fluorescencia por el detector, cuando se ha utilizado luz blanca para la excitación no es posible medir exactamente la emisión de la fluorescencia. Esta incapacidad del detector para discriminar entre la luz actínica y la señal de fluorescencia limitó severamente el uso de la fluorescencia para estudiar el proceso fotosintético en activo y no sólo con las membranas fotosintéticas relajadas.

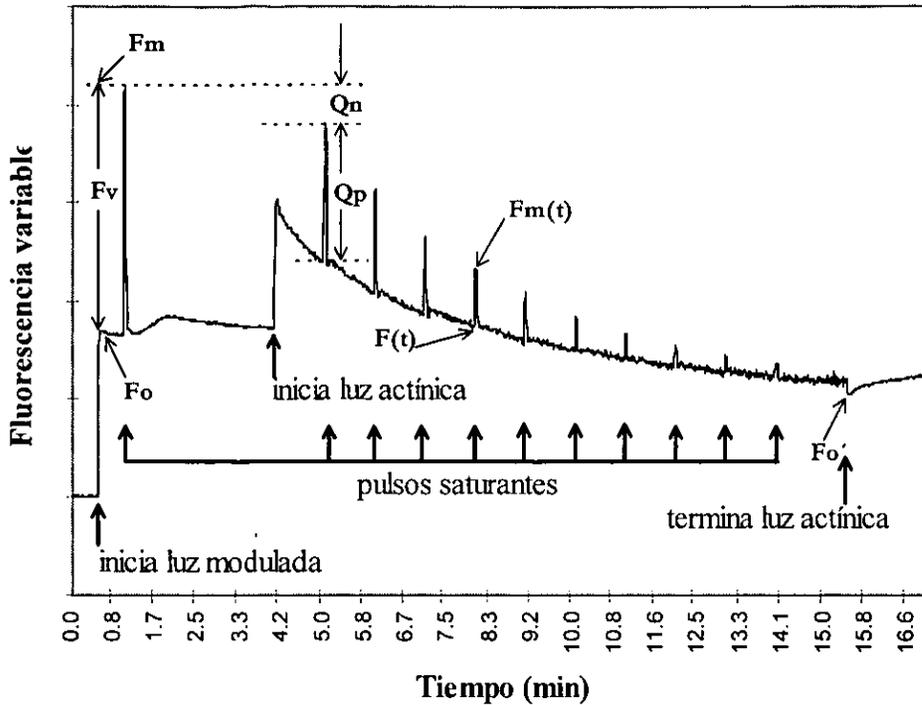
Un método para contrarrestar el problema es modular la fluorescencia a una frecuencia y amplitud determinada, precisamente este es el principio de operación del fluorómetro de amplitud modulada PAM (*Pulse Amplitud Modulated*). La modulación actúa como una forma de identificación para distinguir la fluorescencia de la radiación actínica de longitudes de onda similares reflejada desde la superficie de los organismos. El detector está diseñado de tal forma que sólo responda a la señal de fluorescencia modulada. La fuente de luz modulada se utiliza sólo para producir una señal de fluorescencia que pueda ser distinguida de otra radiación de longitudes de onda similares, y debe tener un mínimo efecto sobre la fotosíntesis y sobre las respuestas que interesa estudiar .

Así, con el PAM ha sido posible examinar más en detalle el funcionamiento de las membranas fotosintéticas cuando están activamente fotosintetizando (en estado estacionario). La fluorescencia causada por la luz actínica blanca no se mide directamente, pero las reacciones generadas por esta luz afectan la fluorescencia generada por la débil luz modulada. Estas reacciones son tan importantes como los cambios que éstas generan en la señal de fluorescencia modulada.

La sonda de luz modulada contiene un arreglo de siete diodos de luz amarilla de alta intensidad y un filtro de interferencia óptica con un pico de transmisión a los 585 nm. El fotodiodo del detector está protegido por un filtro que transmite luz solo en una banda cercana a 700 nm. La información que se obtiene de un fluorómetro PAM se muestra en la figura 4.2 y en la tabla 4.1. El análisis de la señal se ocupa más de la fase de desactivación

de la fluorescencia de la curva de inducción de Kautsky, en contraste con el fluorómetro de alta resolución temporal (PEA) enfocado al análisis de la fase rápida de la curva de inducción. La información que ofrece permite discriminar entre la fracción de la excitación capturada en el FSII que se (disipa o desactiva) por vías fotoquímicas, y la que lo hace por vías no fotoquímicas, es decir, que no será incorporada al proceso fotosintético sino que se disipará como calor. Los parámetros que se obtienen son:

(1) la cosecha cuántica máxima del FSII ( $F_v/F_m$ ), que se cuantifica después de adaptar a la oscuridad a los organismos fotosintéticos, lo cual garantiza que los centros de reacción del FSII se encuentren abiertos (los aceptores primarios oxidados) y la disipación de calor es mínima.  $F_v/F_m$  es una medida confiable de la cosecha cuántica potencial del FSII, la cual se ve disminuida por todos los efectos que causan inhibición de los centros de reacción e incremento en la disipación de calor. En este respecto la fotoinhibición es particularmente relevante. Tanto el incremento de  $F_o$  o el decremento de  $F_m$  pueden contribuir a un descenso de  $F_v/F_m$ . Mientras que un aumento de  $F_o$  indica un fotodaño, un decremento de  $F_m$  refleja una mayor pérdida de energía no radiativa (disipación de calor), la cual no necesariamente refleja daño irreversible, pero frecuentemente se puede considerar como una señal de fotoprotección.



**Fig. 4.2** Señal de fluorescencia de una muestra de dinoflagelados simbiotes en cultivo: *Symbiodinium* sp. aislados del coral *Pocillopora damicornis*, registrada por un fluorómetro de amplitud modulada, PAM Hansatech.

**Tabla 4.1** Ecuaciones para determinar diferentes parámetros derivados de la señal de fluorescencia registrada por un fluorómetro PAM.

<b>Eficiencia del fotosistema II</b>	
<b>Cosecha cuántica máxima</b>	<b>Cosecha cuántica efectiva</b>
$\frac{Fv}{Fm} = \frac{Fm - Fo}{Fm}$	$\frac{\Delta F}{Fm'} = \frac{Fm_{(t)} - Fo}{Fm_{(t)}}$
<b>Coefficientes de desactivación de la fluorescencia</b>	
<b>Fotoquímica</b>	<b>No fotoquímica</b>
$Qp = \frac{Fm_{(t)} - F(t)}{Fm_{(t)} - Fo}$	$Qn = \frac{Fm - Fm_{(t)}}{Fm - Fo} \quad NPQ = \frac{Fm - Fm_{(t)}}{Fm_{(t)}}$
<b>Tasa de transporte de electrones</b>	$ETR = \frac{\Delta Fm}{Fm'} * Absortancia * PAR \div 2$

- (2) la cosecha cuántica efectiva ( $\Delta F/F_m'$ ), que es la eficiencia de separación de carga en el fotosistema II en condiciones funcionales del aparato fotosintético, es decir, cuando el organismo está realizando fotosíntesis en estado estacionario a una determinada irradiancia;
- (3) la desactivación fotoquímica  $Q_p$ , es decir la fracción de la excitación que se disipa por vías fotoquímicas;
- (4) la desactivación no fotoquímica  $Q_n$ , que varía entre 0 y 1, y por último
- (5) la desactivación no fotoquímica NPQ, la cual puede asumir valores entre 0 y aproximadamente 10.

Las ecuaciones para determinar los parámetros  $Q_p$ ,  $Q_n$  y NPQ se indican en la tabla 4.1. El cálculo de NPQ se realizó aplicando la relación Stern-Vollmer (Bilger y Björkman 1990).

La tasa de transporte de electrones (ETR por sus siglas en inglés) es una función de la cosecha cuántica efectiva y de intensidad de luz actínica (Genty *et al.* 1989), y se consideró proporcional a la tasa de evolución de oxígeno, ya que se ha encontrado una correlación entre ellas de aproximadamente 1 (Pérez-Vivar, sin publicar). Se aplicó la relación  $ETR = \Delta F/F_m' * Absortancia * PAR/2$  (entre 2 porque se requieren dos fotones para mover un electrón, considerando un flujo de electrones lineal con un fotón destinado a cada fotosistema).  $\Delta F/F_m'$  es la cosecha cuántica efectiva; la absortancia considerada para los dinoflagelados dentro de su hospedero fué 0.865, determinada experimentalmente por Pérez-Vivar (sin publicar) a partir de espectros de absorbancia del coral intacto; PAR (*Photosynthetically Active Radiation*) es la intensidad de irradiancia actínica en  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , la cual se incrementa gradual y automáticamente para obtener con el fluorómetro de amplitud modulada la variación de la cosecha cuántica efectiva en función de la irradiancia.

Para una correcta estimación de los valores de fluorescencia  $F_o$  y  $F_m$  de una muestra “adaptada” a la oscuridad, en función de los cuales se calcula la desactivación fotoquímica y no fotoquímica (ver Anexo para la explicación de  $Q_p$  y  $Q_n$ ), se requiere mantener en una serie de mediciones sobre el organismo en estudio, la misma sensibilidad del detector, es decir los mismos parámetros ópticos, la intensidad de luz de medida y la ganancia; también se debe colocar la fibra óptica siempre en la misma posición y distancia con respecto al organismo cada vez que se realice la medición. Para monitorear la variación temporal de la

señal de fluorescencia es muy importante mantener en la misma posición la fibra óptica, ya que la fluorescencia detectada estará en función de la intensidad de la luz modulada que utiliza el fluorómetro y de la distancia entre el organismo y la fibra óptica del detector. Bilger *et al.* (1995) para determinar la desactivación no fotoquímica en hojas de *Fagus sylvatica* y *Cucurbita pepo* bajo condiciones de campo, utilizaron un soporte para la fibra óptica adaptado a la pinza que sostiene la muestra, diseñado para evitar el ensombrecimiento de la muestra por el sensor. Hasta la fecha no hay reportes de desactivación no fotoquímica en corales intactos que consideren esta restricción. Con el fin de poder obtener medidas confiables se ha diseñado un accesorio posicionador de acrílico para la fibra óptica que permite registrar la variación temporal de la señal de fluorescencia de un mismo punto de la superficie del coral, minimizando el efecto del ensombrecimiento de la fibra óptica sobre dicha superficie. Este accesorio se describe en la figura 4.3.

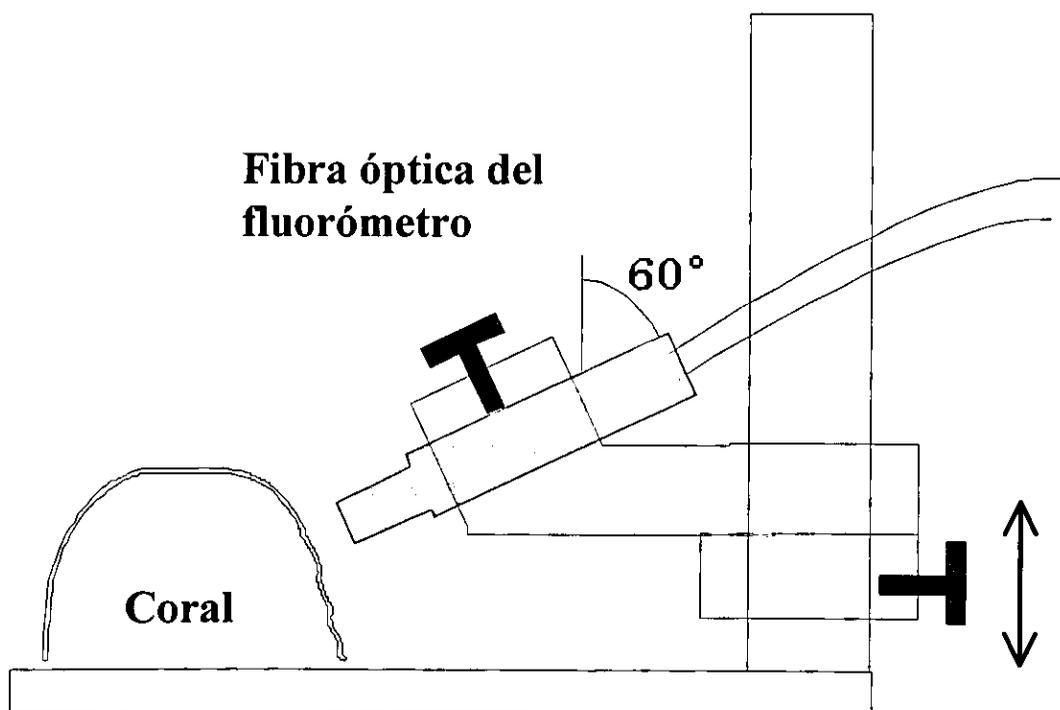


Fig. 4.3 Aparato posicionador para la fibra óptica del fluorómetro Diving-PAM.

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL

### 1ª PARTE

#### Localización del daño en el FSII por el aumento de la temperatura en dinoflagelados en cultivo

En esta parte se obtuvieron las curvas de inducción de la fluorescencia de la Chl *a* utilizando la técnica descrita por Schreiber *et al.* (1986) y por Strasser *et al.* (1995), con un fluorómetro portátil de alta resolución temporal. Dicho fluorómetro nos permitió examinar variaciones en las eficiencias cuánticas de las reacciones que se verifican en el FSII desde la separación de carga, en el centro de reacción, hasta la acumulación de electrones en la plastoquinona.

Se realizó una serie de experimentos utilizando células de dinoflagelados en cultivo aisladas de cuatro diferentes invertebrados: *Symbiodinium pulchrorum* Trench aislado de la anémona *Aiptasia pulchella* Calgren, de Hawaii; *S. corculorum* Trench aislado del bivalvo *Corculum cardissa* Linnaeus, de Belau; *S. pilosum* Trench y Blank, aislado del zoántido *Zoanthus sociatus* Ellis y Solander, de Jamaica; y *Symbiodinium* sp. aislado del coral *Pocillopora damicornis* Linnaeus.

Las células procedían de cultivos axénicos en medio ASP-8A (Blank 1987) a 23°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) y a 40  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz en un cuarto con un fotoperíodo 14:10 (luz:oscuridad), según el protocolo de Iglesias-Prieto *et al.* (1991). Se emplearon cultivos en la fase de crecimiento exponencial temprana para evitar posibles artefactos debidos al estado nutricional de los mismos.

Las alícuotas tomadas del cultivo correspondiente se llevaron a un volumen de 30 mL con una concentración de  $3 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> centrifugándolas a 1000xg durante 2 min, utilizando una centrífuga Marathon Mod. 22KBR. Posteriormente las células fueron expuestas durante 45 min a una serie de temperaturas experimentales, entre 25 y 40°C, con un incremento progresivo de 2°C. Los dinoflagelados se colocaron en dos cámaras, una de ellas en presencia de luz blanca fluorescente (60  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y otra en oscuridad. Cada una de las cámaras fue aireada y agitada con una pequeña bomba para acuario (*Elite* Mod. 801), para minimizar problemas asociados a la anareobiosis (Haldimann y Strasser 1999) y

a la limitación por CO<sub>2</sub>, para lo cual también se adicionó NaHCO<sub>3</sub> hasta una concentración final de 5 mM (Iglesias-Prieto *et al.* 1992). Como en esta parte se utilizaron células aisladas, cuyas condiciones de cultivo a una temperatura constante (23°C) no provocaron cambios en la eficiencia fotosintética de los dinoflagelados, no fué necesario mantener controles de las muestras a temperatura ambiente aparte de los cultivos.

La temperatura de las cámaras se controló ( $\pm 0.1^\circ\text{C}$ ) mediante un circulador de agua térmico (ISOTEMP Mod. 1006S *Fisher Scientific*). Después de la exposición de las células a cada temperatura se registró la señal de fluorescencia con un fluorómetro de alta resolución temporal (PEA). Las muestras (tres replicados de 300  $\mu\text{L}$ ) se colocaron en viales transparentes (1.1 mL de capacidad) de fondo plano y sin tapa, para realizar las mediciones a través de la parte inferior del vial. Cada vial se colocó dentro de un cilindro de acrílico opaco. Bajo este cilindro se adaptó el sensor del fluorómetro, para evitar interferencia con la luz ambiente (Fig. 4.1). Las muestras se “adaptaron” durante 5 min a la oscuridad antes de la medición de fluorescencia con el fin de relajar los centros de reacción.

## 2ª PARTE

### **Estimación de la sensibilidad térmica de dinoflagelados simbiotes en corales intactos y su variación interespecífica**

En esta segunda serie de experimentos se analizaron las respuestas de varias especies de dinoflagelados simbiotes dentro de sus hospederos intactos ante exposiciones breves (45 min), a temperaturas gradualmente elevadas.

Las determinaciones de la señal de fluorescencia en corales intactos se realizaron utilizando un fluorómetro de luz modulada sumergible (*Pulse Amplitude Modulated Underwater Fluorometer*) Walz Modelo: *Diving-PAM* No. Serie 0131 *Mess-und Regeltechnik* de Alemania.

Se colectaron muestras de 15 especies de invertebrados (13 especies de corales, un hidrocoral y un zoántido), con buceo autónomo en el Arrecife de Puerto Morelos (Tabla 4.2). Posteriormente a la colecta se mantuvieron las muestras por lo menos 24 horas en los acuarios de la estación a temperatura ambiente, no detectándose cambios en la cosecha cuántica máxima de los dinoflagelados simbiotes en los hospederos intactos, por lo que

no se consideró necesario el control para las muestras durante los experimentos. Se tomó una muestra (aprox. 8 cm de diámetro) de tres colonias diferentes para cada especie, se dividió cada muestra en tres réplicas. Una de ellas se colocó en una cámara oscura (se pintaron sus paredes con pintura opaca) y otra en una cámara transparente bajo luz subsaturante ( $60 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) suministrada con 4 lámparas de luz blanca de 9 W. Ambas cámaras son de acrílico y sus dimensiones son 33 x 33 x 15 cm (Figs. 4.4 y 4.5).

Las temperaturas experimentales variaron entre 27 y 40°C, con incrementos de 1°C cada 45 min. El control de la temperatura del agua de mar utilizada en los experimentos se realizó por medio de un recirculador de agua eléctrico *Forma Scientific* y dos calentadores de acuario *Thermal Compact Askoll* de 300 watts. El agua de mar se hizo circular por las cámaras utilizando 3 bombas *Little Giant Pump Company*. A las dos cámaras se les suministró aire con una bomba para acuario *Elite 801* con una presión de 4.0 psi. La medición de fluorescencia con el fluorómetro de amplitud modulada sumergible (PAM), se realizó sobre el coral intacto y después de estar expuesto éste durante 45 min a cada temperatura. Las muestras se mantuvieron fijas a la base de acrílico con una pieza ajustable (Fig. 4.3) y que permitió colocar la fibra óptica en cada medición siempre en la misma posición y a la misma distancia sobre el coral, formando un ángulo vertical de 60° para evitar el ensombrecimiento en el caso de las muestras expuestas a luz subsaturante.

La tercera réplica de la muestra se utilizó para extraer los dinoflagelados simbioses con Water pik y agua de mar filtrada (*millipore* 0.45 $\mu\text{M}$ ), centrifugando (1000xg durante 2 min) y resuspendiendo, también con agua de mar filtrada, hasta obtener las células libres de tejido animal. Finalmente se resuspendieron en 1 mL de solución de preservación de DNA [20 % dimetil sulfóxido, 0.25 M EDTA saturado con NaCl (Seutin *et al.* 1991 en Baker y Rowan 1997)] para su posterior amplificación con la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Las muestras de algas tanto recién aisladas como mantenidas en cultivo fueron enviadas a la Universidad de Santa Bárbara (California) para la determinación de su filotipo por Lajeunesse (sin publicar), de acuerdo al método descrito por Rowan y Powers (1991).

Los parámetros que se consideraron para comparar sensibilidad térmica fueron: (1) la cosecha cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) obtenida en las mediciones de fluorescencia realizadas

sobre las muestras mantenidas en la oscuridad; y (2) la cosecha cuántica efectiva ( $\Delta F/F_m'$ ), de las muestras expuestas a luz subsaturante. Los resultados que se presentan son el promedio de tres réplicas de cada especie. La variación de la cosecha cuántica se utilizó de indicador del estado físico de la membranas fotosintéticas, y se consideró la fusión de las membranas a la temperatura crítica en que la cosecha cuántica descendió al 50% (temperatura crítica- $T_{c50}$ ).

**Tabla 4.2** Especies de invertebrados, las cuales todas presentan dinoflagelados simbioses *Symbiodinium sp.* Se indica la profundidad a la cual se colectaron, entre paréntesis la profundidad en la que comúnmente se desarrollan; y las condiciones de luz del ambiente del hospedero PFD (*Photon Flux Density*).

Hospedero	Ambiente del hospedero	
	Profundidad	PFD
<i>Acropora palmata</i> Lamarck	1 m (somero)	alto
<i>Porites astreoides</i> Lamarck	2.5 m (somero)	alto
<i>Diploria strigosa</i> Dana	5 m (variable)	variable
<i>Montastraea faveolata</i> Ellis y Solander	4 m (variable)	variable
<i>Eusmilia fastigiata</i> Pallas	4 m (variable)	variable
<i>Favia fragum</i> Esper	2.5 m (somero)	alto
<i>Millepora complanata</i> Linnaeus	1.5 m (somero)	alto
<i>Isophyllia sinuosa</i> Ellis y Solander	2 m (variable)	variable
<i>Manicina areolata</i> Linnaeus	2.5 m (somero)	alto
<i>Diploria clivosa</i> Ellis y Solander	4 m (variable)	variable
<i>Palythoa caribaeorum</i> Duch. y Mich.	2.5 m (somero)	alto
<i>Montastraea cavernosa</i> Linnaeus	4 m (variable)	variable
<i>Agaricia agaricites</i> Linnaeus	2 m (variable)	variable
<i>Siderastrea siderea</i> Ellis y Solander	4 m (variable)	variable
<i>Siderastrea radians</i> Pallas	2 m (somero)	alto

### 3ª PARTE

#### **Análisis de la posible relación sinérgica entre los efectos de la temperatura y la irradiancia**

Se determinó la variación de la cosecha cuántica efectiva de la fluorescencia de una especie de dinoflagelado simbiote en cultivo, y tres especies de dinoflagelados simbiotes dentro de sus hospederos intactos sometidos a diferentes temperaturas y a diferentes intensidades de luz actínica. Para el primer caso se utilizó el fluorómetro de luz modulada PAM (*Dual Channel Modulated Fluorimeter*) Hansatech Tipo: MFMS No. Serie 9506, de Kings Lynn, Inglaterra. Para el segundo, corales intactos, se utilizó el fluorómetro sumergible *Diving-PAM* Walz.

#### **Experimentos con *Symbiodinium sp.* (de *Pocillopora damicornis*) en cultivo:**

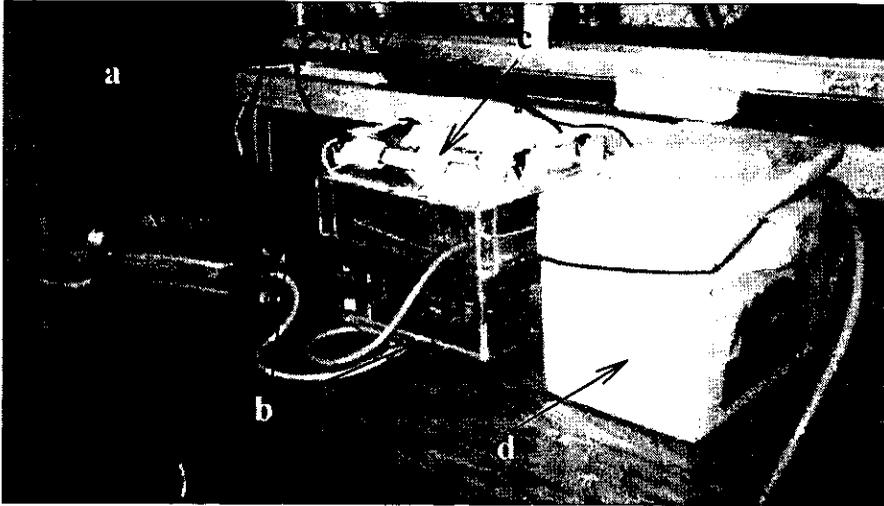
Para las mediciones de fluorescencia se colocó la muestra, con una densidad de  $3 \times 10^6$  cél/mL, en una celda de 3 mL, situada dentro de una cámara de acrílico (6 x 6 x 6 cm) que se diseñó de manera que fué posible acoplar las lámparas actínica y saturante, así como la de la luz modulada y el detector de fluorescencia (Figs. 4.6 y 4.7). La celda experimental estaba a la vez rodeada por agua a temperatura controlada. La muestra durante la medición se mantuvo homogénea con un agitador magnético. La señal de fluorescencia registrada permitió determinar: la cosecha cuántica máxima, la cosecha cuántica efectiva y la desactivación no fotoquímica de la fluorescencia, aplicando la técnica descrita por Schreiber *et al.* (1986). Las muestras fueron mantenidas durante 45 min y en condiciones de oscuridad a cada temperatura experimental, al término de la cual se aplicaron diferentes intensidades de luz actínica (35, 45, 60, 90, 125, 170, 230, 385 y 535  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), durante un minuto cada una, determinando mediante un pulso de luz saturante, la cosecha cuántica efectiva a cada intensidad de luz.

#### **Experimentos con corales intactos:**

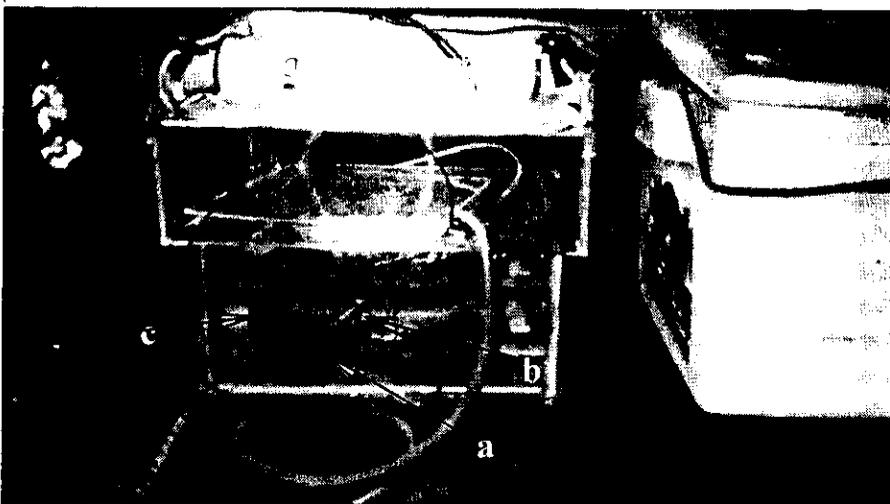
Se examinaron tres especies, *Porites astreoides* (colectada en la laguna arrecifal de Puerto Morelos a 2 m de profundidad), *Diploria strigosa* y *D. clivosa* (ambas colectadas en la Bocana Norte del Arrecife de Puerto Morelos a 5.0 m de profundidad).

Se colectaron muestras (aprox. 8 cm de diámetro cada una) con buceo autónomo, de tres colonias de cada especie. De cada colonia, una fracción se colocó en condiciones de oscuridad y otra bajo luz subsaturante a  $60 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , excepto para *D. strigosa* que sólo se mantuvo bajo luz subsaturante. Las muestras se expusieron a las diferentes temperaturas con exposiciones de 45 min cada una. Para estos experimentos se utilizaron las mismas cámaras de acrílico descritas en la segunda parte experimental. Las mediciones de fluorescencia se registraron con el fluorómetro *Diving-PAM*, del cual se obtuvieron curvas de cosecha cuántica efectiva para diferentes intensidades de luz actínica (57, 185, 380, 695, 1000, 1370, 2000, 2691  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a cada temperatura, además de que se calculó la desactivación no fotoquímica y la tasa de transporte de electrones.

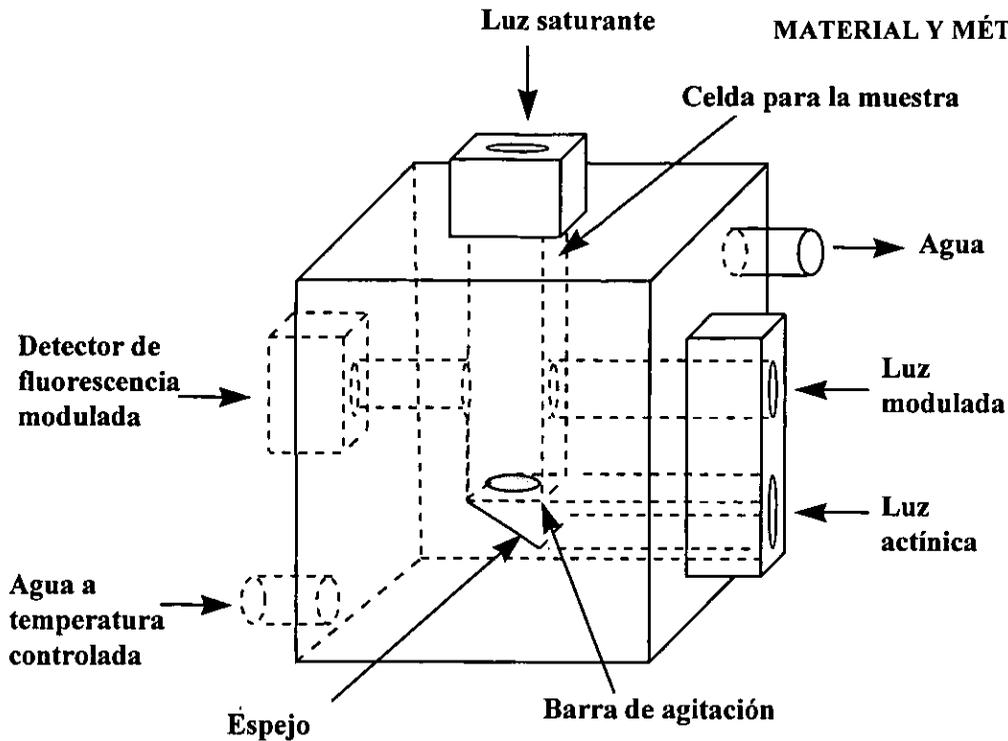
Muestras del coral *Porites astreoides* se mantuvieron a 33°C durante 9 horas, colocando seis réplicas en cada tratamiento, unas en condiciones de oscuridad y otras bajo luz subsaturante, y se registró la señal de fluorescencia después de cada hora.



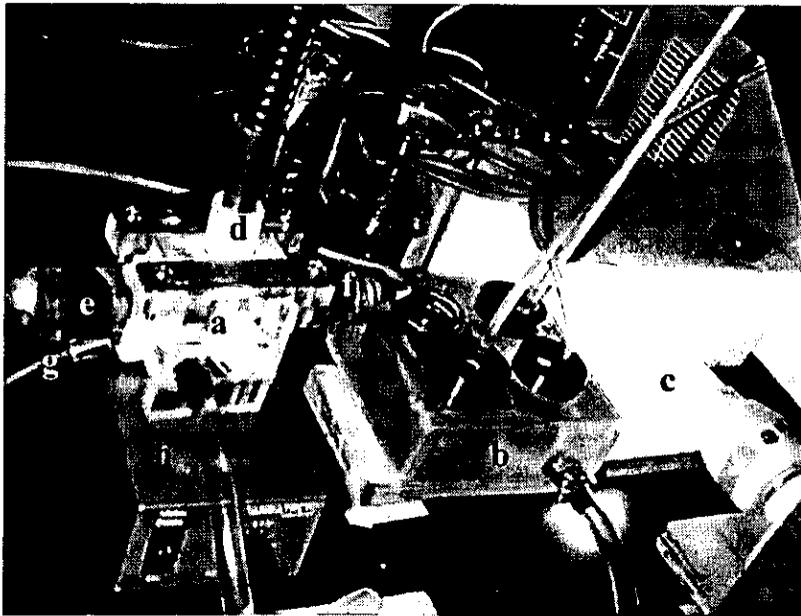
**Fig. 4.4** Mesa de experimentos donde se expusieron las muestras de coral a diferentes temperaturas. (a) fluorómetro Diving-PAM, (b) cámaras de acrílico para las muestras en oscuridad (a la izquierda) y luz (a la derecha), (c) lámparas de luz subsaturante, (d) recirculador de agua de mar a temperatura controlada.



**Fig. 4.5** Cámara de acrílico donde se expusieron las muestras de coral a las diferentes temperaturas bajo luz subsaturante. (a) muestra de coral, (b) fibra óptica del fluorómetro, (c) bomba de agua.



**Fig. 4.6** Diagrama de la cámara de acrílico utilizada en la medición de la señal de fluorescencia de muestras de dinoflagelados simbiotes aislados del coral, en cultivo, registrada con el fluorómetro PAM de Hansatech.



**Fig. 4.7** Instalación del equipo para la medición de fluorescencia en dinoflagelados simbiotes aislados, con el fluorómetro PAM de Hansatech. (a) cámara de acrílico con celda para la muestra a temperatura controlada, (b) cámaras de acrílico para mantener las muestras a temperatura controlada y en condiciones de oscuridad (a la izquierda) y luz (a la derecha), (c) lámpara de luz subsaturante, (d) fibra óptica de la lámpara de luz saturante, (e) fuente de luz modulada, (f) detector de fluorescencia modulada, (g) fibra óptica de la lámpara de luz actínica, (h) agitador magnético.

## V. RESULTADOS

### 1ª PARTE

#### Señales de daño en el fotosistema II

Las curvas de inducción de fluorescencia de las cuatro especies de dinoflagelados en cultivo examinadas, mostraron una secuencia polifásica (O-J-I-P) ya descrita por Iglesias-Prieto (1997). En general las curvas inducción de fluorescencia mostraron un aumento secuencial del evento J que ocurre aproximadamente a los 0.9 ms, en función del incremento en la temperatura, tanto en las muestras mantenidas en la oscuridad como en la luz (Fig. 5.1).

#### Exposiciones de 15 min

Los experimentos con exposiciones de 15 min se realizaron con dos especies, *S. pilosum* y *S. pulchrorum*, pertenecientes a los filotipos A y B respectivamente (Rowan y Powers 1991). Las muestras se mantuvieron durante 15 min en oscuridad a las temperaturas experimentales entre 25 y 42°C.

En el caso de *S. pilosum*, (Fig. 5.1) el evento J de las curvas de inducción aumentó secuencialmente en función de la temperatura, siendo muy evidente en la curva obtenida a los 39°C. La fase I-P se mantiene aproximadamente constante hasta los 38°C, y comienza a descender a las temperaturas mas altas por la presencia de un fuerte desactivador (*quencher*) de la fluorescencia.

En las células de *S. pulchrorum* se presentó un patrón en las curvas de inducción (Fig. 5.1) similar al de *S. pilosum*, con un aumento en el evento J, y la presencia de un desactivador de fluorescencia desde los ~8 ms en la curva correspondiente a 40°C. La fase I-P se mantuvo aproximadamente constante hasta antes de los 39°C que es donde se inicia un descenso secuencial en la fluorescencia hasta los 42°C.

Cabe señalar que en ambos casos se obtuvieron a altas temperaturas curvas de inducción con demasiado ruido, por lo que para facilitar el análisis se realizó un “suavizado” con promedios corridos cada 5 datos.

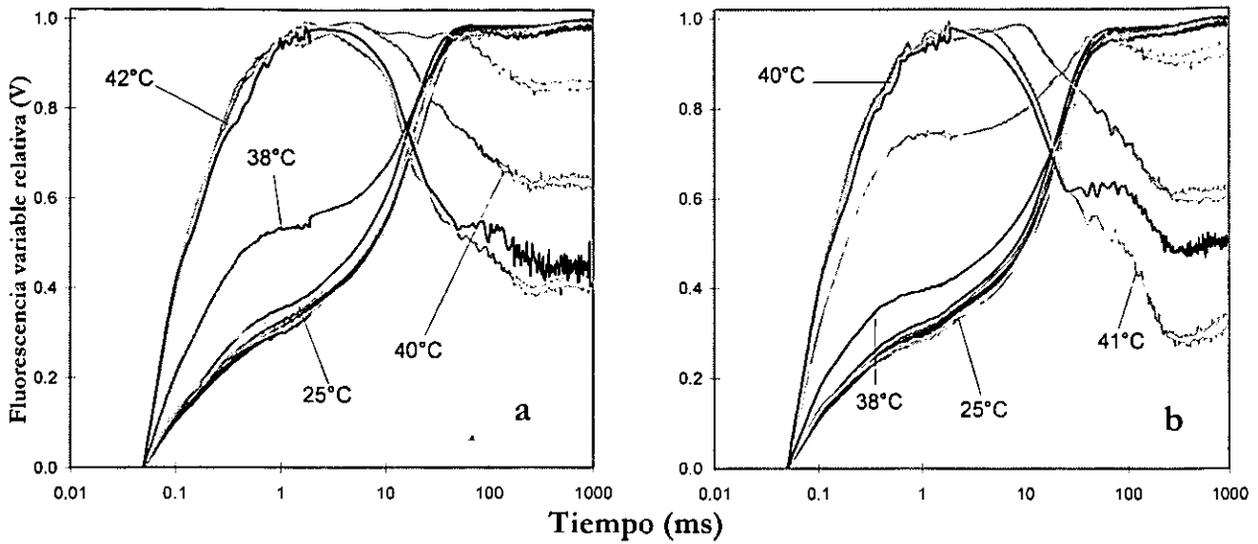
La fluorescencia a los 0.9 ms, punto  $V(j)=[F(t)-F_0]/(F_m-F_0)$ , en función de la temperatura, mostró un comportamiento muy similar en ambas especies (Fig. 5.2a). Aún cuando a los 38°C en ambos casos se incrementó  $V(j)$ , y que este aumento fue dos veces mayor en *S. pilosum* que en *S. pulchrorum*, el comportamiento indica que no hubo diferencias significativas entre las dos especies. Precisamente en *S. pilosum* se observó que  $V(j)$  relativa llegó a sus valores máximos a los 39°C sin variación adicional hasta los 42°C. En el caso de *S. pulchrorum* los valores máximos de  $V(j)$  se presentaron hasta los 40°C.

Por otra parte, la variación de  $F_v/F_m$ , en las dos especies al aumentar la temperatura fué muy similar (Fig. 5.2b). Las muestras de *S. pilosum* mostraron un descenso secuencial dependiente de la temperatura a partir de los 33°C, pero aún más drástico entre los 37 y 39°C (Fig. 5.3a). La variación del área sobre la curva de inducción relativa, la cual siguió un patrón muy irregular y no asociado a la variación de  $F_v/F_m$ . El área sobre las curvas de inducción normalizadas si mostró, sin embargo, un descenso en paralelo al de  $F_v/F_m$  con el aumento de la temperatura (Fig. 5.3b). Esta área sobre la curva se asume proporcional a la capacidad de transporte de electrones en el fotosistema II (Iglesias-Prieto 1997). Los datos de *S. pulchrorum* presentan un descenso drástico de  $F_v/F_m$  entre 38 y 40°C (Fig. 5.2b); el patrón de los datos de área sobre la curva de inducción junto con los de  $F_v/F_m$ , fue muy similar al que presentó *S. pilosum* (no se muestran).

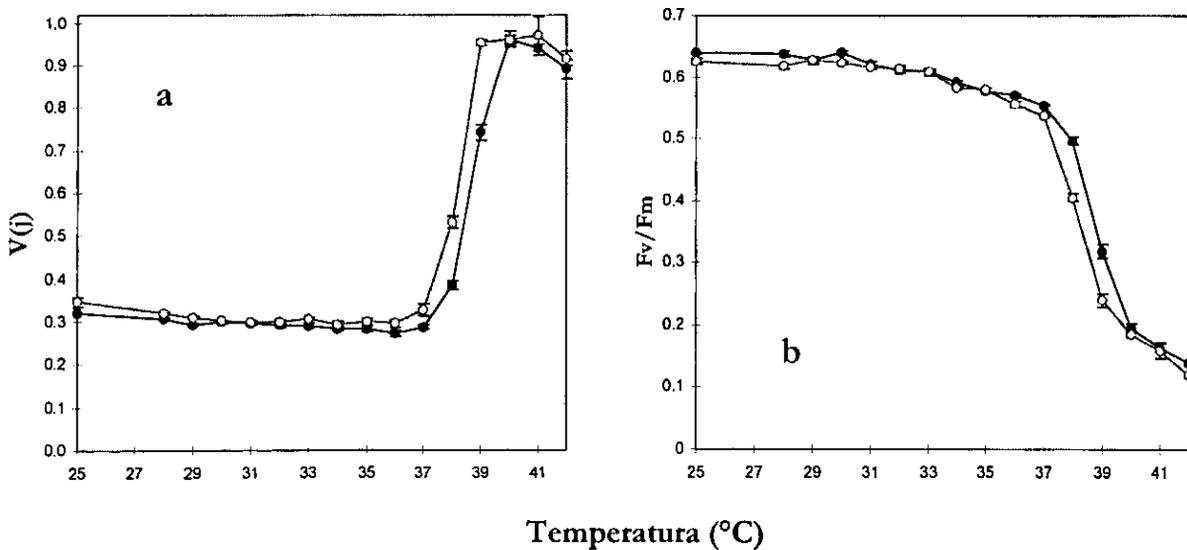
Para las dos especies *S. pilosum* y *S. pulchrorum*, las reducciones de  $F_v/F_m$  observadas al aumentar la temperatura, son resultado principalmente de la disminución de  $F_m$  puesto que apenas se observan variaciones en  $F_0$  a temperaturas menores de 38°C. Para exposiciones mayores a 38°C que coincide con la caída drástica de  $F_v/F_m$  si se observó un aumento de  $F_0$  junto a la disminución de  $F_m$ . Estos resultados son similares a los obtenidos por Iglesias-Prieto (1997).

### **Exposiciones de 45 min**

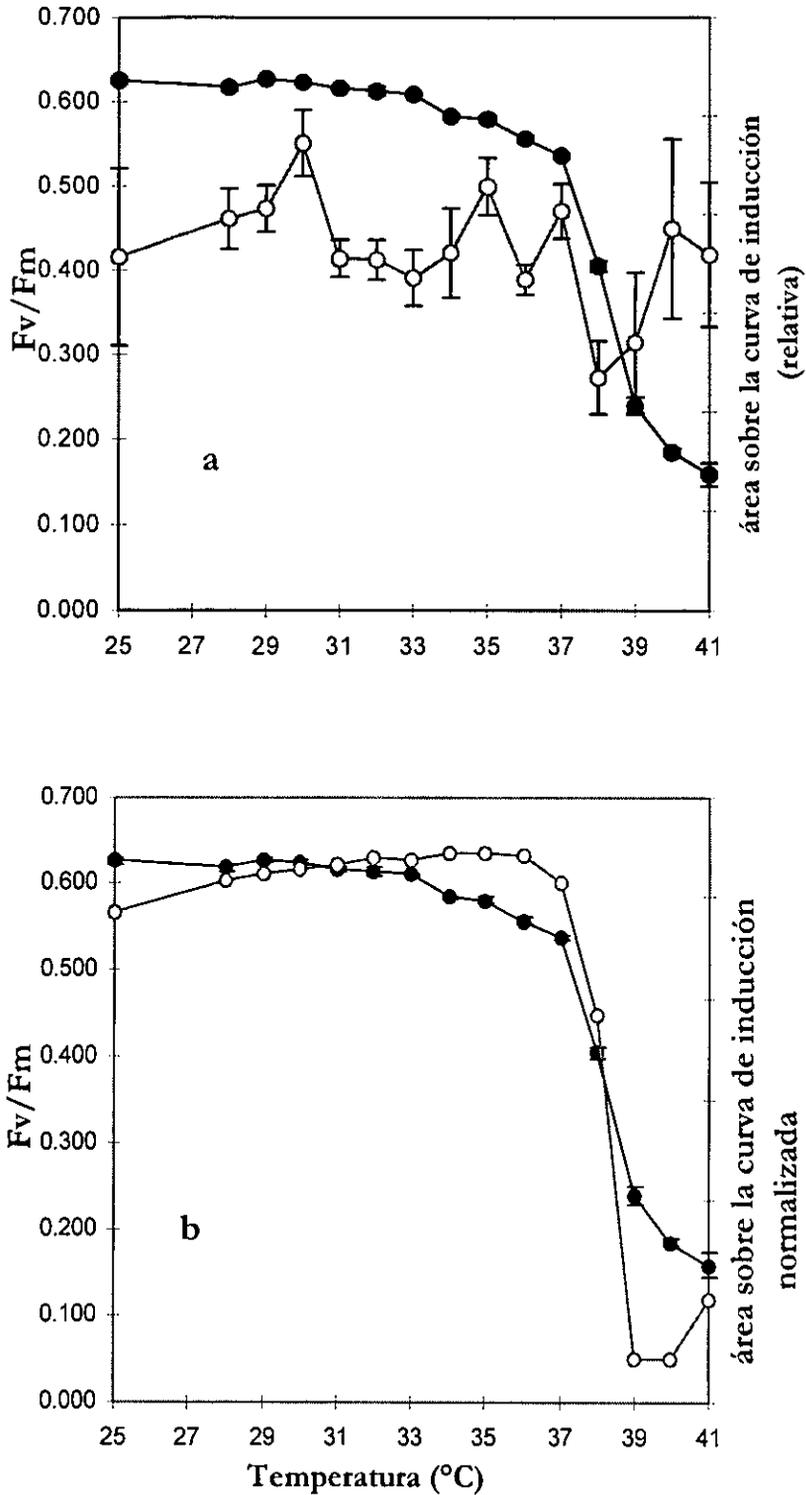
Los experimentos se realizaron con las siguientes cuatro especies de dinoflagelados simbioses en cultivo pertenecientes a los filotipos que se indican entre paréntesis: *S. pilosum* (A), *S. corculorum* (A), *S. pulchrorum* (B) y *Symbiodinium* sp. (B) de *Pocillopora*



**Fig. 5.1** Curvas de inducción de fluorescencia variable relativa de dinoflagelados en cultivo: **a)** *Symbiodinium pilosum*, **b)** *S. pulchrorum*, expuestos durante 15 min a temperaturas experimentales (25, 28-42°C) y mantenidos en oscuridad, n=5.



**Fig. 5.2** Variaciones de **a)** fluorescencia variable relativa a los 0.9 ms [ $V(j)$ ] y **b)** cosecha cuántica máxima de separación de carga del FSII ( $F_v/F_m$ ), en función de la temperatura después de exposiciones de 15 min en oscuridad, de *S. pilosum* (círculos claros) y de *S. pulchrorum* (círculos oscuros), n=5. En cada punto se indica el error estándar.



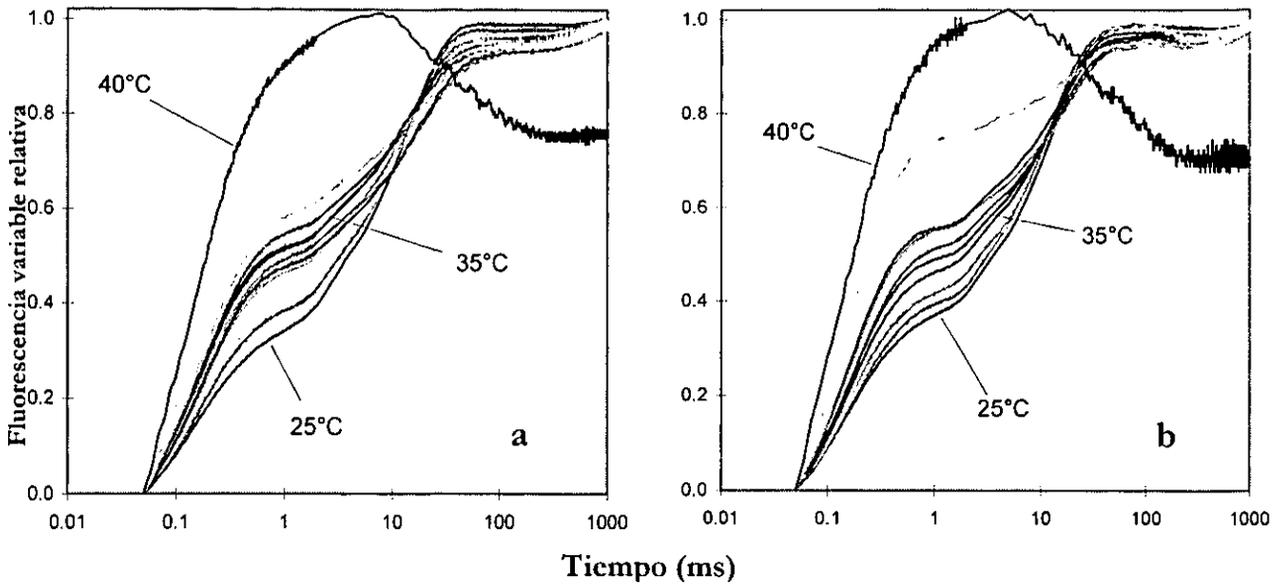
**Fig. 5.3** Variaciones de la cosecha cuántica máxima de la separación de carga en el FSII  $F_v/F_m$  (círculos oscuros) y del área sobre la curva de inducción (círculos claros) en función de la temperatura con exposiciones de 15 min, en muestras de *S. pilosum* en oscuridad,  $n=5$ . **a)** área sobre la curva de inducción de fluorescencia (unidades arbitrarias/tiempo), **b)** área sobre la curva de inducción normalizada a 1.

*damicornis*. Las células se expusieron a distintas temperaturas experimentales durante 45 min, tanto en oscuridad como a luz subsaturante ( $60 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Las mediciones de fluorescencia se realizaron con el fluorómetro de alta resolución temporal PEA.

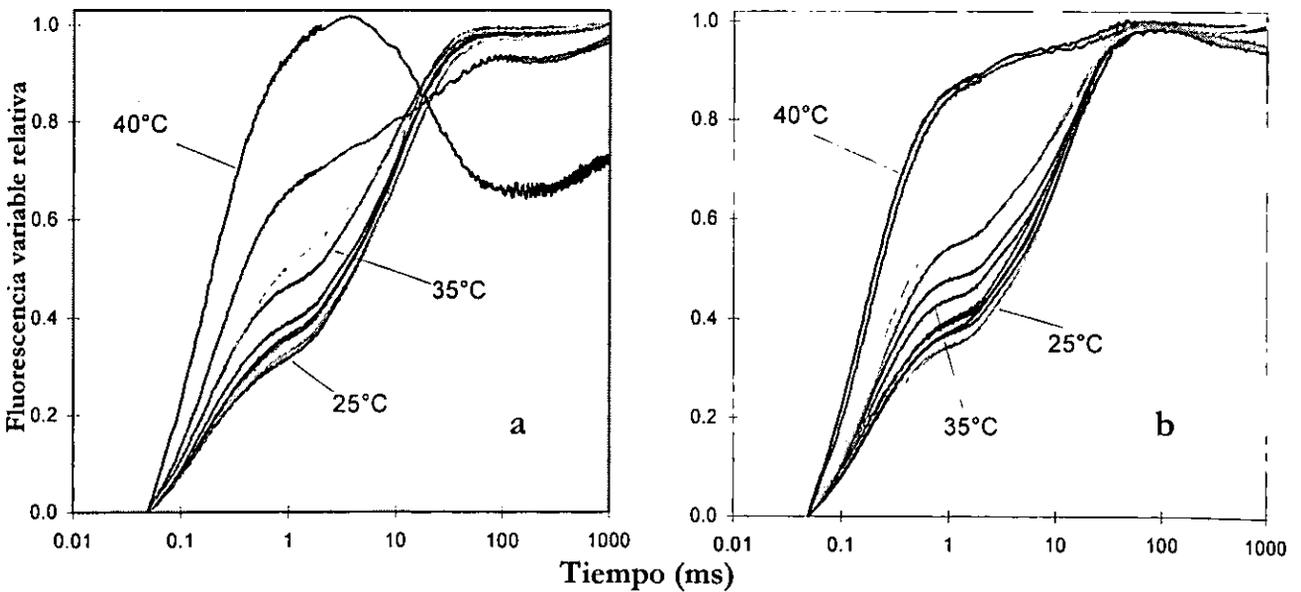
En *S. pilosum* la respuesta en las curvas de inducción a los tratamientos en oscuridad y con luz subsaturante fue muy similar (Fig. 5.4). Ambas curvas presentaron un aumento secuencial de la fluorescencia variable relativa, siendo el aumento relativo del evento J el más significativo pues las fases I-P se mantienen casi constantes a excepción de las curvas a  $40^\circ\text{C}$ .  $V(j)$  aumentó notablemente a partir de los  $38^\circ\text{C}$  en el tratamiento de oscuridad (Fig. 5.8a) y en el caso del tratamiento con luz fueron ligeramente mayores los niveles de  $V(j)$  a partir de los  $36^\circ\text{C}$ . Sólo a  $40^\circ\text{C}$  aparece la caída de la fluorescencia en la fase I-P. A esta temperatura se observó una disminución de la señal de fluorescencia a partir de los 8-9 ms, sólo explicable por la aparición de un desactivador o “quencher” de la señal.

Las muestras de *S. pulchrorum* mantenidas en oscuridad (Fig. 5.5a) también mostraron el mismo patrón de variación, aunque el aumento de la señal de fluorescencia fue más rápido, presumiéndose la formación de otro evento anterior a J, denominado K, como parte de la señal. El máximo que presentó la curva a  $40^\circ\text{C}$  estaría compuesto por los dos eventos K y J. En las células expuestas a luz subsaturante sólo se observó el aumento del evento J (Fig. 5.5b), que no llegó nunca a alcanzar valores máximos a 1, pero no se observó la aparición del desactivador de fluorescencia y por tanto, una caída en la señal. El valor de  $V(j)$  a los  $37^\circ\text{C}$  disminuyó en un 25% con respecto al valor observado a  $35^\circ\text{C}$  (Fig. 5.8b), para volver a incrementarse a temperaturas mayores de  $37^\circ\text{C}$ . El incremento de  $V(j)$  en las muestras iluminadas con luz subsaturante fué continuo desde los  $35^\circ\text{C}$ .

Las muestras de *S. corculorum* mantenidas en oscuridad mostraron el patrón normal de incremento de la fluorescencia variable relativa del evento J, al aumentar la temperatura, iniciándose este aumento a partir de los  $38^\circ\text{C}$ , pero los valores a  $40^\circ\text{C}$  estuvieron entre los menores de los obtenidos para las cuatro especies examinadas [ $V(j) < 0.8$ ] (Fig. 5.6a). Las muestras adaptadas a luz subsaturante mostraron valores más altos de  $V(j)$  con incrementos significativos desde los  $35^\circ\text{C}$  y una fuerte caída a partir de los  $38^\circ\text{C}$  (Fig. 5.6b), comportamiento que no sólo lo presentó esta especie. Estas células nunca mostraron valores de  $V(j)$  superiores a 1, ni mostraron una clara caída de la señal de fluorescencia por la



**Fig. 5.4** Curvas de inducción de fluorescencia variable relativa  $[V(t)]$  de *S. pilosum* en cultivo, expuestas por 45 min a las temperaturas experimentales (25, 27, 29, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40°C). Cada curva representa el promedio de 3 réplicas. **a)** muestras mantenidas en oscuridad, **b)** muestras expuestas a luz subsaturante .



**Fig. 5.5** Curvas de inducción de fluorescencia variable relativa  $[V(t)]$  de *S. pulchrorum* en cultivo, expuestas por 45 min a las temperaturas experimentales (25, 27, 29, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40°C). Cada curva representa el promedio de 3 réplicas. **a)** muestras mantenidas en oscuridad, **b)** muestras expuestas a luz subsaturante.

aparición de un desactivador o “*quencher*” (Fig. 5.8c). Se observó una pequeña disminución de  $V(t)$  a partir de los 10 ms, a 35°C. En ambos casos, oscuridad y luz subsaturante, la fase I-P se mantuvo casi constante.

*Symbiodinium* sp. aislado de *Pocillopora damicornis* presentó un patrón similar al de *S. pulchrorum* con una disminución de la fluorescencia variable relativa a 40°C en las muestras mantenidas en oscuridad (Fig. 5.7a). La fase I-P no mostró cambios hasta antes de los 39°C. Las células expuestas a luz subsaturante sólo presentaron un aumento en el evento J, manteniendo la fase I-P constante (Fig. 5.7b). Dicho aumento fue mayor a partir de los 35°C para las muestras expuestas a luz subsaturante, mientras que las muestras mantenidas en oscuridad no mostraron un claro aumento hasta los 39°C (Fig. 5.8d).

En la tabla 5.1 se muestra un resumen de los cambios de  $V(j)$  en estas cuatro especies de dinoflagelados simbioses.

Al comparar los efectos de los diferentes tiempos de exposición (15 y 45 min) a las temperaturas experimentales sobre *S. pulchrorum* y *S. pilosum* mantenidas en oscuridad, se observó que el aumento de  $V(j)$  fue mayor para *S. pilosum* expuesto durante más tiempo a altas temperaturas (Fig. 5.9a). El aumento secuencial de  $V(j)$  en las células expuestas durante 45 min a alta temperatura empieza desde los 29°C, mientras que en las expuestas por solo 15 min,  $V(j)$  se mantiene constante hasta los 38°C. Por otra parte, en *S. pulchrorum* se encontraron diferencias sólo entre los 33 y 39°C (Fig. 5.9b), siendo la mayor diferencia a los 35°C donde  $V(j)$  en las expuestas durante 45 min aumentó al 50% de la alcanzada a 40°C. Es importante señalar que en ambos casos el nivel de  $V(j)$  a los 33°C con exposiciones de 45 min fué muy cercano al nivel de  $V(j)$  a los 38°C con exposiciones de 15 min.

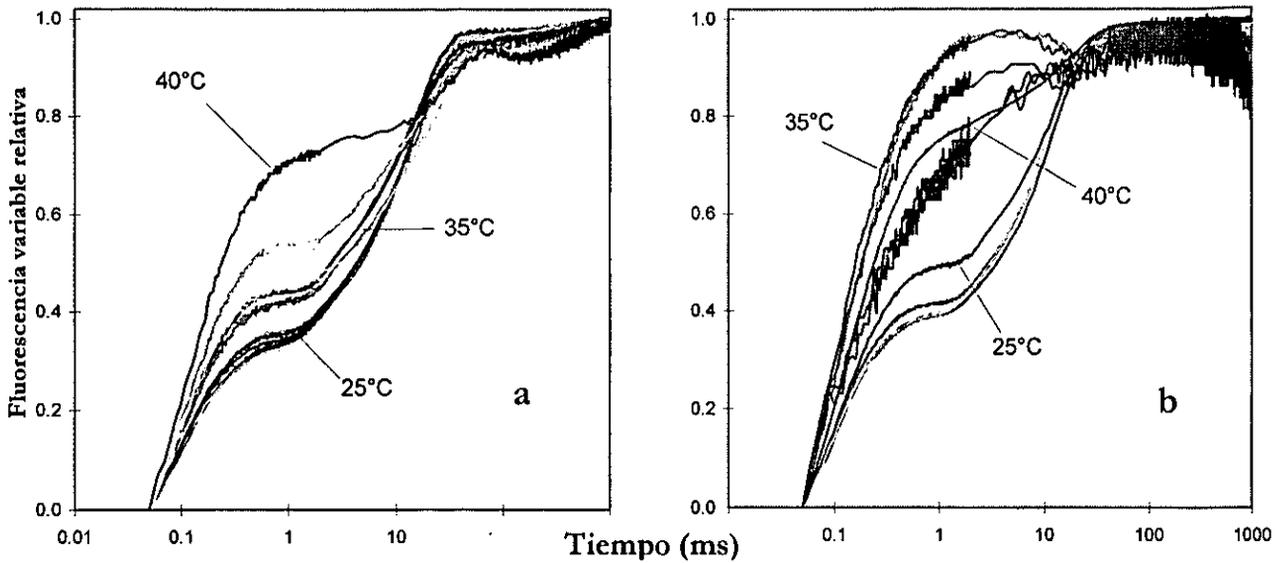
La figura 5.10 muestra las variaciones en la cosecha cuántica máxima  $F_v/F_m$  relativa en función de la temperatura, para las cuatro especies de dinoflagelados en cultivo examinados, tanto en oscuridad como expuestas a luz subsaturante. Para cada especie,  $F_v/F_m$  mostró un descenso secuencial en ambos tratamientos (oscuridad y luz) al aumentar la temperatura, siendo más pronunciado en las muestras mantenidas en oscuridad (Fig.

5.10a). La temperatura promedio a la cual se inició el descenso de Fv/Fm (Ti), en la oscuridad fué 32°C y en la luz 33°C. La temperatura promedio a la cual Fv/Fm disminuyó un 50 % (Tc<sub>50</sub>) del valor inicial, fué 39°C en la oscuridad y 38°C en la luz. La especie que mostró mayor sensibilidad en la oscuridad al aumento de temperatura fué *S. pilosum* (Ti=31°C y Tc<sub>50</sub>=38.5°C), mientras que la más resistente también en la oscuridad, fué *Symbiodinium* sp. (Ti=35°C y Tc<sub>50</sub>=40°C). Por otra parte, en la muestras mantenidas bajo luz subsaturante (Fig. 5.10b), la especie más sensible fué también *S. pilosum* (Ti =31°C y Tc<sub>50</sub>=39°C) y la más resistente *Symbiodinium* sp. (Ti=35°C y Tc<sub>50</sub>=40°C). Esta última indudablemente fué la especie que mostró una menor sensibilidad a la temperatura, como se refleja en la curva de variación de Fv/Fm, cuyos valores siempre estuvieron por encima de los de las otras tres especies tanto en oscuridad como en luz subsaturante (Fig. 5.10).

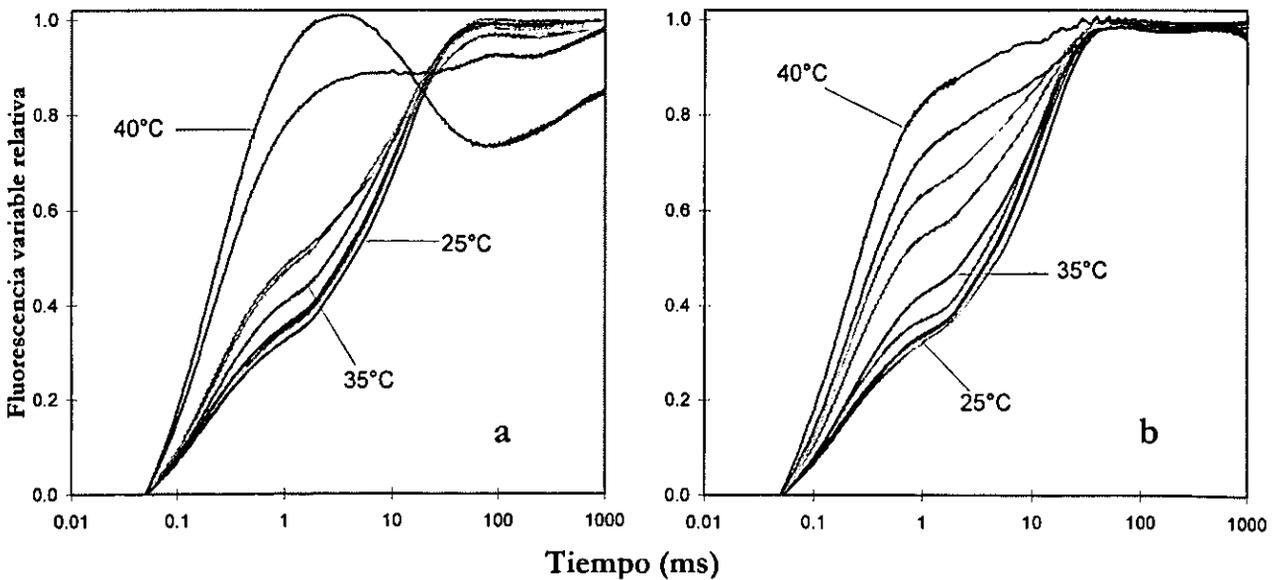
**Tabla 5.1** Características principales de las curvas de inducción de fluorescencia de cuatro especies de dinoflagelados simbioses en cultivo.

Dinoflagelados simbioses	Presencia de desactivador de fluorescencia		Valores de V(j) = 1	
	oscuridad	luz	oscuridad	luz
<i>S. pilosum</i> (A) ♦	Si	Si	No	Si
<i>S. pulchrorum</i> (B) ♦	Si	No	No	Si
<i>S. corculorum</i> (A) *	No	No	Si	Si
<i>Symbiodinium</i> sp. (B) *	Si	No	No	Si

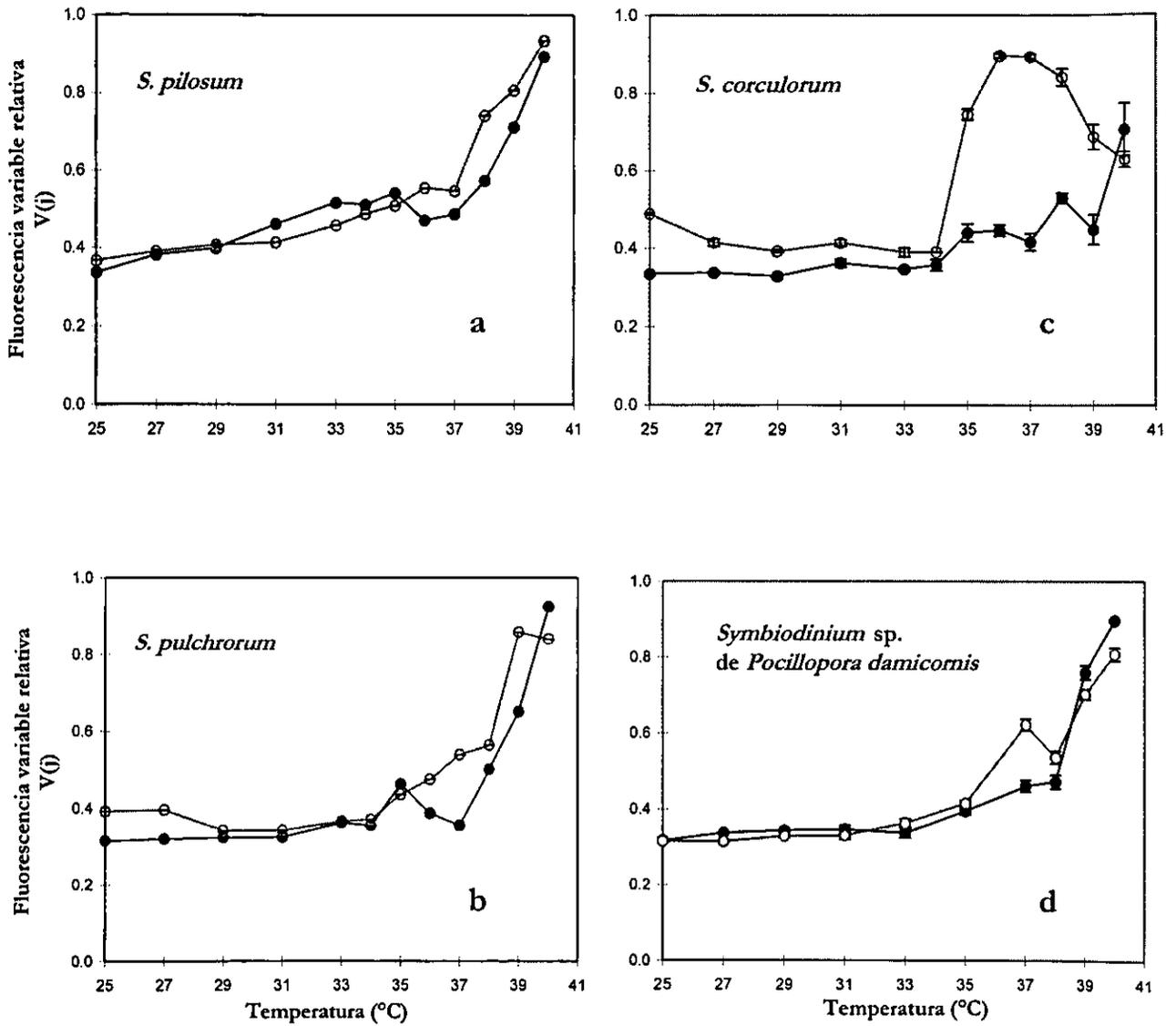
Las literales entre paréntesis indican los filotipos (♦Rowan y Powers 1991, \*LaJeunesse sin publicar).



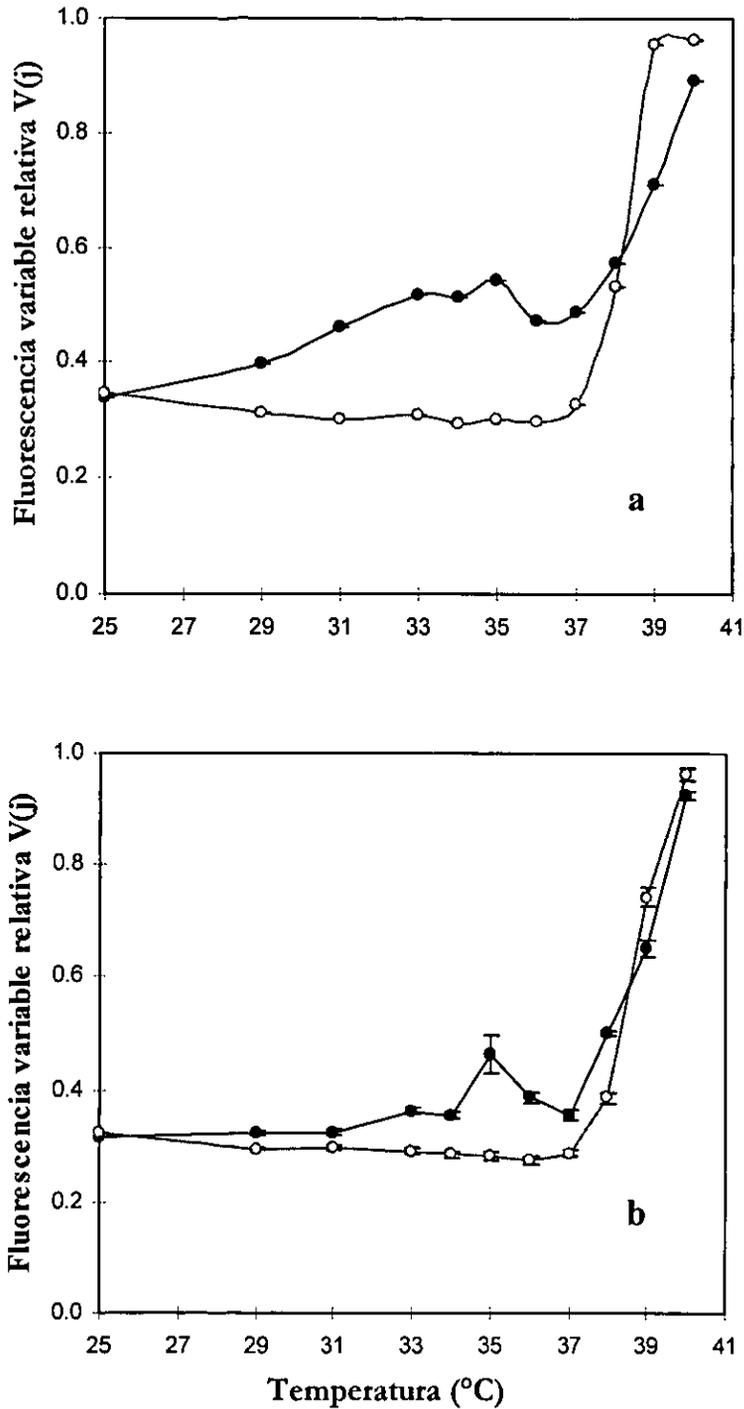
**Fig. 5.6** Curvas de inducción de fluorescencia variable relativa [V(t)] de *S. corculorum* en cultivo, expuestas por 45 min a las temperaturas experimentales (25, 27, 29, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40°C). Cada curva representa el promedio de 3 réplicas. a) muestras mantenidas en oscuridad, b) muestras expuestas a luz subsaturante.



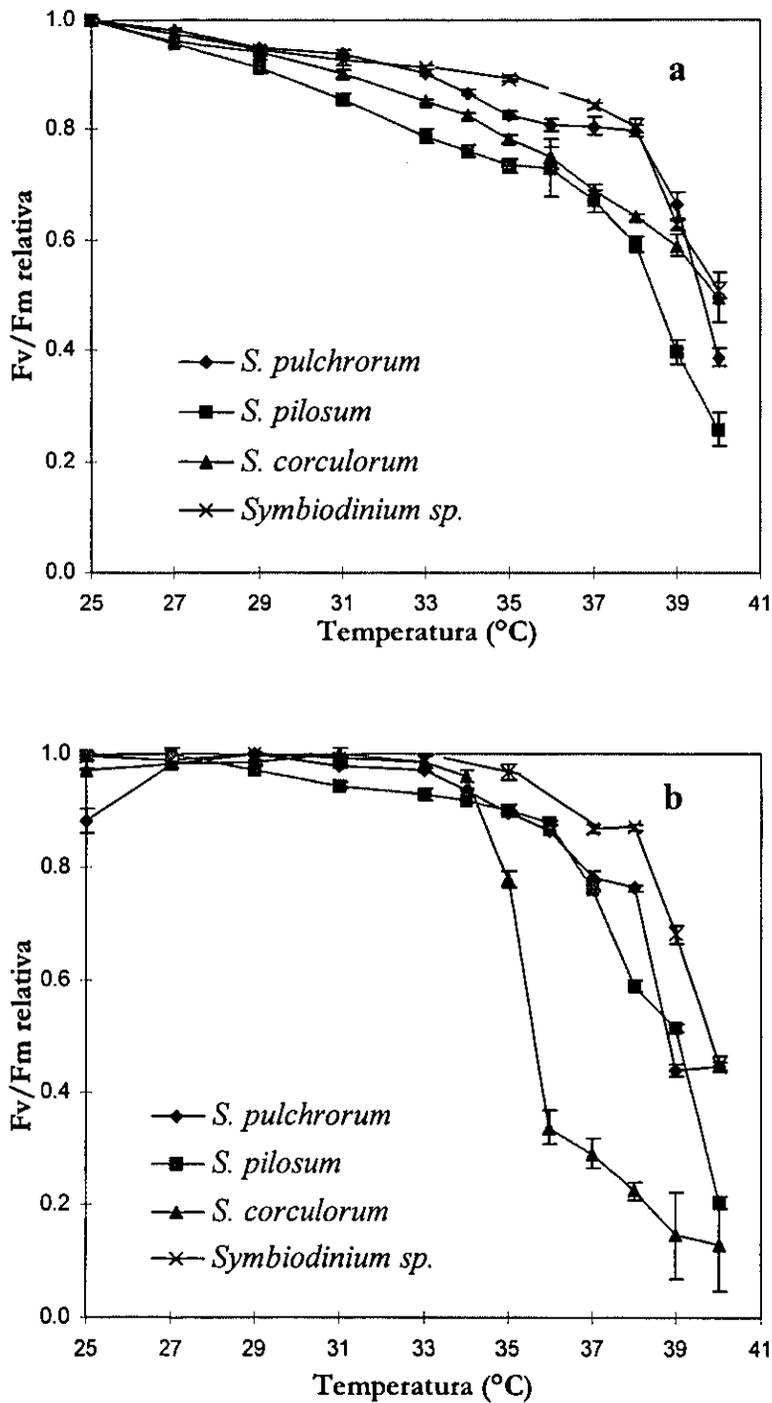
**Fig. 5.7** Curvas de inducción de fluorescencia variable relativa [V(t)] de *Symbiodinium* sp. (de *Pocillopora damicornis*) en cultivo, expuestas por 45 min a las temperaturas experimentales (25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 38, 39 y 40°C). Cada curva representa el promedio de 3 réplicas. a) muestras mantenidas en oscuridad, b) muestras expuestas a luz subsaturante.



**Fig. 5.8** Fluorescencia variable relativa a los 0.9 ms  $[V(j)]$  en función de la temperatura después de exposiciones de 45 min en oscuridad (círculos oscuros) y en exposiciones a luz subsaturante (círculos claros). a) *S. pilosum* b) *S. pulchrorum* c) *S. corculorum* d) *Symbiodinium* sp. de *Pocillopora damicornis*.



**Fig. 5.9** Variaciones de fluorescencia variable relativa a los 0.9 ms [V(j)] dependientes de la temperatura, en oscuridad después de exposiciones de 15 min (círculos claros, n=5) y de 45 min (círculos oscuros, n=3) a cada temperatura. **a)** *S. pilosum*, **b)** *S. pulchrorum*.



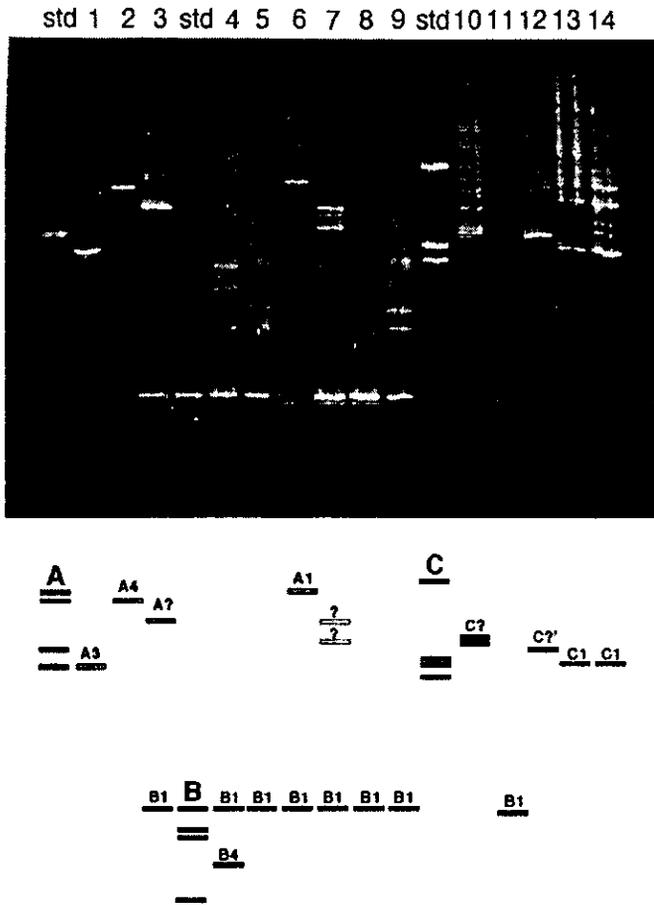
**Fig. 5.10** Variaciones en la cosecha cuántica relativa de separación de carga del FSII (Fv/Fm) de dinoflagelados en cultivo en función de la temperatura, con exposiciones de 45 min, n=3. **a)** en oscuridad; **b)** a luz subsaturante ( $60 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

## 2ª PARTE

### Variaciones interespecíficas de la sensibilidad térmica

El objetivo de esta segunda parte fue explorar la variabilidad de la sensibilidad al estrés térmico de un amplio rango de especies del género *Symbiodinium* hospedadas en distintas especies de invertebrados y pertenecientes a diferentes filotipos. Para los experimentos que se diseñaron se seleccionaron muestras de 13 corales hermatípicos, un hidrocoral y un zoántido simbiote. Las muestras se expusieron secuencialmente a 10 diferentes temperaturas durante 45 minutos. Los invertebrados utilizados en este estudio, así como la identificación genética del filotipo al que pertenecen su simbiontes se presentan en la figura 5.11 (LaJeunesse comunicación personal). Los cnidarios utilizados poseen algas simbiontes pertenecientes a los tres filotipos descritos por Rowan y Powers (1991). Esta clasificación genética está basada en los patrones polimórficos de la longitud de los fragmentos de restricción del gen que codifica para la subunidad pequeña del ARN ribosomal. Algas pertenecientes al mismo filotipo fueron identificadas utilizando los patrones de migración de las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS por sus siglas en Inglés) de los genes ribosomales. Dichos fragmentos fueron separados por electroforesis en un gel con gradiente desnaturizante (Sheffield *et al.* 1989). De esta manera se identificaron 4 tipos distintos de algas dentro del filotipo A, dos tipos dentro del filotipo B, y tres dentro del filotipo C. Solamente tres especies de los corales analizados presentaron poblaciones de simbiontes polimórficas.

Al igual que en los experimentos de la sección anterior, algunas de las muestras de corales intactos fueron mantenidas en oscuridad, mientras que otras fueron expuestas a luz subsaturante ( $60 \mu\text{mol cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Al final de cada exposición, se determinó el valor de la cosecha cuántica máxima de separación de carga del FSII ( $F_v/F_m$ ) en las muestras mantenidas en la oscuridad, mientras que en las muestras expuestas a la luz se determinó la cosecha cuántica efectiva del FSII  $\Delta F/F_m'$  con el fluorómetro de amplitud modulada (PAM). Este tipo de mediciones son indicativas del estado fisiológico de las algas simbiontes, de manera que si bien estas fueron realizadas en el organismo intacto, sólo se refieren a la actividad de los dinoflagelados. La identidad específica de dichas algas



Línea	Hospedero	Simbionte
1	<i>Acropora palmata</i>	A3
2	<i>Porites astreoides</i>	A4
3	<i>Montastrea faveolata</i>	B1, C
4	<i>Millepora complanata</i>	B1, B4
5	<i>Diploria clivosa</i>	B1
6	<i>D. strigosa</i>	A1, B1
7	<i>Eusmilia fastigiata</i>	B1
8	<i>Favia fragum</i>	B1
9	<i>Manicina areolata</i>	B1
10	<i>Agaricia agaricites</i>	C?
11	<i>Isophyllia sinuosa</i>	B1
12	<i>Montastrea cavernosa</i>	C?'
13	<i>Siderastrea siderea</i>	C1
14	<i>Palythoa caribaeorum</i>	C1

Fig. 5.11 Identificación genética de los filotipos a los que pertenecen los simbiontes examinados. La determinación por medio del método DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) fue realizada por LaJeunesse T. (sin publicar).

aún no ha sido determinada, de modo que, por simplicidad, se hace referencia al nombre del hospedero para identificarlas.

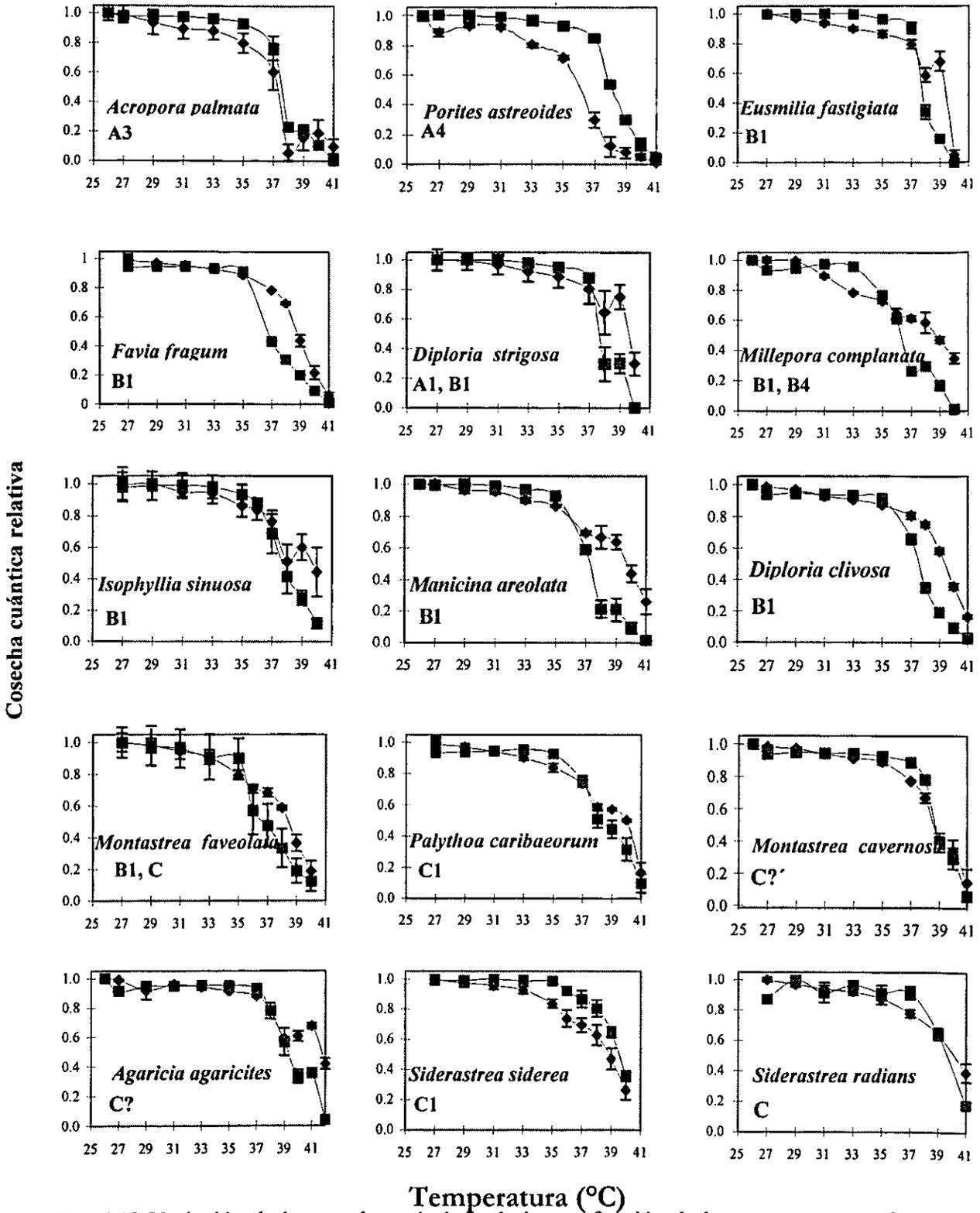
Las algas simbiotes en los organismos intactos respondieron al aumento de la temperatura con una disminución secuencial tanto de  $F_v/F_m$  como de  $\Delta F/F_m'$  (Fig. 5.12). El descenso más dramático se presentó entre los 35 y los 40°C. Gounaris *et al.* (1983) sugieren la existencia de una asociación entre los cambios funcionales y los estructurales de las membranas tilacoidales. Según dicha asociación la caída de la cosecha cuántica (cambio funcional) podría estar asociada a una desnaturalización de las membranas (cambio estructural) por efecto del incremento de la temperatura. Dado que la estabilidad térmica de las membranas fotosintéticas depende de las interacciones cooperativas no-covalentes entre los fosfolípidos, y entre éstos y las proteínas, las variaciones de  $F_v/F_m$  y  $\Delta F/F_m'$  (variable  $y$ ) en función de la temperatura (variable  $x$ ) fueron ajustadas a un modelo sigmoidal (Ecuación 5.1).

$$y = A [1 - 1 / [1 + \exp[-(x - T_c) / S]]] \quad (5.1)$$

en donde  $A$  representa el valor inicial de  $F_v/F_m$  o bien de  $\Delta F/F_m'$ .  $T_c$  se refiere a la temperatura en la cual las cosechas cuánticas han disminuído un 50% de su valor inicial, y  $S$  representa la sigmoidicidad de la respuesta. El parámetro  $S$ , es una medida de qué tan aguda es la transición de fase en la fluidez de la membrana fotosintética. Utilizando este valor, calculamos la temperatura a la cual se presenta una reducción del 10% de la cosecha cuántica inicial ( $T_i$ ) y que está definido por la ecuación 5.2.

$$T_i = T_c - 2S \quad (5.2)$$

El ajuste de los datos empíricos al modelo se realizó utilizando un algoritmo no lineal con un programa comercial (PeakFit, USA). La bondad del ajuste fue juzgada por la distribución de los residuales y por el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) (Fig. 5.13). En la mayoría de los casos los valores de  $R^2$  fueron superiores al 0.88 siendo el menor de 0.70, con residuales distribuidos al azar alrededor de cero.

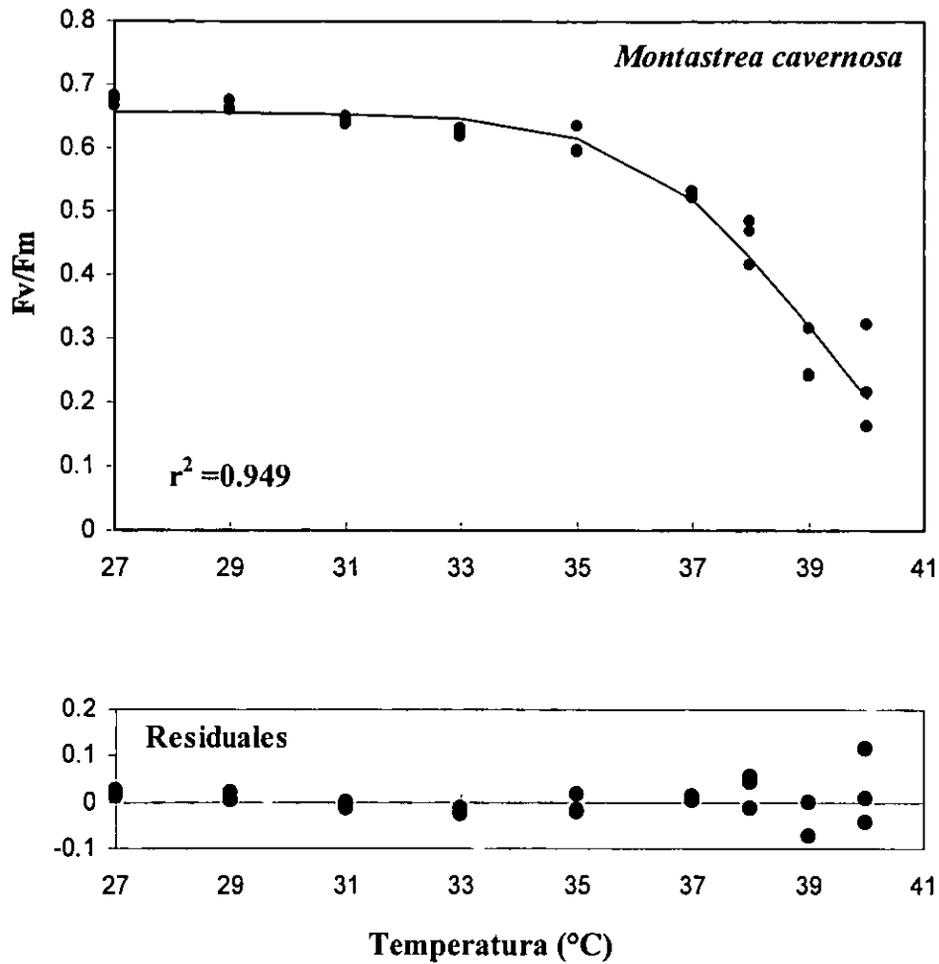


**Fig. 5.12** Variación de la cosecha cuántica relativa en función de la temperatura, registrada con el fluorómetro *Diving-PAM* sobre organismos intactos. Tiempo de exposición a cada temperatura: 45 min. rombos:  $F_v/F_m$ , cuadros:  $\Delta F/F_m'$ . Las literales denotan el filotipo de los dinoflagelados simbiotes del invertebrado.

Las temperaturas críticas  $T_{c50}$  y  $T_i$  obtenidas de los ajustes de los datos empíricos muestran una alta heterogeneidad entre especies de invertebrados (Tabla 5.2 y Fig. 5.14a, b). Pese a que en el 80% de las especies estudiadas la caída de  $\Delta F/F_m'$  ocurre a temperaturas inferiores a las que se presenta para  $F_v/F_m$ , los valores de  $T_{c50}$  y  $T_i$  estimados a partir del parámetro  $F_v/F_m$  no se correlacionan con aquellos obtenidos para  $\Delta F/F_m'$  ( $r=0.574$  y  $0.516$  respectivamente).

La comparación de los límites de confianza de los ajustes utilizando todos los datos de cada filotipo indicaron que para  $F_v/F_m$ , los filotipos B y C presentan un patrón similar de variación en función de la temperatura, claramente diferente del presentado por el filotipo A. En contraste, los límites de confianza de los ajustes para  $\Delta F/F_m'$  de los diferentes filotipos indicaron patrones similares para A y B y diferentes del que presenta C (Fig. 5.15a, b). Se aplicó la prueba estadística no-paramétrica Kruskal-Wallis para determinar la similitud ó significancia de las diferencias entre las medianas de las cosechas cuánticas máximas y efectivas de cada uno de los filotipos. Los resultados indicaron que en ambos casos existen diferencias significativas entre los filotipos ( $p < 0.05$  para  $T_{c50}$  de  $F_v/F_m$  y  $p \ll 0.01$  en el caso de  $T_{c50}$  para  $\Delta F/F_m'$ ). Se aplicó la misma prueba estadística para evaluar las diferencias existentes entre los valores obtenidos para cada especie de coral dentro de cada uno de los filotipos. Los resultados indicaron que las  $T_{c50}$  para  $F_v/F_m$  tanto el filotipo A como el C presentan diferencias internas significativas ( $p < 0.05$  en ambos casos). Es importante resaltar que si bien el estadístico no detectó diferencias significativas dentro del filotipo B, la prueba de la mediana (*test*  $\chi^2$ ) sugirió que está en el límite de detección de diferencias significativas, y que un incremento en el número de datos resultaría en rechazar la hipótesis nula. En el caso del indicador  $T_{c50}$  para  $\Delta F/F_m'$ , solamente se presentaron diferencias significativas dentro del filotipo B ( $p < 0.05$ ).

No se detectaron por otro lado diferencias significativas entre las  $T_i$  estimadas a partir de  $F_v/F_m$  entre los distintos filotipos. Sin embargo se detectaron diferencias significativas para las  $T_i$  de  $F_v/F_m$  dentro de los filotipos B y C (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). Los análisis estadísticos indicaron que los distintos filotipos presentan diferencias significativas en lo



**Fig. 5.13** Variación de la cosecha cuántica máxima (Fv/Fm) en función de la temperatura en dinoflagelados simbios de *Montastrea cavernosa*, ajustados a una función sigmoide inversa. Abajo se muestra también la variación de los residuales.

## RESULTADOS

**Tabla 5.2** Especies de invertebrados cuyos dinoflagelados simbiosntes pertenecen, todos al género *Symbiodinium* sp.; filotipo del simbiote; y temperaturas críicas  $T_i$  y  $T_{c50}$  determinadas a partir de la variación de la cosecha cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) y de la cosecha cuántica efectiva de separación de carga ( $\Delta F/F_m'$ ). Las determinaciones de fluorescencia fueron obtenidas después de exposiciones de 45 min a cada temperatura experimental. Los valores de temperaturas críicas se obtuvieron por medio de un ajuste a una función sigmoide.  $n=3$ , excepto *S. radians*  $n=4$ .

Hospedero	Filotipo del simbiote	$T_i$ (°C) $F_v/F_m$	$T_i$ (°C) $\Delta F/F_m'$	$T_c$ (°C) 50% de $F_v/F_m$	$T_c$ (°C) 50% de $\Delta F/F_m'$
<i>Acropora palmata</i>	A3 *	37	36	37	38
<i>Porites astreoides</i>	A4 *	34	37	36	38
<i>Diploria strigosa</i>	A1, B1 *	38	37	40	38

<i>Montastrea faveolata</i>	B1, C *	35	35	39	37
<i>Eusmilia fastigiata</i>	B1 *	37	37	39	38
<i>Favia fragum</i>	B1 *	37	35	39	37
<i>Millepora complanata</i>	B1, B4 *	32	34	38	37
<i>Isophyllia sinuosa</i>	B1 *	34	35	39	38
<i>Manicina areolata</i>	B1 *	35	35	40	37
<i>Diploria clivosa</i>	B1 *	37	36	40	38

<i>Palythoa caribaeorum</i>	C1 *	33	36	40	39
<i>Montastrea cavernosa</i>	C?' *	36	37	39	39
<i>Agaricia agaricites</i>	C? *	37	38	40	39
<i>Siderastrea siderea</i>	C1 *	35	37	39	40
<i>Siderastrea radians</i>	C	35	38	40	40

\* Filotipos determinados por Todd LaJeunesse (sin publicar).

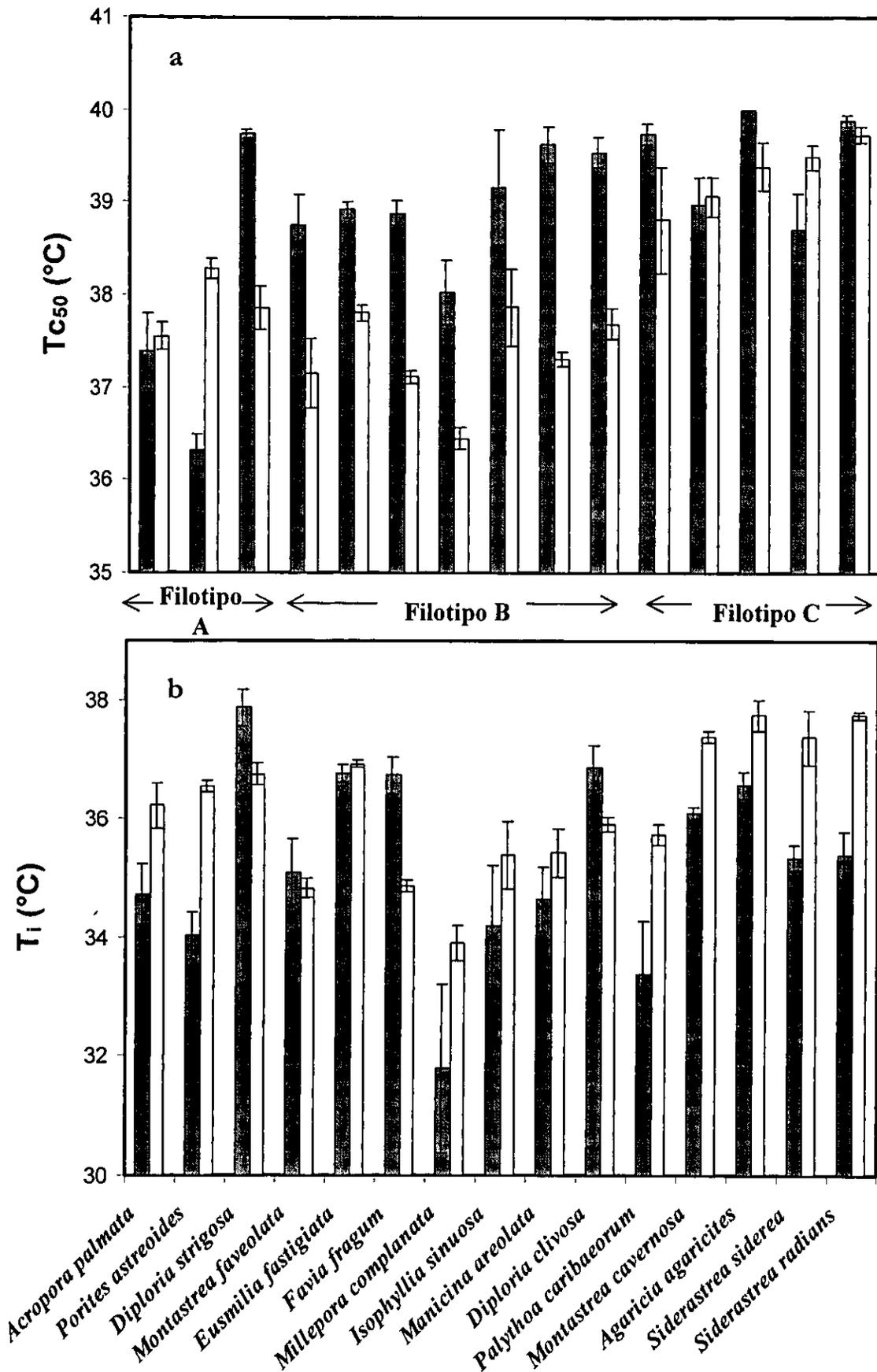
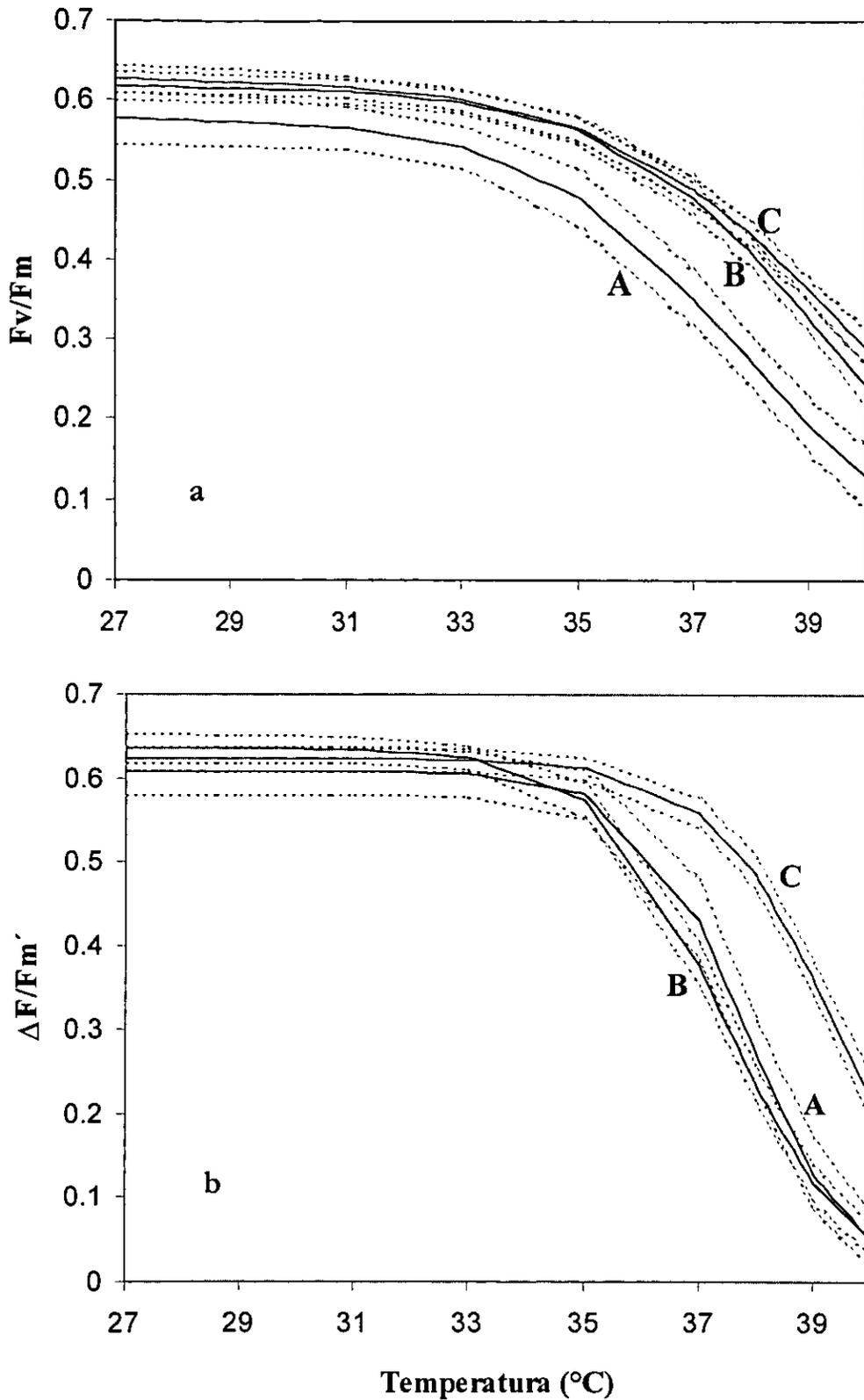


Fig. 5.14 Valores promedio  $\pm$  SE de las temperaturas críticas: a) T<sub>c50</sub>, y b) T<sub>i</sub>, para las cosechas cuánticas máxima (barras oscuras) y efectiva (barras claras) de la separación de carga del FSII de los diferentes dinoflagelados que se encuentran en los hospederos que se indican. Nótese que la escala en las ordenadas es diferente.



**Fig. 5.15** Ajustes y límites de confianza (90-95%) a las funciones sigmoideas que describen la variación de la cosecha cuántica: **a)** máxima  $F_v/F_m$ , y **b)** efectiva  $\Delta F/F_m'$ , en función de la temperatura, para las especies analizadas de cada filotipo (A, B y C).

relativo a los valores de  $T_i$  para  $\Delta F/F_m'$  ( $p \ll 0.01$ ). El análisis de las diferencias dentro de cada filotipo mostró valores significativos solamente dentro de las especies del filotipo B ( $p < 0.05$ ).

El valor de  $T_i$  para  $F_v/F_m$  puede ser considerado como un indicador de la sensibilidad relativa de las especies a exposiciones a temperaturas elevadas. A partir de la comparación de los valores obtenidos para cada una de las especies con el promedio de todas ellas ( $35.3^\circ\text{C}$ ), se clasificó a los organismos estudiados en dos grupos: organismos con valores de  $T_i$  para  $F_v/F_m$  menores al promedio, que fueron clasificados como más sensibles; y aquellos que presentaron valores superiores al promedio, que fueron considerados como menos sensibles (Tabla 5.3). De manera similar los valores de  $T_{c50}$  para  $\Delta F/F_m'$  fueron considerados como indicadores de la tolerancia relativa de los organismos estudiados. De esta manera aquellas especies que presentaron valores superiores al promedio de todas ellas ( $38.1^\circ\text{C}$ ) fueron considerados como más tolerantes, mientras que aquellos con valores de  $T_{c50}$  para  $\Delta F/F_m'$  menores al promedio fueron considerados como menos tolerantes.

**Tabla 5.3** Clasificación de los invertebrados según la sensibilidad y tolerancia térmica de los dinoflagelados simbioses considerando su respuesta fisiológica.

Especies de invertebrados cuyos dinoflagelados simbioses son	más sensibles	menos sensibles
<b>más tolerantes</b>	<i>Porites astreoides</i> (A4) <i>Palythoa caribaeorum</i> (C1)	<i>Montastrea cavernosa</i> (C?) <i>Agaricia agaricites</i> (C?) <i>Siderastrea siderea</i> (C1) <i>Siderastrea radians</i> (C)
<b>menos tolerantes</b>	<i>Acropora palmata</i> (A3) <i>Millepora complanata</i> (B1, B4) <i>Isophyllia sinuosa</i> (B1) <i>Manicina areolata</i> (B1) <i>Montastrea faveolata</i> (B1, C)	<i>Diploria strigosa</i> (A1, B1) <i>Eusmilia fastigiata</i> (B1) <i>Favia fragum</i> (B1) <i>Diploria clivosa</i> (B1)

\* Las literales denotan el filotipo de los dinoflagelados simbioses de cada invertebrado (LaJeunesse sin publicar).

### 3ª PARTE

#### Relación entre los efectos de la temperatura y la irradiancia

El objetivo de esta tercera parte fue examinar la posible relación sinérgica entre la temperatura y la irradiancia. Para ello se examinó experimentalmente la respuesta de una especie de dinoflagelado simbiote en cultivo y las respuestas de tres especies de dinoflagelados en su asociación intacta de coral. Para las determinaciones fisiológicas se utilizaron los fluorómetros de amplitud modulada (PAM de Hansatech y *Diving*-PAM de Walz). Después de exposiciones de 45 min a cada temperatura se determinó la cosecha cuántica máxima ( $F_v/F_m$ ) y la cosecha cuántica efectiva ( $\Delta F/F_m'$ ). Además fue posible cuantificar la magnitud de la desactivación no fotoquímica y la tasa de transporte de electrones del FSII (ETR).

##### • Dinoflagelados en cultivo

*Symbiodinium* sp. (de *Pocillopora damicornis*). ETR se calculó con los datos de eficiencia cuántica efectiva, obtenidos del fluorómetro PAM de Hansatech después de las exposiciones de 45 min a cada temperatura. El ETR relativo se estimó en función de la temperatura y de la irradiancia, y mostró una clara relación proporcional a la irradiancia a temperaturas bajas, es decir, mostró el comportamiento característico de una curva fotosíntesis-irradiancia. Sin embargo, al aumentar la temperatura, ETR disminuyó secuencialmente (Fig. 5.16). El máximo valor de ETR se presentó a los 32°C, temperatura después de la cual se observó una fuerte fotoinhibición de la fotosíntesis. La fotosíntesis relativa estimada a 36°C y a la irradiancia más alta, fué aún menor que el 40% de la máxima alcanzada a 32°C.

Se consideró  $1-\Delta F/F_m'$  como un parámetro estimador de la desactivación no fotoquímica y por lo tanto un indicador de fotoprotección. La variación de  $1-\Delta F/F_m'$  en función de la irradiancia y la temperatura (una curva para cada temperatura), mostró un aumento secuencial de este parámetro en función de las dos variables. Estos resultados fueron muy ilustrativos y relevantes pues mostraron respuestas similares a diferentes combinaciones de irradiancia y temperatura. Es decir, se presentó aproximadamente la misma fotoprotección relativa en la muestra a 28°C con 150  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que en la muestra a la temperatura de 34°C y con sólo 50  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 5.17).

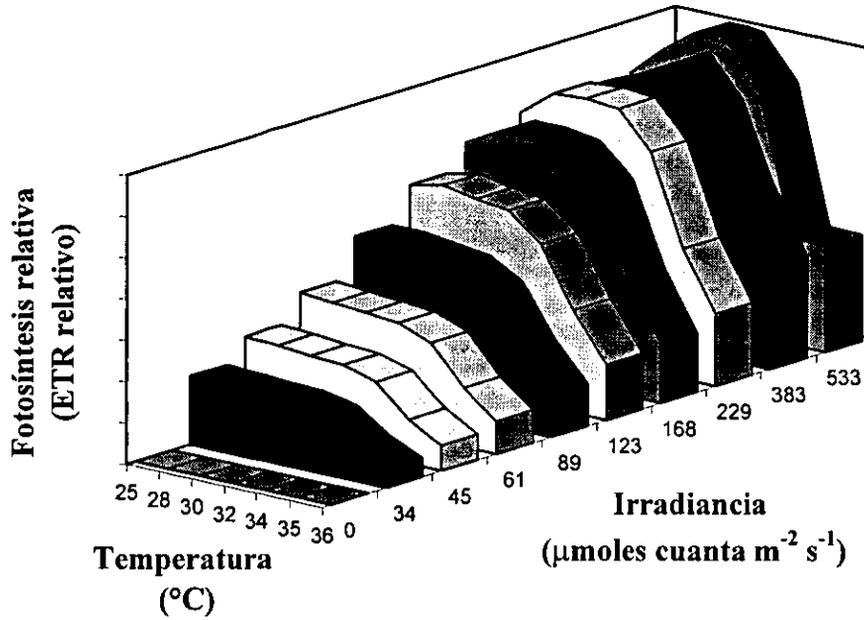


Fig. 5.16 ETR relativo en función de la temperatura y de la irradiancia actínica en *Symbiodinium* sp. (de *Pocillopora damicornis*), con exposiciones de 45 min.

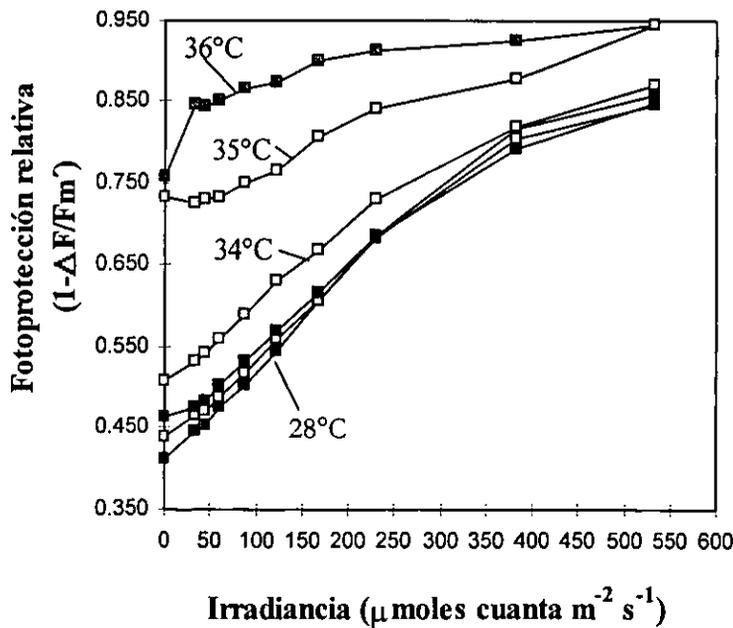


Fig. 5.17 Fotoprotección relativa de *Symbiodinium* sp. (de *Pocillopora damicornis*), en función de la irradiancia actínica y con exposiciones de 45 min a diferentes temperaturas (28, 30, 32, 34, 35 y 36°C), n=3.

La inducción de fotoprotección a baja temperatura (28°C) era similar al que produjo una irradiancia tres veces menor pero a temperatura alta (34°C). Así mismo la fotoprotección evocada a 30°C con 300  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fué aproximadamente la misma que a 35°C con sólo 50  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , con una irradiancia seis veces menor. Además, se observó el inicio de la saturación de fotoprotección a los 36°C y con 200  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 5.17).

- Dinoflagelados en hospederos intactos *Porites astreoides*, *Diploria clivosa*, y *D. strigosa*

Con la cosecha cuántica efectiva determinada con el *Diving-PAM* se calcularon los valores de ETR en función de la irradiancia, obteniéndose una curva para cada temperatura. Se observó en general un aumento de ETR proporcional a la irradiancia (comportamiento similar al de la fotosíntesis) y una disminución secuencial de ETR con el aumento de temperatura.

En estas tres especies también se estimó la desactivación no fotoquímica en función de la temperatura y de la luz actínica, y se encontró que la evocación de esta vía fotoprotectiva, principalmente en las muestras mantenidas en oscuridad, fue aumentando secuencialmente con el incremento en la temperatura experimental.

En el caso de *Porites astreoides*, las curvas de ETR-E (Tasa de transporte de electrones-Irradiancia) mostraron nuevamente cómo ETR aumentó en función de la irradiancia, pero disminuyó con el aumento en la temperatura. Las diferencias en la tasa de transporte de electrones en muestras expuestas a la luz y en las de oscuridad fueron muy significativas, siendo muy superiores las de las muestras iluminadas. Se consideró ETR máxima al transporte de electrones que se presentó al estar expuestas a 2800  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . En el caso de las muestras mantenidas en oscuridad no hubo un incremento notable de ETR, el cual disminuyó a partir de los 29°C (Fig. 5.18a), sin embargo, las muestras mantenidas bajo luz subsaturante mostraron un aumento en ETR con un máximo a los 31°C y una posterior disminución (Fig. 5.18b).

Las muestras mantenidas en oscuridad a 36°C presentaron a 2500  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de luz actínica, aproximadamente un 60% del valor de ETR que alcanzaron cuando se expusieron a la misma irradiancia pero a 27°C con 2500  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Fig. 5.18a).

En las muestras expuestas a la luz a 36°C la ETR máxima fue prácticamente la misma que el de 27°C, sin embargo es importante señalar que esto ocurre en la fase de decaimiento, posterior al máximo que se alcanzó a los 31°C (Figs. 5.18b, 5.19).

En cuanto a la desactivación no fotoquímica (NPQ) en ambos tratamientos (oscuridad y luz), ésta aumentó secuencialmente en función de la temperatura, pero su evocación fue notablemente mayor en las muestras mantenidas a la oscuridad (Fig. 5.20). Además, las muestras expuestas a la luz y a 31°C presentaron una NPQ equivalente a la mitad de la que se presentó en las mantenidas en oscuridad a la misma temperatura.

En el caso de las muestras de *Porites astreoides* a 33°C durante 9 horas, las curvas de ETR-E también mostraron un aumento secuencial en función de la irradiancia y un descenso conforme aumentaba el tiempo de exposición a los 33°C. La ETR disminuyó aproximadamente a un 60% del valor inicial en ambos tratamientos (Fig. 5.21a, b), aún cuando se alcanzaron valores más altos en las muestras expuestas a la luz, donde la tasa de transporte de electrones fue el doble de la que se observó en las mantenidas en oscuridad. La ETR de las muestras iluminadas después de las 9 horas de exposición, no llegó a ser tan baja como la ETR inicial de las de oscuridad (Fig. 5.21a). La ETR máxima (la tasa de transporte alcanzada con  $\sim 2350 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) disminuyó notablemente en el caso de las expuestas a la luz, a diferencia de las mantenidas en oscuridad donde el descenso no fue significativo (Fig. 5.22a). Así mismo al representar la cosecha cuántica relativa en función del tiempo de exposición a 33°C, sólo se observó cambio en la cosecha cuántica máxima  $F_v/F_m$  (disminuyó principalmente durante las primeras cuatro horas), mientras que la cosecha cuántica efectiva  $\Delta F/F_m'$  no mostró variación significativa (Fig. 5.22b).

La desactivación no fotoquímica también aumentó drásticamente en el caso de las mantenidas en oscuridad que en las muestras mantenidas a luz subsaturante (Fig. 5.23a). Tan sólo después de la primera hora de exposición a 33°C en oscuridad se evocó aproximadamente la misma NPQ que después de 9 horas a 33°C y expuestas a la luz (Fig. 5.23b). Esta diferencia entre los tratamientos en oscuridad y con luz coincide con la observada en los experimentos con *Porites astreoides* pero en exposiciones de 45 min a diferentes temperaturas.

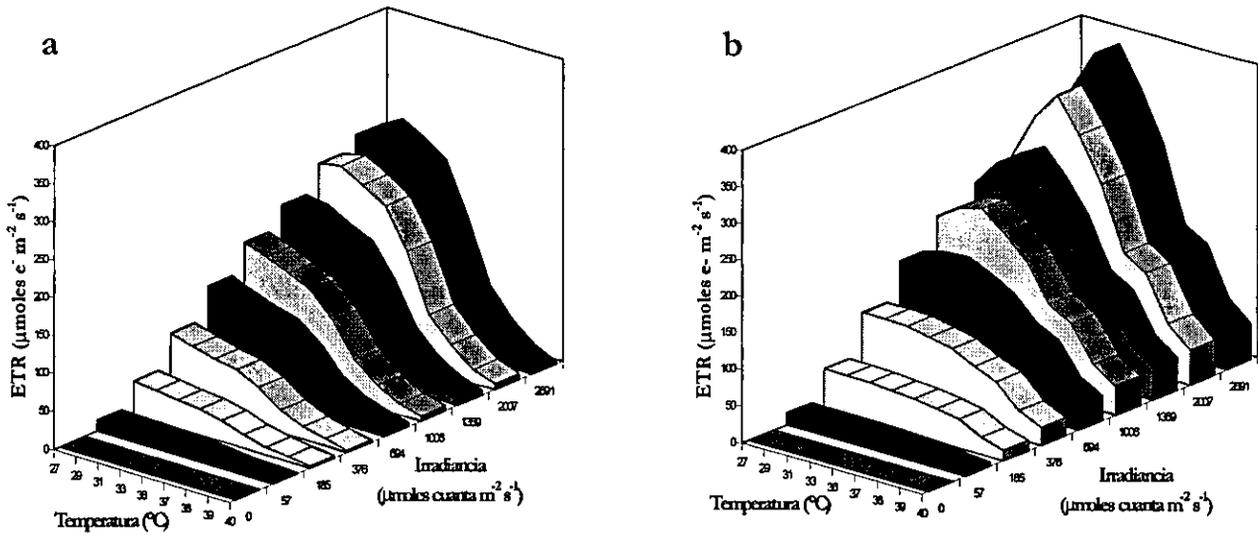


Fig. 5.18 Variación de la tasa de transporte de electrones en función de la temperatura y de la irradiancia de dinoflagelados simbiotes en *Porites astreoides*, en exposiciones de 45 min: a) en oscuridad y b) bajo luz subsaturante.

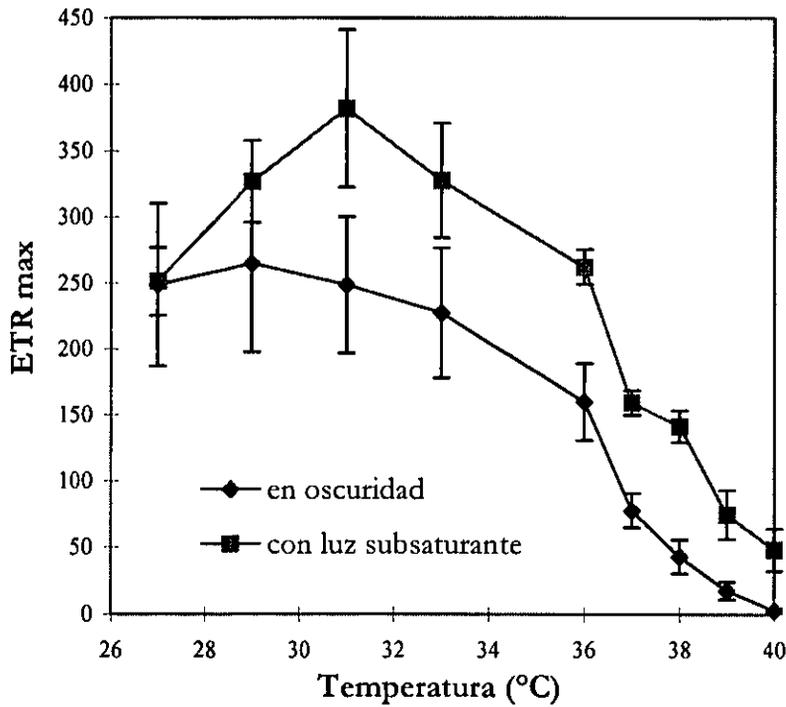
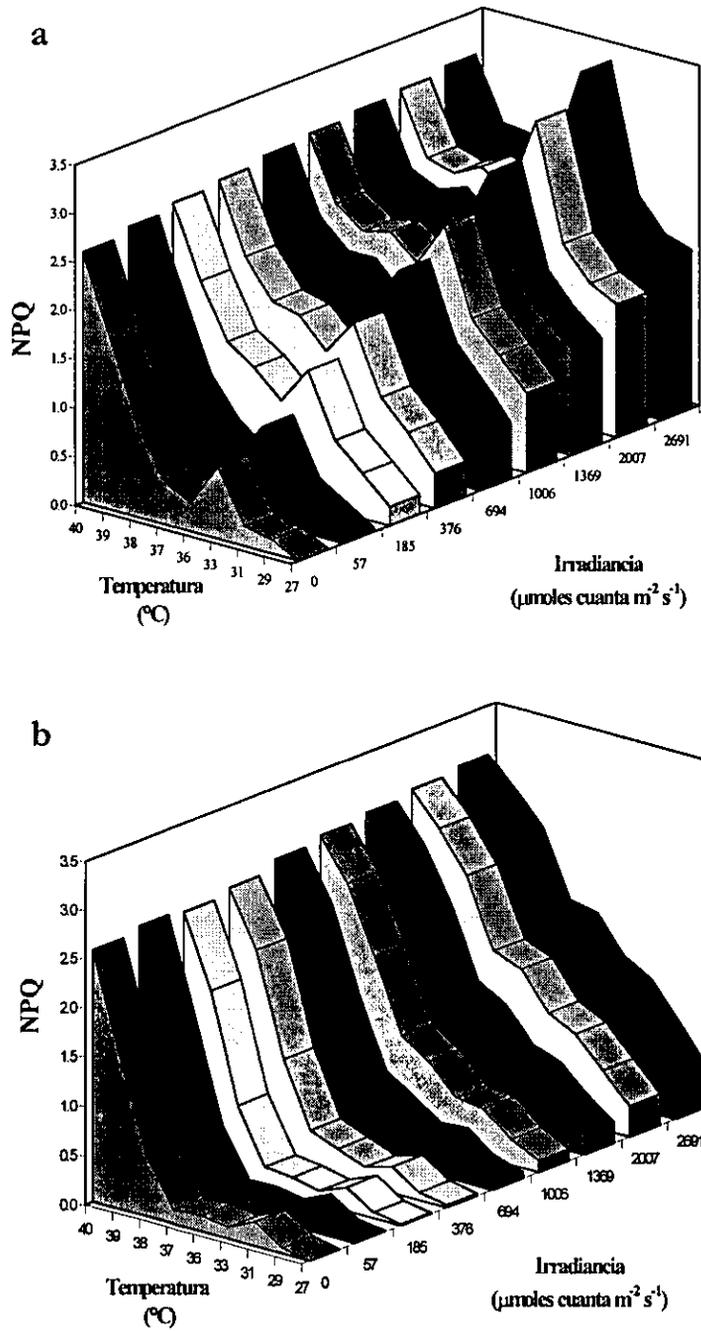


Fig. 5.19 ETR máxima en función de la temperatura de dinoflagelados simbiotes en *Porites astreoides*, n=3.



**Fig. 5.20** Variación de la desactivación no fotoquímica de dinoflagelados simbiotes en *Porites astreoides* en función de la temperatura y de la irradiancia, en exposiciones de 45 min: **a)** en oscuridad y **b)** bajo luz subsaturante.

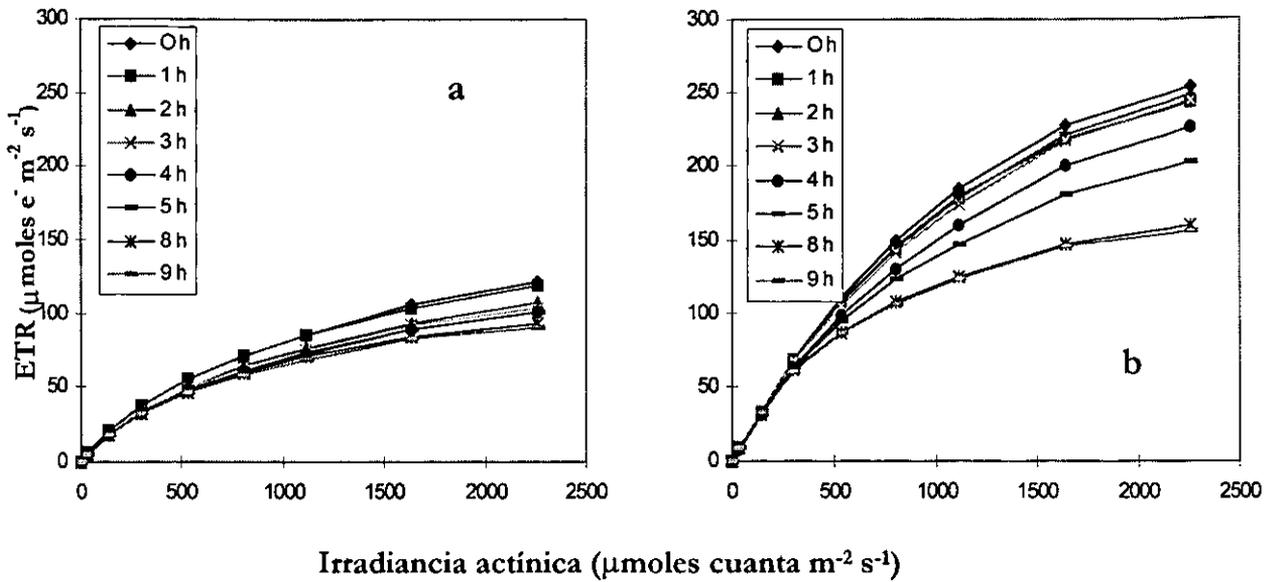


Fig. 5.21 Tasa de transporte de electrones de dinoflagelados simbiotes en *Porites astreoides*, en función de la irradiancia y tiempo de exposición a 33°C. a) mantenidas en oscuridad, b) bajo luz subsaturante.

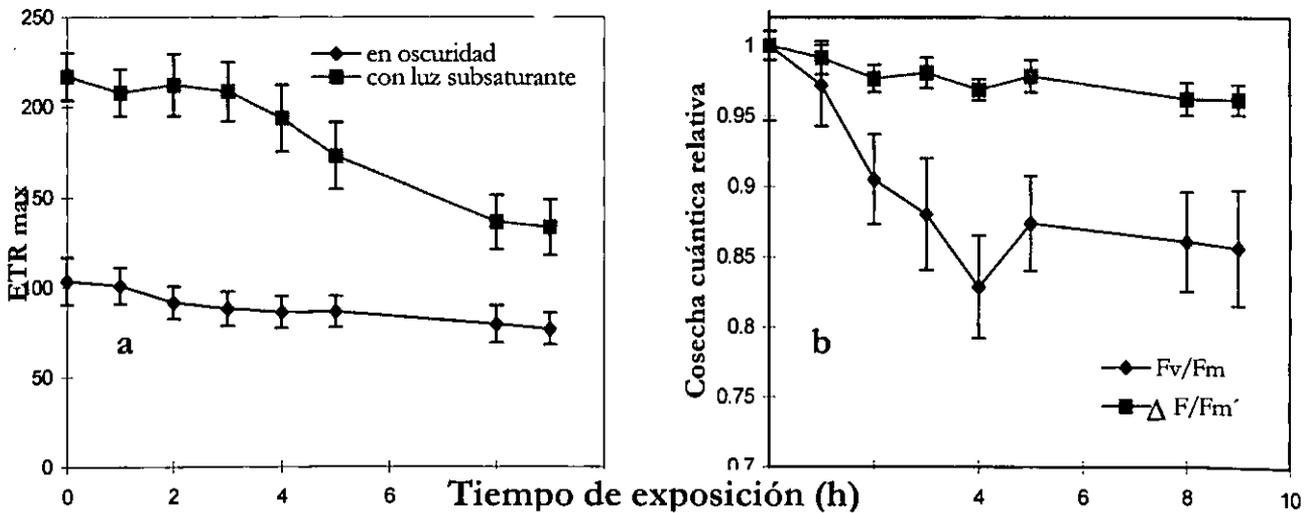


Fig. 5.22 Variación de a) ETR máximo y b) cosecha cuántica relativa (máxima y efectiva), en función del tiempo de exposición a 33°C de dinoflagelados simbiotes en *Porites astreoides*, n=6.

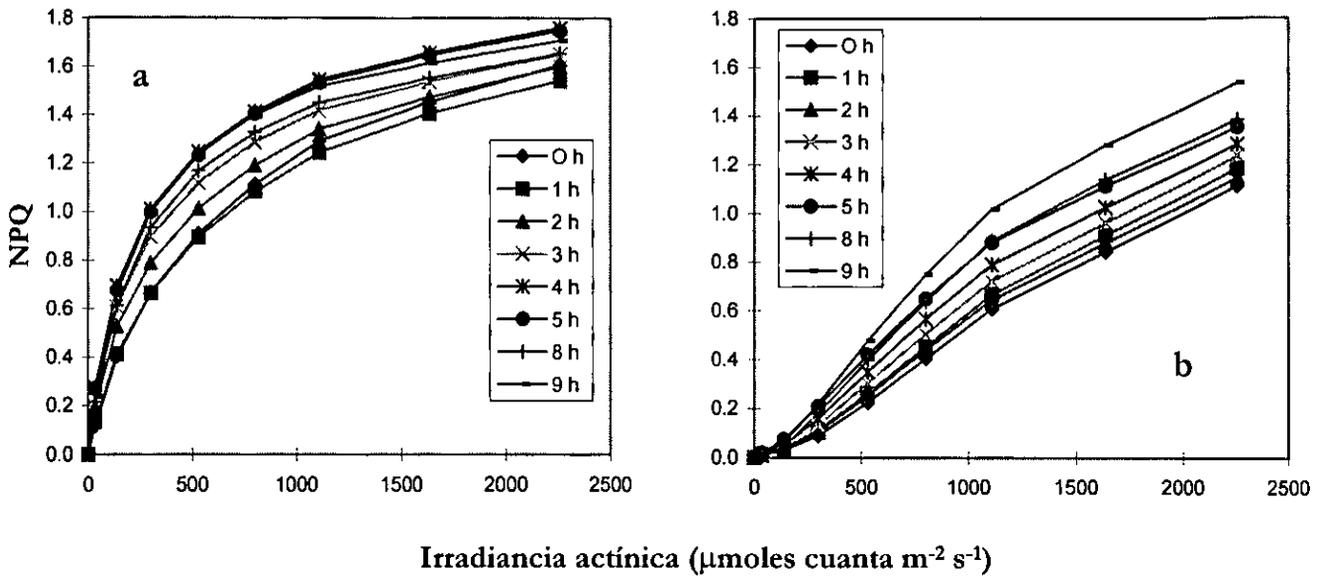


Fig. 5.23 Variación de la desactivación no fotoquímica NPQ, en función de la irradiancia y del tiempo de exposición a 33°C de dinoflagelados simbiotes en *Porites astreoides* a) en oscuridad y b) con luz subsaturante, n=6.

En el caso de *Diploria clivosa*, las curvas de ETR-E nuevamente mostraron como ETR aumentó en función de la irradiancia actínica, pero disminuyó al aumentar la temperatura (Fig. 5.24a, b). Así mismo a los 29°C se alcanzó el máximo transporte tanto en las muestras de oscuridad como en las expuestas a la luz, siendo aproximadamente 1.4 veces mayor en estas últimas. Se consideró ETR máxima a la tasa de transporte de electrones que se presentó al estar expuestas a 2800  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Las muestras mantenidas bajo luz subsaturante mostraron un aumento hasta los 29°C, después disminuye secuencialmente. En el caso de las muestras mantenidas en oscuridad no hubo un incremento notable de ETR, que disminuyó a partir de los 29°C (Fig. 5.25), lo que se puede interpretar como el inicio de fotoinhibición. A partir de los 37°C en ambos tratamientos las ETR fueron extremadamente bajas lo que indica la ocurrencia de un daño mayor que el posiblemente asociado con la fotoinhibición a tan alta temperatura, quizás relacionado con la desnaturalización de las membranas.

De acuerdo a la variación de la NPQ en función de la irradiancia y de la temperatura, se observó, consistente con las respuestas en las especies anteriores, una mayor evocación de esta fotoprotección en las muestras mantenidas en oscuridad (Fig. 5.26a). Este resultado se observó sólo en las primeras temperaturas (hasta 36°C), ya que a partir de los 37°C este patrón se invirtió presentando mayores valores de NPQ en el caso de las muestras expuestas a la luz (Fig. 5.26b). Lo que ocurrió a temperaturas mayores de 36°C no se consideró para describir el mecanismo de fotoprotección.

Por último, las curvas ETR-E de *Diploria strigosa* mostraron el mismo patrón que en *Porites astreoides* en los casos anteriores. Para esta especie sólo se presentan las respuestas de muestras expuestas a luz subsaturante (Fig. 5.27a). El máximo transporte de electrones (la máxima fotosíntesis relativa) se alcanzó a los 29°C. Se consideró ETR máxima al transporte de electrones que se presentó al estar expuestas a  $\sim 1850 \mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Esta ETR máxima en función de la temperatura se mantuvo sin cambio notable hasta los 31°C. Posteriormente se inicia un descenso secuencial llegando a valores extremadamente bajos a los 37°C (Fig. 5.27b).

Se observó un aumento secuencial en la desactivación no fotoquímica NPQ desde los 27 a los 35°C (Fig. 5.28) con el mismo patrón que en los casos anteriores. A los 35°C NPQ

alcanzó sus máximos valores y a los 37°C bajó drásticamente. La fotoprotección a los 33°C con 900  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  es aproximadamente la misma que a los 29°C con 1800  $\mu\text{moles cuanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

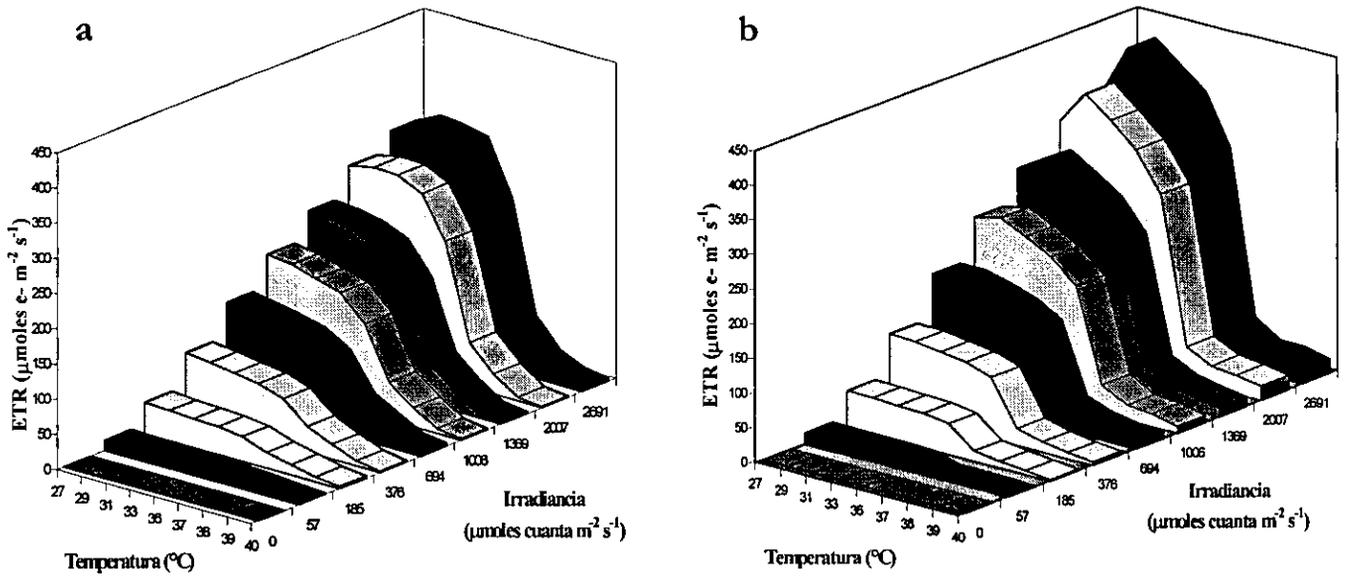


Fig. 5.24 Tasa de transporte de electrones de dinoflagelados simbiotes en *Diploria clivosa* en función de la temperatura y de la irradiancia actínica, con exposiciones de 45 min: a) en oscuridad y b) con luz subsaturante.

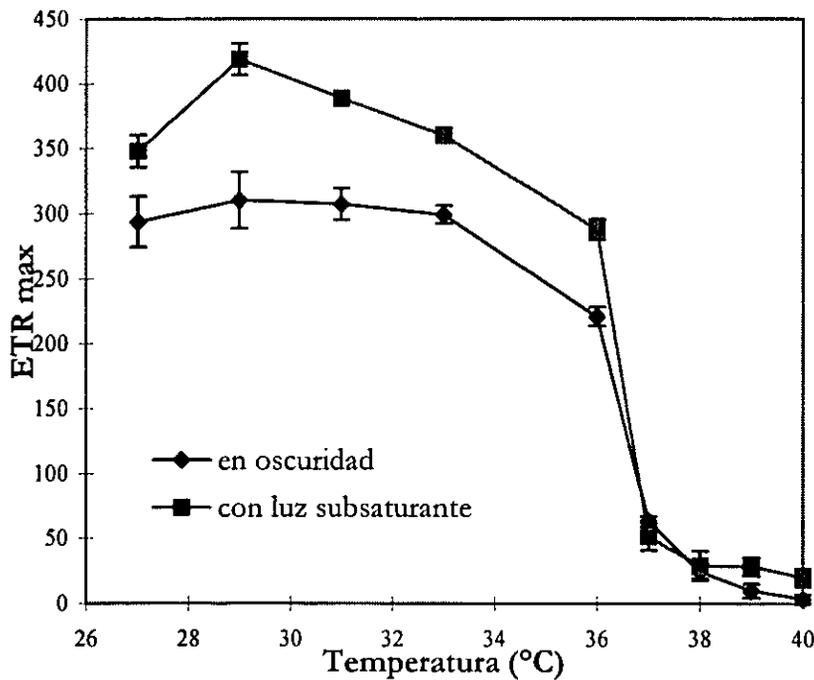
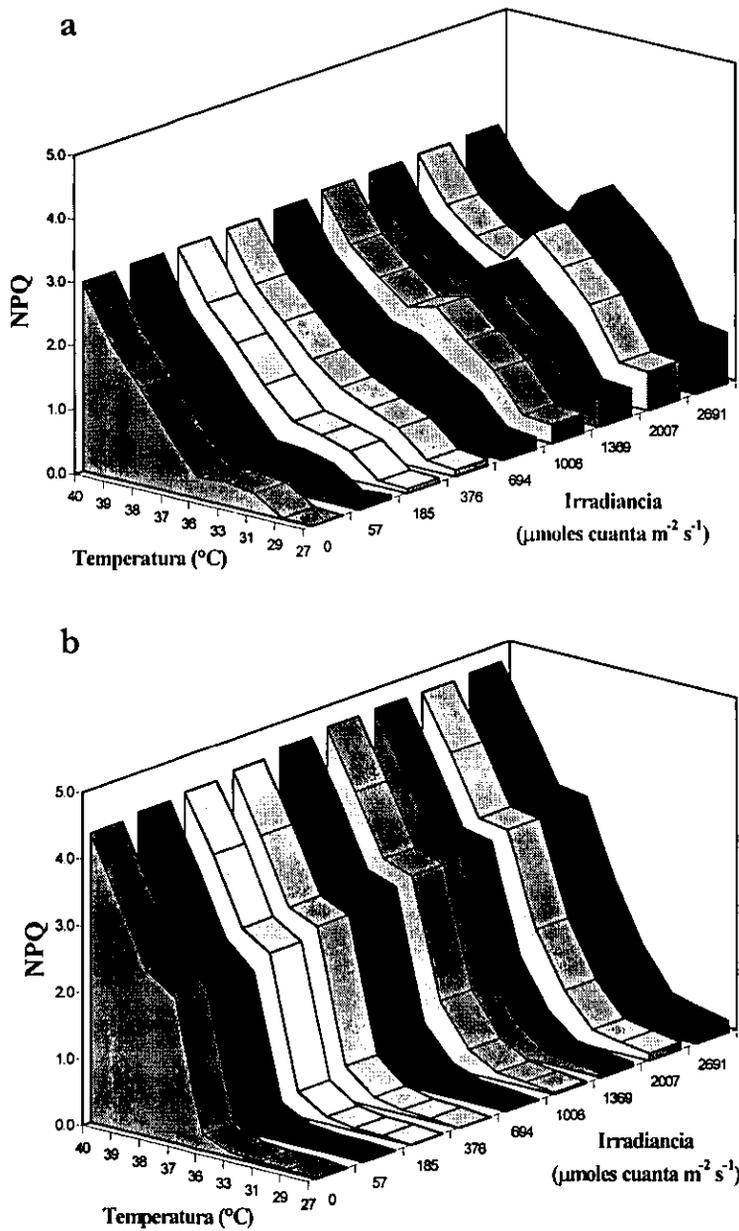


Fig. 5.25 ETR máxima en función de la temperatura de dinoflagelados simbiotes en *Diploria clivosa*, n=3.



**Fig. 5.26** Variación de la desactivación no fotoquímica en función de la temperatura y de la irradiancia actínica, en exposiciones de 45 min; de dinoflagelados simbiotes en *Diploria clivosa* a) en oscuridad y b) bajo luz subsaturante, n=3.

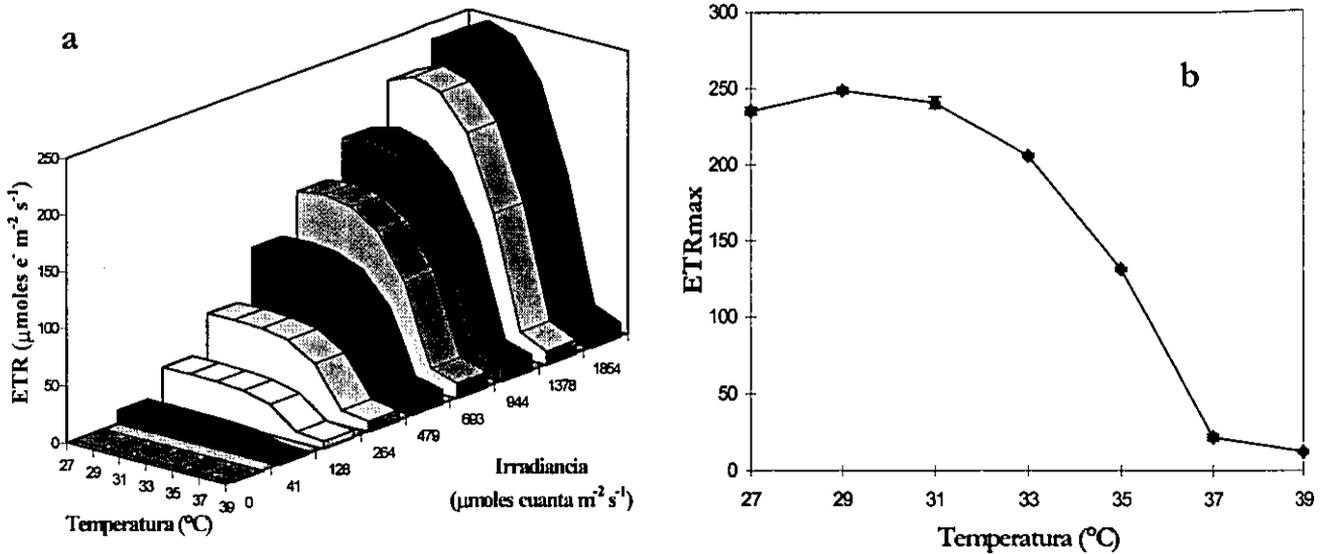


Fig. 5.27 a) Variación de ETR en función de la temperatura y de la irradiancia actínica, y b) ETR máxima, de dinoflagelados simbiotes en *Diploria strigosa* bajo luz subsaturante, con 45 min de exposición a cada temperatura, n=3.

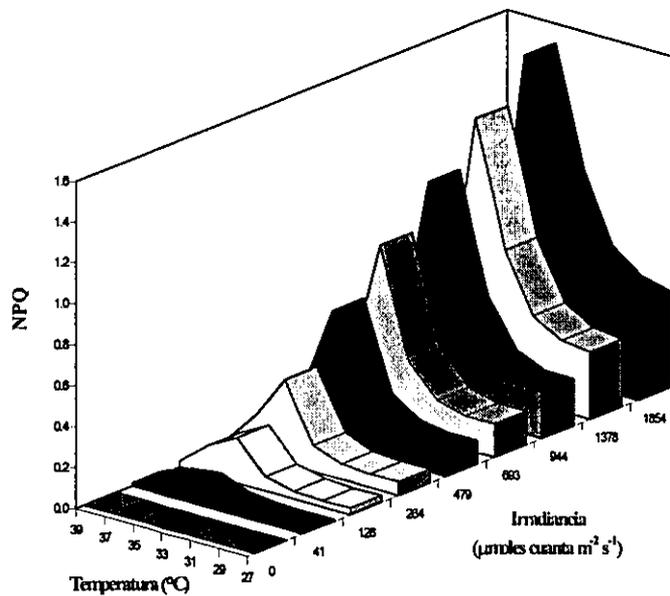
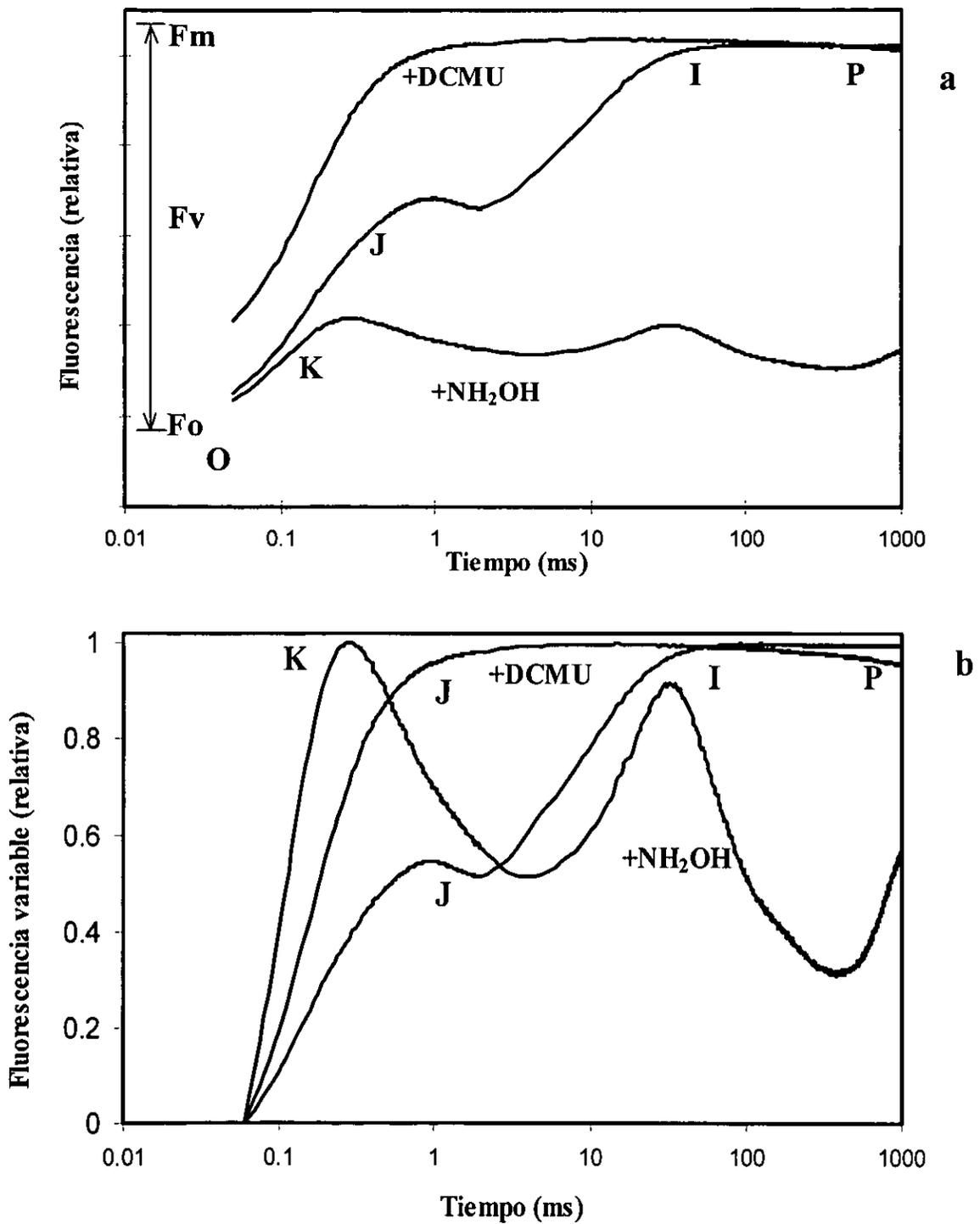


Fig. 5.28 Variación de la desactivación no fotoquímica de dinoflagelados simbiotes en *Diploria strigosa* bajo luz subsaturante en función de la temperatura y de la irradiancia actínica, con 45 min de exposición, n=3.

## VI. DISCUSIÓN

Entre los cambios observados en la fase rápida de las curvas de inducción de fluorescencia obtenidas en la primera parte de este trabajo, como respuesta al aumento de temperatura destacan el aumento en el evento J y la aparición de un evento previo al J, denominado K, asociado a una posterior caída de la señal de fluorescencia. Para interpretar estos resultados es necesario remitirnos a los trabajos de Strasser *et al.* (1995), quienes examinaron la curva de inducción de las plantas *Pisum sativum* y *Camellia japonica* infiltradas con el herbicida 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea (DCMU) dentro del tilacoide. Este herbicida bloquea el flujo de electrones de la plastoquinona primaria  $Q_A^-$  a la plastoquinona secundaria  $Q_B$ , inhibiendo la reoxidación de  $Q_A$  y la reducción de  $Q_B$ . El efecto del DCMU sobre la curva de inducción resultó en la transformación de la secuencia O-J-I-P en O-J. Tales cambios fueron corroborados por Iglesias-Prieto (1997) y Achnine *et al.* (1998).

Iglesias-Prieto (1997) examinó en detalle la inactivación del FSII dependiente de la temperatura del dinoflagelado simbiote *S. kawagutii* Trench y Blank en cultivo, aislado del coral *Montipora verrucosa*. Analizó las respectivas curvas de inducción de muestras expuestas a diferentes temperaturas elevadas durante 60 min, detectando una notable disminución en la cosecha cuántica de separación de carga en el FSII ( $F_v/F_m$ ) a temperaturas mayores de 35°C, y una disminución del área sobre la curva de inducción que es proporcional a la capacidad de transporte de electrones del FSII. La respuesta más general de *S. kawagutii* a temperaturas elevadas fué también el incremento en la fluorescencia en el evento J,  $[V(j)]$ , de la curva de inducción. Estos incrementos de  $V(j)$  fueron a temperaturas muy por debajo de las requeridas para detectar variaciones en cualquier otro parámetro de fluorescencia, sugiriendo que esta señal puede ser muy útil para la detección temprana del estrés térmico en el campo. Como la adición de DCMU se refleja en la producción de  $V(j)$  máximos [muestras envenenadas con 50  $\mu$ M DCMU transformaron la curva de inducción en la secuencia O-J (Fig. 6.1a y b)], se propuso que los incrementos de  $V(j)$  representan la formación, dependiente de la temperatura, de centros de reacción no-reductores de  $Q_B$  con la consecuente acumulación de  $Q_A^-$ . Una reducción en la



**Fig. 6.1 a)** Curvas de inducción de fluorescencia de *S. kawagutii* a 26°C obtenidas con un fluorómetro de amplia resolución temporal (PEA). Células expuestas a 50  $\mu$ M DCMU en la oscuridad por 30 min (curva superior). Células control adaptadas a la oscuridad por 30 min (curva central). Células infiltradas con 1 mM NH<sub>2</sub>OH por 30 min en la oscuridad, y lavadas tres veces con medio fresco (curva inferior). Cada curva es el promedio de tres réplicas (Iglesias-Prieto 1997). **b)** Fluorescencia variable normalizada entre 0 y 1.

habilidad de  $Q_A$  de transferir electrones puede incrementar la presión de excitación sobre los centros de reacción a cualquier intensidad de luz (Iglesias-Prieto 1997).

En general, la adición de DCMU bloquea el flujo de electrones a partir de  $Q_A$  y, por ello, induce un rápido aumento en la fluorescencia desde  $F_0$  a  $J$ . Este efecto del DCMU sobre la fase O-J confirma la naturaleza fotoquímica de estos eventos, y puede ser utilizado como referencia de acumulación de daño en el lado aceptor del FSII. El máximo daño, cuando todos los FSII están cerrados, se observa en la curva como una simplificación de la secuencia a O-J, siendo J, I y P iguales. El daño progresivo se observaría como un aumento de la fluorescencia en J [aumento de  $V(j)$ ].

Otro de los efectos de la temperatura detectados en este trabajo, sobre la curva de inducción registrada con el PEA es la aparición de un evento previo al J, denominado K, asociado a una posterior caída de la señal de fluorescencia. Schreiber *et al.* (1977) sobre *Tidestromia oblongifolia* y tres especies de *Atriplex* y Havaux (1993) sobre hojas de *Solanum tuberosum* L., encontraron esa misma respuesta y relacionaron la caída de fluorescencia posterior a K, al daño causado por temperatura elevada sobre el lado de oxidación del agua en el FSII. Para verificar esta hipótesis Guissé *et al.* (1995) estudió el efecto de hidroxilamina ( $NH_2OH$ ) sobre la inducción de hojas de *Solanum tuberosum* L. y de *Pisum sativum* L. estresadas por temperatura [la  $NH_2OH$  es un donador de electrones (Trebst 1974, 1980, en Guisé *et al.* 1995)], y encontró que cuando las hojas son estresadas por temperatura después de un tratamiento con  $NH_2OH$  no presentan la caída posterior al evento K. Esto pareció estar asociado con la restauración, por  $NH_2OH$ , de la donación de electrones que quedó interrumpida por una inhibición temporal del funcionamiento del complejo que regula la hidrólisis del agua.

Por otra parte, Iglesias-Prieto (1997), al infiltrar las células de *S. kawagutii* con  $NH_2OH$  provocó en la curva de inducción la aparición del evento K (Fig. 6.1) y la posterior reducción de la señal de fluorescencia, explicando esta respuesta como la inducción de daño en el lado donador. Utilizando este efecto de la  $NH_2OH$  sobre la curva de inducción como referencia para explicar la transformación gradual de la secuencia O-J-I-P a O-K-J-I-P, obtenida en los tratamientos a temperaturas elevadas y en oscuridad, demostró la aparición

de daño en el lado donador del FSII relacionado con el aumento de la temperatura. Achnine *et al.* (1998) describió una fuerte correlación entre las curvas de inducción de cloroplastos aislados de espinaca tratados con Tris, con  $\text{NH}_2\text{OH}$  (ambos inhibidores conocidos del complejo de evolución de oxígeno, Britt 1996 en Achnine *et al.* 1998), y con un herbicida natural que extrajo de *Cedrela odorata* (Meliaceae) denominado OdoratoI, demostrando así el mecanismo de inducción de daño sobre el lado donador del FSII. En los tres casos claramente se observó el evento K.

Los procesos implicados en dicho mecanismo se especula están relacionados con una posible acumulación de centros de reacción “cerrados” (para una explicación más detallada ver el Anexo), del tipo  $\text{P}_{680}+\text{Phe}^-$  debido a una alta recombinación de carga, lo que puede originar un aumento rápido de la fluorescencia en la antena (evento K). La causa de esta acumulación de FSII cerrados estaría relacionada con la inhibición del sistema de hidrólisis del agua. Se ha propuesto también que el tratamiento de alta temperatura además de inhibir la donación de electrones desde el complejo de hidrólisis del agua, también podría inhibir parcialmente el transporte de electrones entre  $\text{PPhe}^-\text{Q}_a\text{Q}_b$  y  $\text{PPheQ}_a\text{-Q}_b$ . Tal inhibición conduce a la acumulación de  $\text{P}_{680}+\text{Phe}^-$ , lo cual puede explicar tanto la desactivación de Fm como la aparición de K (Guissé *et al.* 1995).

Los eventos de la curva de inducción reflejan la cinética y heterogeneidad involucrada en la reducción del reservorio de plastoquinona con los electrones provenientes del lado donador. Además, estos eventos de inducción se han podido utilizar como un sensible indicador para investigar el aparato fotosintético *in vivo* bajo condiciones fisiológicas.

### **Localización del daño**

Consistente con los resultados de Iglesias-Prieto (1997), en este estudio se encontró un incremento de la fluorescencia en la fase fotoquímica de la curva de inducción asociado al aumento de la temperatura, tanto en los tratamientos con 15 min de exposición como en los de 45 min. Además, en la mayoría de las muestras mantenidas en oscuridad, se observó la presencia de un evento anterior al J, el evento K, ya documentado también como asociado al incremento de la temperatura (Guissé *et al.* 1995, Iglesias-Prieto 1997).

Una de las respuestas más generales de los dinoflagelados ante temperaturas elevadas fué el aumento relativo del evento J de la secuencia O-J-I-P. En el caso de las cuatro especies analizadas aquí, claramente se confirmó el mecanismo de daño en el lado aceptor conforme se incrementó la temperatura, el aumento en el evento J fué análogo al reportado cuando hay daño en el lado aceptor (Achnine *et al.* 1998, 1999, Iglesias-Prieto 1997, Strasser *et al.* 1995).

Consistente con los resultados de Guissé *et al.* (1995) en plantas verdes y de Iglesias-Prieto (1997) en dinoflagelados simbiontes, lo que se encontró al examinar las cuatro especies de dinoflagelados fué también la transformación gradual de la secuencia O-J-I-P a O-K-J-I-P en los tratamientos a temperatura elevada de muestras mantenidas en oscuridad. Con excepción *S. corculorum*, las otras tres especies presentaron la característica caída de fluorescencia que le sucede al evento K por efecto de la temperatura, señalando así un daño en el lado donador del FSII. *S. pilosum* también mostró daño en el lado donador a temperatura elevada en las muestras bajo luz subsaturante.

En *S. pilosum* y *S. pulchrorum* mantenidos en oscuridad y expuestos por sólo 15 min a las temperaturas experimentales se observó hasta los 39°C una acumulación de daño en el lado aceptor, y de 40°C en adelante la presencia del evento K en la curva de inducción evidenció la presencia de daño en el lado donador del FSII (Fig. 5.1).

En los tratamientos de 45 min, se puede especular que la ausencia del evento K en las muestras expuestas a la luz, se debió a una protección parcial de la actividad del FSII por la luz subsaturante (Figs. 5.5b y 5.7b). Tal mecanismo no ha sido descrito todavía, sin embargo Weis (1982, en Srivastava y Strasser 1995) sugirió la importancia de la concentración de protones y cationes metálicos del medio para la estabilidad de los cloroplastos ante la temperatura. Posiblemente la luz estabiliza las membranas tilacoidales al crear un gradiente de protones y mantener el equilibrio iónico. Así mismo Srivastava y Strasser (1995) en los tratamientos de *Pisum sativum* a temperatura alta (42°C) en presencia de luz subsaturante, encontraron que las alteraciones en las reacciones del FSII fueron considerablemente menores indicando que la exposición previa a la luz, de algún modo induce una protección al aparato fotoquímico contra la inactivación por temperatura. Esta

protección sin embargo, no había sido descrita para organismos unicelulares, pero sí hemos podido detectarla en los dinoflagelados analizados aquí, exceptuando *S. pilosum* (Fig. 5.4b).

La heterogeneidad del FSII es uno de los posibles factores que pueden explicar la protección parcial que se detectó cuando las muestras se mantuvieron expuestas a la luz. Según Neale y Melis (1990), esta heterogeneidad es producto de (1) la variación en el tamaño de la antena considerándose como FSII $_{\alpha}$  aquellos centros con antena grande y como FSII $_{\beta}$  los de antena pequeña (con alrededor de 250 y 120 moléculas de clorofila *a* y *b* respectivamente); y (2) también de la presencia de diferente actividad de transferencia de electrones entre Q $_A$  y Q $_B$ , definiéndose dos tipos, los FSII reductores de Q $_B$  y los FSII no reductores de Q $_B$  (inactivos). Precisamente Neale y Melis (1990), en células intactas de *Chlamydomonas reinhardtii* cultivadas bajo luz subsaturante, encontraron en los análisis de las curvas de inducción de fluorescencia después de un tratamiento con luz saturante: 1) una rápida fotoinhibición de los FSII $_{\alpha}$ , mientras que el contenido de FSII $_{\beta}$  permaneció más o menos constante; y 2) una conversión de los FSII $_{\beta}$  no reductores de Q $_B$  a reductores de Q $_B$ . Tales resultados también son consistentes con mediciones previas en tilacoides de espinaca tratados con luz saturante (Cleland *et al.* 1986, en Neale y Melis 1990) y que muestran que el daño de fotoinhibición está asociado a una reducción preferencial de la fracción de FSII $_{\alpha}$ .

La similitud que se ha encontrado en general en las ya citadas respuestas fisiológicas de tilacoides de plantas superiores, algas verdes y dinoflagelados, nos permite suponer que en el caso de los dinoflagelados simbioses también es posible explicar esta protección parcial ante luz subsaturante, por el incremento de los FSII $_{\beta}$  que compensa la pérdida de separación de carga primaria por fotoinhibición de los FSII $_{\alpha}$ .

La señal de fluorescencia registra la mezcla de las respuestas de todos los tipos de centros de reacción presentes en la población de células examinadas. Tanto la frecuencia relativa de FSII abiertos y cerrados, como el efecto diferencial de los FSII inactivos y del lado aceptor de electrones del FSI (Strasser *et al.* 1995). Como FSII inactivos se consideran los que son incapaces de transferir electrones de Q $_A$ - a Q $_B$ , los electrones se acumulan en Q $_A$  rápidamente bajo iluminación y esto se refleja en el incremento de la fluorescencia inicial

desde  $F_0$  a  $F_1$  (o evento I de la curva de inducción) (Neale y Melis 1990). Por ello, la acumulación de daño en el lado aceptor del FSII no necesariamente implica que el efecto de la temperatura se localiza en el FSII. Cualquier daño que induzca bloqueos en la transferencia de electrones va a verse reflejado en la acumulación de FSII inactivos.

En general y de acuerdo a los estudios citados anteriormente, es común relacionar el aumento del evento J (por efecto de la intensidad de luz) con un daño en el lado aceptor del FSII; y la aparición del evento K (por efecto de la temperatura) con un daño en el lado donador. En estos tratamientos la intensidad de luz de excitación con que se midió la fluorescencia no cambió, sin embargo las curvas de inducción mostraron los dos efectos: el aumento de J tanto en las muestras bajo luz subsaturante, y la aparición de K en las mantenidas en oscuridad. Mas aún, independientemente del sitio de daño, la acumulación de  $Q_A^-$  se observó en ambos tratamientos, y esta dificultad de transporte de electrones más allá de  $Q_A^-$  puede incrementar efectivamente la presión de excitación sobre el FSII bajo cualquier intensidad de luz (Iglesias-Prieto 1997), es decir, se puede incrementar la sensibilidad a presentar fotoinhibición por efecto de la temperatura. Esta relación temperatura-luz se analizó con más detalle en la tercera parte de este trabajo.

Esta incertidumbre ha estado alimentando una controversia sobre la localización del daño inicial por temperatura elevada. Iglesias-Prieto (1995) y Warner *et al.* (1996), sugirieron que el sitio inicial de acción de la temperatura elevada es sobre el complejo de evolución de oxígeno y el centro de reacción del FSII. Sin embargo Jones *et al.* (1998) propusieron que el daño inicial se localiza en la actividad de Rubisco, antes de que sea detectable sobre la tasa de transporte de electrones en el FSII. Estos autores sostienen que el daño en el FSII es un efecto secundario y una consecuencia de las limitaciones del transporte de electrones. Los resultados que se obtuvieron en este trabajo con las muestras expuestas a la luz podrían apoyar la hipótesis de Jones *et al.* (1998). Sin embargo esta propuesta no es consistente con los datos que aquí se obtuvieron en las muestras mantenidas en oscuridad. En estas muestras se observó daño en el FSII sin tener ninguna evidencia de que la actividad de Rubisco estuviera afectada. Obviamente las condiciones de oscuridad no proveen la energía requerida para la total inducción, así como tampoco para el transporte de electrones más

allá del reservorio de plastoquinona y ni para la activación de las enzimas del ciclo de Calvin. Por lo tanto, nuestros resultados confirman lo que Iglesias-Prieto (1995, 1997) y Warner *et al.* (1996, 1999) han propuesto, que el sitio inicial de daño por estrés térmico se localiza en el FSII del aparato fotosintético.

### **Variación de $V(j)$ y el área sobre la curva**

El progresivo incremento del evento J probablemente refleja la formación de centros de reacción del FSII no reductores de  $Q_B$ , además de la acumulación de  $Q_A^-$  (Iglesias-Prieto 1997), consistente con los cambios detectados en el área sobre la curva de inducción. La disminución del área sobre la curva de inducción que se observó asociada al aumento de temperatura refleja una reducción de la capacidad de transporte de electrones del FSII, pues se considera que el área es proporcional a dicha capacidad. Estos resultados fueron similares a los reportados por Iglesias-Prieto (1997) para *S. kawagutii*.

Los resultados también mostraron que aún cuando las exposiciones a temperaturas elevadas ocasionan reducciones similares en la cosecha cuántica de células en oscuridad y bajo luz, este efecto se debe a mecanismos diferentes confirmando de nuevo los resultados obtenidos previamente por Iglesias-Prieto (1997). Las reducciones de  $F_v/F_m$  en células mantenidas en la oscuridad están asociadas con incrementos de  $F_o$  sin variación notable en  $F_m$ , mientras que en células con luz ocurre lo contrario,  $F_v/F_m$  decrece asociada también a una disminución de  $F_m$ . Estos incrementos de  $F_o$  resultan probablemente de la desconexión de los complejos de antena del centro de reacción (Iglesias-Prieto 1997). Una vez desconectados antena y centros de reacción hay menos probabilidades de que un excitón alcance un centro de reacción abierto, y esto resulta en valores de  $F_o$  mayores. La reducción de  $F_m$  en las células con luz podría deberse a una desactivación no fotoquímica (para una explicación más amplia ver el Anexo) con tiempo de relajación más largo que el periodo de adaptación a la oscuridad empleado aquí (5 min) (Iglesias-Prieto 1997).

De las cuatro especies de dinoflagelados en cultivo sólo *S. corculorum* presentó una marcada diferencia con respecto al comportamiento de las otras especies, principalmente en las células mantenidas en oscuridad. En esta especie  $F_o$  no aumentó como ocurrió en los otros tres casos, sino que se mantuvo más bien constante.  $F_m$ , sin embargo, comenzó a

disminuir después de los 29°C, indicando la presencia de un desactivador de la fluorescencia seguramente no fotoquímico. En general, las variaciones de  $F_o$  y  $F_m$  coincidieron con las que observaron Guissé *et al.* (1995) quienes proponen además que una disminución de la fluorescencia variable relativa a 40°C en las muestras mantenidas en oscuridad indica ausencia de restauración en el transporte de electrones, después del complejo de evolución de oxígeno. Al aumentar la temperatura o el tiempo de exposición a temperaturas altas, la inducción de fluorescencia exhibió cambios como: (1) el incremento en la fluorescencia inicial mínima  $F_o$ ; (2) un decremento en la fluorescencia máxima  $F_m$ ; y (3) una gran desactivación en toda la inducción de la fluorescencia variable.

En promedio el incremento de  $V(j)$  se inició a partir de los 34°C. La especie que presentó primeramente dicho aumento fue *S. pilosum* a los 31°C. Y la especie que mostró una respuesta más retardada fue *S. pulchrorum* a los 35°C (Fig. 5.8).

Cuando se compararon los tratamientos con 15 y 45 min de exposición (Fig. 4.9), se confirmó el efecto multiplicativo del tiempo en la acumulación de daño, puesto que se observó que las exposiciones breves a temperaturas altas resultaron en respuestas equivalentes a las exposiciones más largas a temperaturas menores.

Se consideró la temperatura donde inicia la disminución de  $F_v/F_m$  ( $T_i$ ), como señal de sensibilidad, y la temperatura crítica donde  $F_v/F_m$  desciende en un 50 % ( $T_{c50}$ ), como señal de tolerancia (Tabla 6.1). Los valores obtenidos de  $T_i$  y  $T_{c50}$  para las cuatro especies examinadas y comparándolos con otros valores obtenidos por Iglesias-Prieto (1997) muestran una amplia variación entre especies con respecto a su sensibilidad al estrés térmico. El hecho de que las cuatro especies de dinoflagelados analizadas se encontraban en condiciones homogéneas de cultivo, garantiza la ausencia de cualquier tipo de aclimatación a condiciones diferentes previas a los tratamientos aplicados.

El haber confirmado el sitio de daño por efecto de la temperatura en los dinoflagelados simbioses de coral y encontrado principalmente tales diferencias en la sensibilidad térmica tiene implicaciones a nivel ecológico sumamente importantes. Las variaciones en el grado de afectación del fenómeno de blanqueamiento de coral sobre las diferentes especies que

constituyen la comunidad arrecifal son muy grandes, y hasta ahora, no ha podido encontrarse ningún patrón capaz de explicar, si no toda, parte de esta variación.

Los estudios realizados hasta la fecha que describen la variabilidad entre especies con respecto al grado de afectación del fenómeno de blanqueamiento, han resaltado que cuando ocurren episodios de blanqueamiento hay especies de corales que no se blanquean siendo vecinas de otras que sí lo hacen y viviendo bajo condiciones similares.

**Tabla 6.1** Temperaturas críticas  $T_i$  y  $T_{c50}$  obtenidas de los tratamientos a diferentes temperaturas (45 min de exposición).

Dinoflagelado	Hospedero	$T_i$ (°C) $\Delta F/Fm'$	$T_i$ (°C) $Fv/Fm$	$T_{c50}$ (°C) $\Delta F/Fm'$	$T_{c50}$ (°C) $Fv/Fm$
<i>S. pilosum</i> (A)	<i>Zoanthus sociatus</i> (Zoantido del Caribe)	31	31	39	38.5
<i>S. pulchrorum</i> (B)	<i>Aiptasia pulchella</i> (Anémona de Hawaii)	33	33	36.5	39.5
<i>S. corculorum</i> (A)	<i>Corculum cardissa</i> (Bivalvo del Indo-Pacífico)	34	34	35.5	40
<i>Symbiodinium</i> sp. (B)	<i>Pocillopora damicornis</i> (Coral del Pacífico)	35	35	40	40
<i>S. microadriaticum</i> (A)♦	<i>Cassiopeia xamachana</i> (Medusa del Caribe)		32		34
<i>S. kawagutii</i> (C) *	<i>Montipora verrucosa</i> (Coral del Indo-Pacífico)	35	35	37	37

♦ Iglesias-Prieto (datos no publicados),

\* Iglesias-Prieto, 1997.

Las letras entre paréntesis designan los filotipos.

El rango fisiológico del holosimbionte (asociación completa) a lo largo de un gradiente ambiental debe estar regulado por la interacción entre las fisiologías y rangos de tolerancia del hospedero y del alga simbiote. Profundizar en el conocimiento del mecanismo de daño por efecto de la temperatura de uno de los componentes de la simbiosis, así como del grado

de variabilidad genética de sus rangos de tolerancia al aumento de temperatura ofrece información muy relevante para conocer tanto las condiciones ambientales idóneas para la aparición de eventos de blanqueamiento, como su variabilidad y grado de afectación sobre la comunidad arrecifal, como ha propuesto Iglesias-Prieto *et al.* (1992).

La pérdida de la actividad fotosintética de los dinoflagelados simbiotes ha sido implicada como el evento clave que desencadena la ruptura de la asociación simbiótica y por lo tanto del blanqueamiento de coral. (Iglesias-Prieto *et al.* 1992; Jones *et al.* 1998; Warner *et al.* 1996, 1999).

El fuerte desarrollo de una técnica altamente informativa y no destructiva como es la interpretación de la señal de fluorescencia, que permite examinar en detalle la fisiología de los dinoflagelados simbiotes “*in vivo*” e “*in situ*”, además de detectar su variación a lo largo del tiempo y cuantificar diferencias interespecíficas significativas frente a la variación ambiental, sitúa al estudio de la fisiología de los simbiotes en un lugar privilegiado para profundizar en el conocimiento del fenómeno de blanqueamiento de coral, al igual que muchos otros procesos relacionados con la distribución y diversidad de especies de la comunidad arrecifal.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### Variación interespecífica de la sensibilidad térmica

Las observaciones de campo indican que no todas las especies de corales muestran la misma susceptibilidad al blanqueamiento, lo que podría ser explicado por la existencia de una gran variación en la sensibilidad y rango de tolerancia de las algas simbiotes al aumento de temperatura (Warner *et al.* 1996). Esta sugerencia fue explorada por Rowan *et al.* (1997), quienes propusieron que los patrones de blanqueamiento diferencial de las colonias de *Montastrea faveolata* creciendo a diferentes profundidades, y presumiblemente bajo diferentes regímenes lumínicos, son el resultado de la presencia de diferentes filotipos de algas simbiotes. A partir de estas observaciones se propuso que las algas del filotipo A serían las más resistentes al estrés térmico, mientras que las menos resistentes serían las algas del filotipo C (Rowan *et al.* 1997). Los resultados obtenidos en la primera parte del presente trabajo claramente indican que existe una gran heterogeneidad en las sensibilidades térmicas de los dinoflagelados simbiotes en cultivo. Con el objetivo de examinar esta variabilidad en corales intactos se determinaron los patrones de inactivación del FSII en función de la temperatura en simbiotes de 13 especies de coral, un hidrocoral y de un zoántido. Para caracterizar de la mejor manera posible la identidad genética de los simbiotes de las muestras utilizadas, LaJeunesse (sin publicar) empleó una técnica que permite distinguir entre algas pertenecientes al mismo filotipo. De esta manera se compararon los patrones de migración de las secuencias ITS amplificadas con PCR, por electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (Fig. 5.11). Utilizando los patrones de migración de muestras de cultivos conocidos, es posible identificar 4 genotipos dentro de cada uno de los filotipos. En los corales analizados en el presente trabajo se encontraron algas pertenecientes a 5 de los 12 genotipos caracterizados hasta el momento. Por otro lado, se encontraron algas dentro del filotipo C con genotipos aun no descritos en la colección de referencia (C? y C?' en la Fig. 5.11).

La estabilidad térmica de las membranas biológicas depende de su composición y de los efectos cooperativos de numerosas interacciones no-covalentes. La fluidez de la membrana es dependiente de la temperatura, de forma que cuando la temperatura alcanza valores mayores de un punto crítico, ésta experimenta una transición de fase de un estado fluido pero ordenado, a un estado desordenado. Los cambios funcionales asociados con cambios

estructurales inducidos por calentamiento se examinaron analizando la variación en las tasas de transporte de electrones en membranas tilacoidales aisladas de cloroplastos después de la incubación a temperaturas elevadas (Gounaris *et al.* 1983). Cao y Govindjee (1990) sugirieron que la inhibición de la transferencia de electrones entre  $Q_A$ - $Q_B$  podría resultar de un cambio estructural en las proteínas D1 y D2 resultado de una reorganización de las membranas tilacoidales inducidas por alta temperatura. De esta manera, al ser una respuesta funcional, la señal de fluorescencia de la clorofila *a* puede ser usada como una sonda interna del estado de organización de la membrana. Schreiber y Berry (1977) propusieron que la pérdida de fluorescencia variable en hojas expuestas a temperaturas elevadas responde a una pérdida de organización de dichas membranas. La transición de fase de las membranas fotosintéticas puede ser descrita por medio de un modelo sigmoide de manera análoga al que se emplea para describir la transición de fase de los ácidos nucleicos durante la desnaturalización térmica (Marmur y Doty 1962 citado en Voet y Voet 1995). En plantas terrestres la exposición a la luz resulta en incrementos de hasta 6°C en la temperatura de transición ( $T_{c50}$ ) (Schreiber y Berry 1977). Este cambio en el punto de fusión de las membranas fotosintéticas ha sido interpretado como una adaptación de las plantas terrestres a la covarianza de la temperatura y la irradiancia en algunos ambientes (Havaux 1993).

Los resultados del presente trabajo indican que en la mayoría de los casos la exposición a la luz no incrementó el punto de fusión de las membranas sino que produjo el efecto opuesto. En aquellos casos en donde se incrementó el punto de fusión, la iluminación sólo produjo una protección limitada. Los valores menores de  $T_{c50}$  para  $\Delta F/F_m'$  relativo a los de  $F_v/F_m$  observados en la mayoría de las algas de los invertebrados estudiados en el presente trabajo (Tabla 5.2) es consistente con las observaciones que sugieren que en presencia de luz subsaturante, el estrés térmico resulta en respuestas similares a las de la fotoinhibición (Iglesias-Prieto 1997; Warner *et al.* 1999). Como se discutió previamente, en dinoflagelados el origen de la pérdida de fluorescencia variable en muestras expuestas a altas temperaturas en la oscuridad es un incremento en  $F_o$  mientras que en aquellas que son expuestas a la luz se debe a decrementos de  $F_m$  (Iglesias-Prieto 1995). La falta de correlación existente entre los valores de  $T_{c50}$  de  $\Delta F/F_m'$  y de  $F_v/F_m$  de las distintas

especies, indica que el punto de fusión de las membranas no es un buen predictor de la sensibilidad al estrés lumínico del aparato fotosintético.

La presencia de poblaciones polimórficas de algas simbiotes en *M. Faveolata* y los patrones de abundancia relativa de los diferentes filotipos, han sido interpretados como respuestas a diferencias en los regímenes lumínicos a los que están expuestas las colonias. En general las colonias expuestas a mayor irradiancia presentan simbiotes pertenecientes al filotipo A, las colonias expuestas a ambiente intermedios presentan poblaciones polimórficas con distintas proporciones de algas de los filotipos A y B, mientras que las colonias expuestas a bajas irradiancias poseen simbiotes del filotipo C (Rowan *et al.* 1997). Durante un evento natural de blanqueamiento de coral, las colonias con simbiotes del filotipo C mostraron mayor sensibilidad al estrés térmico, mientras que las del filotipo A fueron más resistentes. Estas observaciones fueron interpretadas como evidencia del efecto sinérgico de la luz y la temperatura durante el blanqueamiento de coral (Rowan *et al.* 1997). La comparación de las respuestas  $T_{c50}$  para  $F_v/F_m$  de las algas pertenecientes a los diferentes filotipos indica (Tabla 5.2 y Fig. 5.14), contrario a lo reportado por Rowan *et al.* (1997), que en promedio las algas del filotipo A son más sensibles al estrés térmico. De la misma manera, los resultados relativos a la  $T_{c50}$  de  $\Delta F/F_m'$  muestran que las algas del filotipo C son en promedio más tolerantes que las de los otros dos filotipos, en contradicción con lo propuesto por Rowan *et al.* (1997). Cabe resaltar que las muestras utilizadas en el presente estudio fueron colectadas de ambientes lumínicos similares.

Los análisis de las variaciones de los indicadores  $T_{c50}$  y  $T_i$  para  $F_v/F_m$  y  $\Delta F/F_m'$  entre las algas de un mismo filotipo mostraron diferencias significativas entre las temperaturas críticas de los simbiotes de los invertebrados estudiados. Aunque estas diferencias no fueron significativas para todos los parámetros, se observó que los diferentes filotipos presentan respuestas heterogéneas en, por lo menos, un indicador (Fig. 5.14). Estos resultados son consistentes con las observaciones de Iglesias-Prieto y Trench (1994, 1997) quienes ya reportaron previamente una falta de correlación entre la filiación de las algas y los rangos de tolerancia fisiológica. En el caso de los invertebrados en simbiosis con algas del filotipo B se observó que todas las especies estudiadas presentaron dinoflagelados

genéticamente indistinguibles con el genotipo B1. Solamente en el caso del hidrocoral *M. complanata*, se observó una población polimórfica con mezcla de genotipos B1 y B4. El análisis de las variaciones de  $T_{c50}$  para Fv/Fm de las algas B1 indicó una homogeneidad de las respuestas (Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ) consistente con el análisis genético, sin embargo la prueba de las medianas indica que un aumento en el tamaño de la muestra probablemente resulte en diferencias significativas ( $\chi^2$  test,  $p < 0.05$ ). Como se observa en la Fig 5.14 esta diferencia probablemente resulte de las variaciones de *M. complanata*, cuya  $T_{c50}$  para Fv/Fm fue aparentemente menor. La aparente uniformidad de respuesta de las algas B1 desaparece cuando se consideran los otros indicadores, pues en todos los casos las diferencias entre las respuestas de las algas fueron significativas. Las variaciones observadas pueden ser el resultado de variaciones genéticas aun no resueltas o bien de la interacción con hospederos diferentes. Pese a que por el momento no es posible distinguir entre ambas posibilidades, bajo las condiciones en las que se realizaron los experimentos, probablemente el indicador  $T_{c50}$  para Fv/Fm sea el mejor descriptor de la estabilidad térmica de las membranas de los dinoflagelados, ya que todos los otros indicadores potencialmente son más susceptibles a reflejar variaciones fisiológicas del hospedero.

En su conjunto, los indicadores de estrés térmico empleados en el presente trabajo, indican que existen diferencia de hasta 4°C entre las temperaturas críticas para las diferentes especies de algas simbiotes de cada filotipo (A, B, C) (Tabla 5.2).

En la actualidad existe un consenso general entre los investigadores, que relaciona la presencia de temperaturas superficiales del agua anómalamente elevadas y la aparición de eventos de blanqueamiento de corales (Glynn 1993, 1996, Strong *et al.* 1998, Brown 1999, Hoegh-Guldberg 1999). Esta correlación tiene implicaciones muy severas si se considera que los modelos de cambio climático global predicen que este tipo de temperaturas anómalamente elevadas serán mas frecuentes en el futuro. Se han considerado las simulaciones de temperaturas superficiales del mar que se han obtenido de modelos de circulación global, como por ejemplo el modelo ECHAM4/OPYC3 IS92a, el cual es utilizado para estudios de variabilidad y predicción climática, y estudios sobre el cambio climático global con alto grado de precisión. Este modelo se basa en las tendencias de

cambio de la concentración de gases invernadero y asume una concentración de CO<sub>2</sub> para el año 2100 del doble al correspondiente de 1975. Los datos de temperatura generados por este modelo para cada mes desde 1860 a 2100 muestran una correspondencia cercana con los registros actuales de la temperatura del mar. Otro de los modelos, el ECHAM3/LSG IS92a, también considera los cambios en los gases invernadero y simula con alto grado de precisión el fenómeno de El Niño. Este modelo estima los rangos de variación de la temperatura del mar. Ambos modelos simulan el número de eventos de blanqueamiento que habría por década (desde 1900 a 2100), consideran para una localidad específica un solo umbral térmico e interpretan cada temperatura proyectada superior al umbral térmico como señal de un evento de blanqueamiento. Para la Gran Barrera Arrecifal por ejemplo, la predicción de blanqueamientos cada año desde el 2020 con elevaciones de temperatura entre 1 y 2°C por encima del umbral térmico (Hoegh-Guldberg 1999).

En este sentido, algunos autores han intentado modelar posibles escenarios del efecto que tendrá el incremento de la temperatura superficial en los sistemas arrecifales (Smith y Buddemeier 1992, Hallock 1997, Hoegh-Guldberg 1999). En general el efecto de los incrementos en la temperatura se considera que será dependiente de la amplitud de los cambios y de la tasa con la que estos ocurran. Dentro de estos posibles escenarios se incluyen: a) reemplazamiento de los individuos de una misma especie por otros más tolerantes a las temperaturas elevadas, sin mayor efecto sobre la estructura comunitaria; b) incrementos en las tasas de recambio de las comunidades como resultado de un incremento en las tasas de mortalidad derivada de la exposición a temperaturas elevadas, con un consecuente cambio en la estructura de edades de las poblaciones; c) cambio de estrategia, en la que las especies más tolerantes a la temperatura reemplazarán a aquellas con menor tolerancia; y finalmente d) cambio de fase, en el que los corales son reemplazados por otro tipo de organismos como las algas (Smith y Buddemeier 1992, Hoegh-Guldberg 1999, Done 1999 en Hoegh-Guldberg 1999).

Recientemente Hoegh-Guldberg (1999) intentó correlacionar la ocurrencia de fenómenos de blanqueamiento de coral con las temperaturas superficiales proyectadas por este tipo de modelos de cambio climático global, concluyendo que la gran mayoría de los arrecifes de

coral experimentarán condiciones por encima de sus límites de tolerancia durante la mayor parte del año a partir de la segunda mitad del siglo XXI, sugiriendo que los corales y sus simbioses serán incapaces de aclimatarse o adaptarse lo suficientemente rápido como para contrarrestar el efecto del acelerado calentamiento de los océanos tropicales. El efecto que tendrán sobre las comunidades coralinas los escenarios predichos por los modelos de cambio global son motivo de un intenso debate entre la comunidad científica (como ejemplo ver el debate entre Done y Hoegh-Guldberg en internet [http://www.planetark.org/daylynewsstory.cfm?newsid\\_5117](http://www.planetark.org/daylynewsstory.cfm?newsid_5117), donde Done afirma en contra de lo propuesto por Hoegh-Guldberg, que los corales tienen la capacidad de aclimatarse y sobrevivir a las condiciones de temperatura elevada que se ha proyectado). En ausencia de datos precisos sobre los límites de tolerancia de las distintas especies de coral, la mayor parte de este debate es especulativo. Al no conocer las capacidades de aclimatación al estrés térmico tanto de los invertebrados como de los simbioses, difícilmente se puede predecir si éstos serán capaces de aclimatarse a las condiciones que prevalecerán en el futuro. Basados en la correlación existente entre observaciones de NOAA sobre las anomalías térmicas en regiones arrecifales y reportes de campo de eventos de blanqueamiento, se han establecido temperaturas umbral a partir de las cuales los corales de determinada zona presentarán síntomas de blanqueamiento. En particular Hoegh-Guldberg (1999) consideró a las temperaturas máximas del verano como los parámetros clave para predecir el blanqueamiento de coral. Estos umbrales térmicos fueron derivados del grupo de datos de la IGOSN-nmc (Integrated Global Ocean Services System: <http://ioc.unesco.org/igosweb/igoshome.htm>), así como de reportes en la literatura y en internet de eventos de blanqueamiento. Estos reportes por lo general resultan de observaciones casuales, y carecen del rigor de un estudio programado en contra de lo que asume Hoegh-Guldberg (1999). Por tanto, no considero confiable el señalar estos umbrales térmicos como los detonantes de eventos de blanqueamiento a la escala arrecifal. Considerando la gran variabilidad en las respuestas fisiológicas de invertebrados ante el estrés térmico que se encontró en el presente estudio, y que incluye diferencias entre las temperaturas críticas de hasta 4°C, es demasiado arriesgado afirmar, por el momento, que cuando se alcancen los mencionados umbrales térmicos en el futuro como resultado del calentamiento global serán afectadas comunidades

enteras, dando paso tal vez al más drástico de los escenarios antes descritos llamado cambio de fase.

Existen muy pocos trabajos en la literatura donde se describan las características biológicas del evento de blanqueamiento (cobertura, distribución específica etc), junto con información relevante sobre la intensidad y duración de las anomalías térmicas. Este tipo de estudios nos permitirían predecir de una manera mas objetiva los umbrales térmicos inductores de eventos mayores de blanqueamiento de corales a la escala arrecifal. Como se mencionó anteriormente la mayoría de los reportes de blanqueamiento son el resultado de observaciones casuales y en muy pocas localidades se cuenta con información previa para comparar tanto el efecto del blanqueamiento como la intensidad de la anomalía térmica. Por ejemplo, los estudios de Davies *et al.* (1997) describen las áreas de estudio basados solamente en la abundancia del género dominante, aunque presentan datos sobre la abundancia de colonias blanqueadas y recientemente muertas, no existen estudios previos del área para contrastar los resultados. Recientemente Loya *et al.* (2000) estudiaron el efecto de un blanqueamiento masivo en un arrecife de Okinawa. Esta zona había sido objeto de estudios detallados entre 1995 y 1999. Aunque no se presentaron cambios en la comunidad entre 1995 y 1997, en 1999 después del evento masivo del 98, ocurrieron cambios significativos a nivel comunitario con decrementos en la cobertura, el número de especies y la densidad de las colonias de 73%, 61% y 50% respectivamente, lo cual indica que la mortalidad de las colonias fue claramente específica. Este tipo de estudios son muy necesarios para el diseño de modelos capaces de predecir el efecto que tendrá sobre las comunidades arrecifales el cambio climático global.

En la actualidad parece existir un consenso en lo relativo al mecanismo responsable del blanqueamiento de coral. La pérdida de la capacidad fotosintética de las algas simbiotes, ya sea por daño a nivel de Rubisco (Jones *et al.* 1998) o por la inactivación del FSII (Iglesias-Prieto 1997; Warner *et al.* 1999), parece conducir a una reducción en las densidades poblacionales de las algas. Por otro lado aún no conocemos los detalles de los procesos celulares que conducen a la muerte de las colonias. Es posible especular que la pérdida de actividad fotosintética y la subsecuente reducción en el número de simbiotes

sea un proceso reversible, mientras que la mortalidad de las colonias, es decir, la irreversibilidad del evento de blanqueamiento, resultará de exposiciones a temperaturas por encima del límite de tolerancia del hospedero y, por lo tanto, podrá tratarse de un fenómeno independiente.

### **Relación entre los efectos de la temperatura y la irradiancia**

Las respuestas fisiológicas de los dinoflagelados ante cambios ambientales quedaron reflejadas en la variación de los parámetros: cosecha cuántica máxima y efectiva; en la tasa de transporte de electrones; y en la magnitud de la desactivación no fotoquímica.

Debido a la gran correlación encontrada entre la tasa de transporte de electrones (ETR) y la evolución de oxígeno en función de la irradiancia (Pérez-Vivar, comun. pers.), caídas de ETR se han interpretado como una señal de fotoinhibición. Los resultados reflejan la existencia de daño asociado al aumento de temperatura que ha provocado esta disminución en ETR, y es análoga a la caída en la evolución de oxígeno descrita por Iglesias-Prieto *et al.* (1992) para *S. microadriaticum*. En este trabajo Iglesias-Prieto *et al.* demostraron que esta especie de dinoflagelado tiene un umbral de temperatura por encima del cual la fotosíntesis es severamente afectada.

En el caso de *Symbiodinium* sp. (aislado de *Pocillopora damicornis*) en cultivo, la fotosíntesis relativa (ETR relativo) mostró una relación recíproca entre los efectos de la temperatura y la irradiancia. Esta especie presentó un comportamiento proporcional a la irradiancia e inversamente proporcional a la temperatura posterior a los 32°C. La fotoprotección relativa ( $1-\Delta F/F_m'$ ) aumentó tanto al incrementarse la temperatura como la irradiancia.

En los casos de dinoflagelados simbiotes de los corales intactos *Porites astreoides*, *Diploria clivosa* y *D. strigosa*, ETR aumentó en función de la temperatura hasta un punto máximo después del cual disminuye, lo que indica presencia de fotoinhibición. Con respecto a la irradiancia ETR se comportó de manera similar a como lo hizo en *Symbiodinium* sp. (de *Pocillopora damicornis*) en cultivo. Los valores extremadamente bajos de ETR a partir de 37°C indican daños estructurales en las membranas.

La similitud entre los resultados de las mediciones en *Symbiodinium* sp. (de *Pocillopora damicornis*) y los obtenidos de mediciones sobre los corales intactos, evidencia la fuerte relación entre los efectos de la temperatura y la irradiancia sobre los dinoflagelados simbiotes, independientemente de que se encuentren aislados o dentro de su hospedero.

El aumento de la fracción de la excitación que es desactivada por vías no fotoquímicas es un indicador indirecto de estrés, en este caso por la temperatura. El aparato fotosintético desactiva por una vía alterna a la fotoquímica el exceso de excitación que no puede utilizar metabólicamente. En todos los casos, el notable incremento de la desactivación no fotoquímica que se presentó en las temperaturas más altas es señal de una total desorganización en las membranas tilacoidales (Gounaris *et al.* 1983).

Al considerar los resultados de esta tercera parte se puede concluir que el aumento de la temperatura induce sobre el fotosistema II una mayor sensibilidad ante la irradiancia, manifestándose ésto como un aumento en la evocación de vías fotoprotectivas para disipar la energía absorbida en exceso.

Se ha encontrado mayor evidencia de que la disipación de energía que hace aumentar a  $Q_E$  (desactivación dependiente de la energía) ocurre en la antena más bien que en el centro de reacción.

Aquellas especies que fueron capaces de disipar el exceso de energía a través de vías no fotoquímicas, protegieron al fotosistema II del daño por exposición a altas temperaturas, como lo propuso Warner *et al.* (1996) cuando evaluó los efectos de la temperatura elevada sobre la eficiencia fotosintética de cuatro diferentes especies de dinoflagelados en hospederos intactos.

La desactivación no fotoquímica se consideró un indicador de la presión sobre el fotosistema II en las condiciones experimentales. El aumento de esta vía fotoprotectiva así como el descenso en la tasa de transporte de electrones, muestran que conforme aumentó la temperatura hay un mayor daño por luz, y aumenta la fotoinhibición. La existencia de una relación sinérgica entre la temperatura y la luz indica que el estrés por temperatura estimula la sensibilidad de la especie ante la intensidad de luz.

Se han encontrado evidencias de que bajo condiciones de estrés térmico el FSII puede estar sujeto a presiones de excitación equivalentes a aquellas experimentadas bajo luz más intensa, ya que cualquier cambio en la temperatura resultará en cambios concomitantes en la presión de excitación sobre el FSII (Maxwell *et al.* 1995). Por otra parte, las pérdidas en la capacidad de reoxidación de  $Q_A$  son similares a las observadas durante la fotoinhibición del lado aceptor de FSII (Krause *et al.* 1990). Así, la pérdida de pigmentos en dinoflagelados simbioses observados en algunos eventos de blanqueamiento de coral puede representar un mecanismo de protección para aminorar la presión de excitación sobre el FSII (Maxwell *et al.* 1995).

Bajo luz supersaturante, los productores primarios evocan vías no fotoquímicas para la desactivación del exceso de excitación potencialmente dañino (Horton *et al.* 1996). Después de la absorción de la mayor parte de luz que puede ser utilizada a través del transporte de electrones fotosintético, varios mecanismos fotoprotectores pueden prevenir el daño por acumulación de energía de excitación en el aparato fotoquímico, por ejemplo cuando se encuentran bajo cierto estrés que fomenta la fotoinhibición.

Brown (1997) puntualizó cómo las señales de fotoprotección son una parte importante de la manera en que los corales y sus simbioses son capaces de limitar el efecto de blanqueamiento por estrés de temperatura y luz en el campo. Los componentes fotoprotectores (particularmente pigmentos carotenoides) en dinoflagelados juegan un papel importante al limitar la respuesta de blanqueamiento, la cual es probablemente evocada por una combinación de la temperatura elevada e irradiancia (Brown 1997).

Debido a la gran importancia de la presencia de los dinoflagelados en los invertebrados, especialmente los corales, es necesario una mayor atención hacia la manera en que estos organismos responden ante ciertas condiciones de estrés, ya que así serán buenos indicadores de cambios ambientales hacia condiciones subóptimas.

### **Relación entre los efectos de la temperatura y el tiempo de exposición**

Considerando la correlación encontrada entre el tiempo de exposición a una misma temperatura y la cosecha cuántica máxima, se puede concluir que las altas temperaturas a las que se sometieron las muestras, con exposiciones breves de 45 min podrían provocar un

efecto similar al que producirían aquellas temperaturas ligeramente por encima de la normal después de una exposición más larga. Así por ejemplo en el caso de *S. kawagutii* (Iglesias-Prieto, datos sin publicar), una temperatura de 32°C no ejerce ningún efecto sino hasta después de 5 horas, presentándose la misma caída de ETR que la observada después de una exposición de 45 min a 38°C. Para el desarrollo de modelos con cierta capacidad predictiva sería necesario el desarrollo de nuevos experimentos para describir la variación de ETR para cada temperatura en función del tiempo, comenzando por cada una de las especies presentadas aquí. Posteriormente, se podrán relacionar los datos de exposición breve con aquellas temperaturas que son más posibles de encontrar en el ambiente.

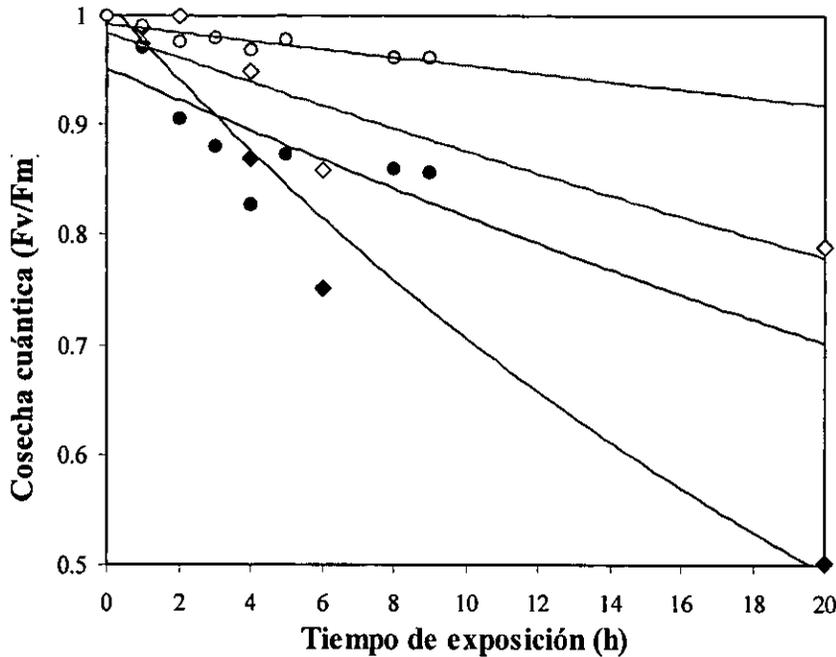
Al comparar la variación de la cosecha cuántica de *S. kawagutii* de *Montipora verrucosa* expuestos a 32°C (Iglesias-Prieto, datos sin publicar), con la obtenida en este trabajo para *Symbiodinium* sp. de *Porites astreoides* expuestos a 33°C, es evidente la protección presente en los tratamientos con iluminación previa. Las muestras que fueron expuestas a las mismas temperaturas en condiciones de oscuridad acumularon más daño en función del tiempo de exposición. Aún cuando las respuestas no coinciden exactamente a la misma temperatura, es posible interpretar los resultados comparando el efecto en cada especie.

El descenso de la cosecha cuántica máxima al 50% en *S. kawagutii* después de 20 horas a 32.5°C en oscuridad coincide con el efecto de una exposición de 45 min a 38°C (Fig. 6.2). El descenso de la cosecha cuántica máxima al 70% en *Symbiodinium* sp. de *Porites astreoides* después de 20 horas a 33°C en oscuridad corresponde al efecto de una exposición de 45 min a 35°C (Fig. 5.12).

Por lo tanto, podemos concluir que, las temperaturas elevadas a las que se expusieron en estos tratamientos por sólo 45 min, produjeron el efecto que ocasionaría una temperatura menor pero con un mayor tiempo de exposición.

Se ha especulado que el blanqueamiento puede ser inducido por exposiciones: (1) a corto plazo (1-2 días) a incrementos de temperaturas de 3 a 4°C por encima de la temperatura normal ambiente en verano; o (2) por exposiciones a largo plazo (varias semanas) a incrementos de 1 a 2°C. En su ambiente natural, los dinoflagelados simbiotes pueden

quedar expuestos a temperaturas elevadas por periodos substancialmente más largos, y una larga exposición a temperaturas de 27-30°C podría tener el mismo impacto que una exposición a corto plazo a temperaturas por encima de 30°C (Jokiel y Coles 1990).



**Fig. 6.2** Variación de la cosecha cuántica máxima relativa de dos especies en función del tiempo de exposición a 32.5°C de *S. kawagutii* de *Montipora verrucosa* (rombos) y a 33°C de *Symbiodinium* sp. de *Porites astreoides* (círculos). Símbolos negros de muestras en oscuridad, símbolos claros de muestras en la luz.

El examen de la respuesta fisiológica de dinoflagelados simbiotes ante exposiciones breves a temperaturas elevadas que difícilmente se encuentran en el ambiente, se hizo con la intención de inducir una respuesta más drástica que pudiera demostrar las diferencias interespecíficas entre las distintas especies de dinoflagelados simbiotes de invertebrados (en su mayoría corales) que se analizaron aquí. La importancia ecológica es relevante, los corales tanto en localidades tropicales y subtropicales viven a temperaturas muy cercanas a las temperaturas letales durante los meses de verano. La respuesta de los dinoflagelados simbiotes es una señal de las condiciones en que se encuentra la asociación completa. Esta, a su vez, determina los rangos de tolerancia de la asociación simbiótica, pero con la salvedad de que no todas las especies de dinoflagelados simbiotes responderán igual frente

a la variación ambiental, por lo tanto no todas las especies de corales presentarán blanqueamiento.

Lo anterior es importante ya que actualmente se han presentado modelos predictivos del calentamiento global, así como simulaciones de fenómenos de El Niño con alto grado de realismo que incluyen la proyección de la frecuencia e intensidad de eventos de blanqueamiento masivo (Hoegh-Guldberg 1999). Las diferencias fisiológicas que se han determinado aquí, en las temperaturas críticas de las especies de dinoflagelados de hasta 4°C, apoyan la hipótesis de que estos eventos de blanqueamiento proyectados, aún cuando sean intensos, no afectarán a todas las especies de la misma forma. Por ello, la dramática predicción de que los arrecifes de coral están en riesgo de transformarse en comunidades bentónicas dominadas por algas, no es tan realista si se consideran sólo los efectos de los cambios en las condiciones climáticas. Desafortunadamente, la influencia antropogénica y su efecto sobre la dinámica de nutrientes de los ecosistemas arrecifales si podría llegar a inducir esta transformación en un futuro no tan lejano.

## VII. CONCLUSIONES

- Se confirmó como sitio inicial de daño por estrés térmico: (1) el lado donador del FSII del aparato fotosintético, en muestras de dinoflagelados simbiotes mantenidas en oscuridad; y (2) el lado aceptor del FSII en muestras mantenidas bajo luz subsaturante.
- El evidente deterioro del FSII en la oscuridad, demostró que este sitio de daño por estrés térmico en dinoflagelados simbiotes, es previo al posible daño de la enzima fijadora de carbono.
- Se identificó la existencia de un rango amplio de sensibilidades térmicas en diferentes especies de dinoflagelados simbiotes.
- La ausencia de asociación entre las diferentes sensibilidades térmicas y sus filotipos demostró que los filotipos no determinan la respuesta fisiológica de los dinoflagelados simbiotes a la temperatura. La variación registrada para cada filotipo refleja la existencia de una gran variabilidad genética dentro de cada uno de los filotipos que hasta ahora se han propuesto (A, B y C), lo cual hace aún más necesaria la investigación en el campo de filogenética de dinoflagelados simbiotes de invertebrados.
- En general la tasa de transporte de electrones en los dinoflagelados simbiotes fué severamente afectada a temperaturas mayores de 31°C.
- Las variaciones interespecíficas en la sensibilidad térmica de dinoflagelados simbiotes de hasta 4°C en las temperaturas críticas, apoyan la hipótesis de que los eventos de blanqueamiento proyectados (inducidos por aumentos de la temperatura), no afectarán a todas las especies de la misma forma.
- Existe una relación recíproca entre la temperatura y la irradiancia como factores inductores del blanqueamiento de coral. La fotoprotección registrada indicó que a mayor temperatura, menores intensidades de luz producen efectos similares a los que se presentan a una temperatura menor pero con una intensidad de luz mayor.
- Se confirmó el efecto multiplicativo del tiempo en la acumulación de daño, puesto que se observó que las exposiciones breves a temperaturas altas resultaron en respuestas equivalentes a las exposiciones más largas a temperaturas menores.

## VIII. PERSPECTIVAS

Considerando que las temperaturas en los trópicos han aumentado casi 1°C durante los últimos 100 años, y continúan aumentando a una tasa de aproximadamente 1-2°C por siglo, cabe resaltar la importancia de la investigación sobre los efectos que ésto provocará en los corales constructores de arrecife. Estos organismos se encuentran muy cerca de sus límites superiores de tolerancia térmica, y el conocimiento de la variabilidad en sus respuestas permitirá sentar las bases para explicar la variación interespecífica que se observa cuando ocurre un evento de blanqueamiento de coral. Además, estos organismos se pueden considerar como unos “archivos” paleoclimáticos, ya que guardan en su estructura calcárea señales isotópicas que reflejan las condiciones fisicoquímicas del ambiente en que se formaron y que determinaron fuertemente la fisiología del simbiote de coral. La interpretación de las anomalías isotópicas del esqueleto del coral en relación con las diferencias fisiológicas interespecíficas de estos organismos, ofrece la posibilidad de esclarecer la frecuencia, en un futuro, de la aparición del fenómeno de blanqueamiento de coral a escala de tiempo geológico.

## BIBLIOGRAFÍA

- Achnine, L., R. Mata, R. Iglesias-Prieto, B. Lotina-Hennsen (1998). Impairment of Photosystem II donor side by the natural product Odoratol. *J. Agric. Food Chem.* **46**(12):5313-5317.
- Achnine, L., R. Pereda-Miranda, R. Iglesias-Prieto, R. Moreno-Sánchez, B. Lotina-Hennsen (1999). Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiologia Plantarum.* **000**: 1-7.
- Baker, A. C., R. Rowan (1997). Diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae) in scleractinian corals of the Caribbean and Eastern Pacific. *Proc 8<sup>th</sup> Int Coral Reef Sym 2*: 1301-1306.
- Banaszak, A. T., R. Iglesias-Prieto, R. K. Trench (1993). *Scrippsiella velellae* sp. nov. (Peridinales) and *Gloeodinium viscum* sp. nov. (Phytodinales), dinoflagellate symbionts of two hydrozoans (Cnidaria). *J. Phycol.* **29**: 517-528.
- Bilger, W., O. Björkman (1990). Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynthesis Research.* **25**:173-185.
- Bilger, W., U. Schreiber, M. Bock (1995). Determination of the quantum efficiency of photosystem II and of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. *Oecologia.* **102**: 425-432.
- Blank, R. J. (1987). Cell architecture of the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. inhabiting the Hawaiian stony coral *Montipora verrucosa*. *Marine Biology.* **94**: 143-155.
- Brown, B. E. (1997). Coral bleaching: causes y consequences. *Coral Reefs.* **16**, Suppl.: S129-S138.
- Brown, B. E., I. Ambarsari, M. E. Warner, W. K. Fitt, R. P. Dunne, S. W. Gibb, D. G. Cummings (1999). Diurnal changes in photochemical efficiency and xanthophyll concentrations in shallow water reef corals: evidence for photoinhibition and photoprotection. *Coral Reefs.* **18**: 99-105.
- Cao, J. and Govindjee (1990). Chlorophyll *a* fluorescence transient as an indicator of active and inactive Photosystem II in thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1015**: 180-188.
- Davies, J. M., R. P. Dunne, B. E. Brown (1997). Coral bleaching and elevated sea-water temperature in Milne Bay Province, Papua New Guinea, 1996. *Mar. Freshwater Res.* **48**: 513-516.
- Demmig-Adams, B., W. W. Adams III (1992). Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**: 599-626.
- Dykens, J. A., J. M. Shick (1982). Oxygen production by endosymbiotic algae controls superoxide dismutase activity in their animal host. *Nature* **297**: 579-580.
- Falkowski, P. G., Z. Dubinsky, L. Muscatine, L. McCloskey (1993). Population control in

- symbiotic corals. Ammonium ions and organic materials maintain the density of zooxanthellae. *BioScience* **43**(9): 606-611.
- Fitt, G. W., W. K. Warner (1995). Bleaching patterns of four species of Caribbean reef corals. *Biological Bulletin* **189**: 298-307.
- Gates, R. D. (1990). Seawater temperature and sublethal coral bleaching in Jamaica. *Coral Reefs*. **8**: 193-197.
- Gates, R. D., G. Baghdasarian, L. Muscatine (1992). Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biol. Bull.* **182**: 324-332.
- Genty, B., J-M. Briantais, N. R. Baker (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **990**: 87-92.
- Glynn, P. W. (1984). Widespread coral mortality and the 1982-83 El Niño warming event. *Environmental Conservation*. **11**: 133-146.
- Glynn, P. W. (1993). Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs*. **12**: 1-17.
- Glynn, P. W. (1996). Coral reef bleaching: facts, hypotheses and implications. *Global Change Biology*. **2**: 495-509.
- Goenaga, C. (1988). The state of coral reefs in the wider Caribbean. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela, Univ. Oriente* **27** (1 y 2): 25-36.
- Goreau, T. F., N. I. Goreau (1973). The ecology of Jamaican coral reefs. II Geomorphology, zonation, and sedimentary phases. *Bulletin of Marine Sciences*. **23**: 399-464.
- Gounaris, K., Arr Brain, P. J. Quinn, W. Williams (1983). Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. *FEBS Letters* **153**(1): 47-52.
- Govindjee, Van Rensen J.J.S. (1993). Photosystem II reaction center and bicarbonate. In: Deisenhofer J and Norris J. R. (eds) *The Photosynthetic Reaction Center* pp. 357-389. Academic Press, San Diego, C.A.
- Gregory, R. P. F. (1989). Electron transfer within reaction-centre complexes. En: *Photosynthesis*. Ed. Blackie Cap. **4**: 69-70.
- Guissé, B., A. Srivastava, R. J. Strasser (1995). The polyphasic rise of the chlorophyll *a* fluorescence (O-K-J-I-P) in heat-stressed leaves. *Archs Sci. Genève* **48**(2): 147-160.
- Haldimann, P., R. J. Strasser (1999). Effects of anaerobiosis as probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence rise in pea (*Pisum sativum* L.). *Photosynth. Res.* **62**: 67-83.
- Hall, D. O., K. K. Rao (1994a) Light absorption and the two photosystems. En: *Photosynthesis. Studies in Biology*. Ed. Cambridge 5ª edición. Caps. **1 a 4**: 1-78.
- Hall, D. O., K. K. Rao (1994b). Research in photosynthesis. En: *Photosynthesis. Studies in Biology*. Ed. Cambridge 5ª edición. Cap. **8**: 145-194.

- Hallock P. (1997). Reefs and limestones in Earth history. En: *Life and death of coral reefs*. Editor Birkeland C. Ed. Chapman & Hall. Cap. 2: 13-42.
- Havaux, M. (1993). Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperature. *Plant Cell and Environ.* **16**: 461-467.
- Hoegh-Guldberg, O. (1999). Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Freshwater Res.* **50**: 839-866.
- Hoegh-Guldberg, O., B. Salvat (1995). Periodic mass-bleaching and elevated temperatures: bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French Polynesia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **121**: 181-190.
- Hoegh-Guldberg, O., G. J. Smith (1989). The effect of sudden changes in temperature, light and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylophora pistillata* Esper and *Seriatopora hystrix* Dana. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **129**: 279-303.
- Hovland, M., P. B. Mortensen, E. Thomsen, T. Brattegard (1997). Substratum-related ahermatypic coral banks on the norwegian continental shelf. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Coral Reef Symp.* **2**: 1203-1206.
- Horton, P., A. V. Ruban, R. G. Walters (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 655-684.
- Iglesias-Prieto, R. (1995). The effects of elevated temperature on the photosynthetic responses of symbiotic dinoflagellate. In: *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, ed. P. Mathis Current Research in Photosynthesis Dordrecht: Kluwer, Academic Publishers. IV: 793-796.
- Iglesias-Prieto, R. (1997). Temperature-dependent inactivation of photosystem II in symbiotic dinoflagellates. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Coral Reef Symp.* **2**: 1313-1318.
- Iglesias-Prieto, R., J. L. Matta, W. A. Robins, R. K. Trench (1992). Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 10302-10305.
- Iglesias-Prieto, R., N. S. Govind, R. K. Trench (1991). Apoprotein composition and spectroscopic characterization of the water-soluble peridinin-chlorophyll a-proteins from three symbiotic dinoflagellates. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **246**: 275-283.
- Iglesias-Prieto, R., N. S. Govind, R. K. Trench (1993). Isolation and characterization of three membrane-bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **340**: 381-392.
- Iglesias-Prieto, R., R. K. Trench (1994). Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **113**: 163-175.
- Iglesias-Prieto, R., R. K. Trench (1997). Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Mar. Biol.* **130**: 23-34.

- Jaap, W. C. (1979). Observation on zooxanthellae expulsion at Middle Sambo Reef, Florida Keys. *Bull. Mar. Sci.* **29**: 414-412.
- Jokiel, P. L., S. L. Coles (1990). Response of Hawaiian and other Indo-Pacific reef corals to elevated temperature. *Coral Reefs* **8**:155-162.
- Jones, R. J., O. Hoegh-Guldberg, A. W. D. Larkum, U. S. Schreiber (1998). Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO<sub>2</sub> fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant Cell Environ.* **21**: 1219-1230.
- Karukstis, K. K. (1991). Chlorophyll fluorescence as a physiological probe of the photosynthetic apparatus. En: *Chlorophylls*, (Ed. Scheer, H.) CRC Press, Boca Raton. 769-795.
- Krause, G. H., S. Somersalo, E. Zumbusch, B. Weyers, H. Laasch (1990). On the mechanism of photoinhibition in chloroplasts. Relationship between changes in fluorescence and activity of photosystem II. *J. Plant Physiol.* **136**: 472-479.
- Lesser, M. P. (1997). Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs* **16**: 187-192.
- Lesser, M. P., W. R. Stochaj, D. W. Tapley, J. M. Shick (1990). Bleaching in coral reef anthozoans: effects of irradiance, ultraviolet radiation, and temperature on the activities of protective enzymes against active oxygen. *Coral Reefs* **8**: 225-232.
- Maxwell, D. P., S. Falk, N. P. A. Humer (1995). Photosystem II excitation pressure and development of resistance to photoinhibition. I. Light-harvesting complex II abundance and zeaxanthin content in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **107**: 687-694.
- Muscatine, L. (1980). Productivity of zooxanthellae. En: *Primary Productivity Cycles in the Sea*. (Ed. Falkowski, P. G.), Plenum Press, New York. pp. 381-402.
- Muscatine, L. (1990). The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. *Coral Reefs* **25**:1-29.
- Muscatine, L., V. B. Pearse (1971) Role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. *Biol. Bull.* **141**: 350-363.
- Muscatine, L., V. Weis (1992). Productivity of zooxanthellae and biogeochemical cycles. En: *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. (Eds. Falkowski, P. G., Woodhead, A. D. ) Plenum Press, New York. pp. 257-271.
- Neale, P. J., A. Melis (1990). Activation of a reserve pool of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii* counteracts photoinhibition. *Plant Physiol.* **92**: 1196-1204.
- NOAA (1998). Record-breaking coral bleaching occurred in tropics this year. Report of the National Oceanic and Atmospheric Administration. <http://www.noaa.gov/public-affairs/pr98/oct98/noaa98-68.html>
- Olaizola, M., H. Y. Yamamoto (1994). Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. of Phycol.* **30**: 606-612.

- Rosenberg, E., Y. Ben-Haim, A. Toren, E. Banin, A. Kushmaro, M. Fine, Y. Loya (1999). Effect of temperature on bacterial bleaching of corals. *Microbial Ecology and Infections Disease* (Ed. Rosenberg, E.) Cap. 20: 242-254.
- Rowan, R., D. A. Powers (1991). A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science* 251: 1348-1351.
- Rowan, R., N. Knowlton, A. Baker, J. Jara (1997). Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature* 388: 265-269.
- Sale, P. F. (1999). Recruitment in space and time. *Nature* 397: 25-27.
- Schreiber, U., C. Neubauer, U. Schliwa (1993). PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: a highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research. *Photosynth. Res.* 36: 65-72.
- Schreiber, U., J. A. Berry (1977). Heat-induced changes of chlorophyll fluorescence in intact leaves correlated with damage of the photosynthetic apparatus. *Planta* 136: 233-238.
- Schreiber, U., U. Schliwa, W. Bilger (1986). Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.* 10: 51-62.
- Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. R. Lerman, R. M. Myers. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 232-236.
- Smith, S. V., R. W. Buddemeier (1992). Global change and coral reef ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23: 89-118.
- Srivastava, A., R. J. Strasser (1995). How do land plants respond to stress temperature and stress light?. *Archs Sci. Genève.* 48 (2): 135-146.
- Strasser, R. J., A. Srivastava, Govindjee (1995). Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. and Photobiol.* 61 (1): 32-42.
- Strong, A. E., T. J. Goreau, R. L. Hayes (1998). Ocean hot spots and coral reef bleaching: January-July 1998. *Reef Encounters* 24: 20-22.
- Trench, R. K. (1979). The cell biology of plant-animal symbiosis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30: 485-531.
- Trench, R. K. (1992). Microalgal-invertebrate symbiosis, current trends. *Encyclopa. Microbiol.* 3: 129-142.
- Trench, R. K. (1993). Microalgal-invertebrate symbioses: a review. *Endocytobio. Cell Res.* 9: 135-175.
- Trench, R. K., R. J. Blank (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.

- UNEP (1999). Convention on biological diversity. Report of the expert consultation on coral bleaching. <http://www.biodiv.org/JM/pdf/EXPERT-2-3.pdf>
- Vass, I., Y. Styring, T. Hundal, A. Koivuniemi, E. M. Aro, B. Anderson (1992). Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: Stable reduced QA species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 1408-1412.
- Voet, D., J. G. Voet (1995) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. 2a Ed. pp. 862-870.
- Warner, M. E., W. K. Fitt, G. W. Schmidt (1996). The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae *in hospite* from four different species of reef coral: a novel approach. *Plant Cell Environ.* **19**: 291-299.
- Warner, M. E., W. K. Fitt, G. W. Schmidt (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8007-8012.
- Wilkinson, C., O. Lindén, H. Cesar, G. Hodgson, J. Rubens, A. E. Strong (1999). Ecological and socioeconomic impacts of 1998 coral mortality in the Indian Ocean: an ENSO impact and a warning of future change? *Ambio* **28** (2): 188-196.
- Wood, R. (1998). The ecological evolution of reefs. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **29**:179-206.
- Young, A. J. (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol. Plant.* **83**: 702-708.

## ANEXO

### Origen de la señal de fluorescencia del FSII

Los dinoflagelados simbioses son organismos unicelulares que cuentan con organelos especializados (cloroplastos), comúnmente rodeados de una membrana triple, y los cuales en su interior presentan grupos de dos o tres tilacoides que forman *lamellas* aplanadas. Se ha documentado que el sitio primario de daño por estrés térmico está asociado con componentes del aparato fotosintético localizado precisamente en las membranas tilacoidales, principalmente en el FSII (Havaux 1993, Iglesias-Prieto 1997, Warner *et al.* 1999).

En la membrana de los tilacoides se encuentran embebidos complejos pigmento-proteína [el principal complejo cosechador de luz en dinoflagelados es el complejo acpPC (Iglesias-Prieto *et al.* 1993), el cual es un complejo de proteína-peridininina-clorofila *a*-clorofila *c*<sub>2</sub>] que se encargan de coleccionar y transferir a los centros de reacción la energía de excitación necesaria para el proceso fotoquímico que transforma bióxido de carbono y agua en carbohidratos y oxígeno. En tal proceso las moléculas de clorofila que absorben luz llegan a un estado excitado; como una molécula excitada es inestable, los electrones regresan rápidamente a su estado basal, liberando la energía de fotones absorbida de diferente manera. Cuando una molécula de clorofila *a* (Chl *a*) ha absorbido un fotón, ésta alcanza el estado excitado de singlete 1Chl *a*\* el cual *in vivo* tiene un tiempo de vida medio de entre  $10^{-12}$  y  $10^{-9}$  s. Durante este tiempo de vida del estado excitado varios procesos compiten por su desactivación:

- 1) transferencia de excitación, la excitación electrónica puede ser transferida a otra molécula aceptora.
- 2) fotoquímica en los centros de reacción.
- 3) se puede liberar parte de la excitación como calor (disipación térmica).
- 4) puede emitir el resto de la energía como un fotón de energía más baja (con longitud de onda más larga); este fenómeno se conoce como fluorescencia.

El fotosistema II es uno de los complejos pigmento-proteína donde se efectúa la fotoquímica, atrapa luz y la utiliza para reducir a la plastoquinona  $Q_B$  y sintetizar oxígeno molecular a partir del agua.

Estructuralmente el FSII (Fig. A.1) comprende más de 25 polipéptidos y está rodeado por una variedad de clorofilas  $a$  y  $c$  (en el caso de dinoflagelados) enlazadas a proteínas, conocidas como complejos cosechadores de luz. En el núcleo del FSII están dos polipéptidos conocidos como las proteínas D1 y D2. El centro de reacción P680 (un par de clorofilas  $a$ ), se encuentra entre estas proteínas. La feofitina (molécula de clorofila  $a$  modificada en la que dos átomos de hidrógeno han reemplazado al  $Mg^{2+}$  central) y la plastoquinona  $Q_A$  se encuentran sobre la proteína D2; la tirosina Z y la plastoquinona  $Q_B$  se encuentran sobre la proteína D1. En la proteína D2, la plastoquinona  $Q_A$  permanece relativamente fija comparada a la plastoquinona  $Q_B$ , la cual es libre de moverse dentro y fuera de la proteína D1. Los inhibidores del transporte de electrones actúan en el sitio de  $Q_B$ , previniendo la reducción y unión de la plastoquinona  $Q_B$ .

Por la absorción de un excitón, P680 es excitado a  $P680^*$ , el cual es rápidamente (en pocos picosegundos) transferido a la feofitina vecina iniciándose así una separación de carga (Fig. A.2). Dentro de 200-400 ps, la plastoquinona  $Q_A$ , acepta el electrón de la feofitina y lo transfiere a la plastoquinona  $Q_B$  en 200  $\mu s$ . Después de dos reducciones por  $Q_A$ , la plastoquinona  $Q_B$  se convierte en plastoquinol, el cual es reemplazado por otra nueva plastoquinona. Pevio a la segunda reducción por  $Q_A$ , la carga positiva del P680 debe ser transferida al grupo de manganeso vía una tirosina activa, conocida como Z, y que sirve para oxidar el agua a oxígeno ( $O_2$ ). La oxidación del agua involucra 5 diferentes estados de oxidación del grupo de manganeso, conocidos como los estados S, y requiere la absorción de cuatro fotones y la reducción de 2 plastoquinonas  $Q_B$ .

Un sistema fotosintético bajo iluminación continua determina su comportamiento por la mezcla de diferentes especies de centros de reacción abiertos, es decir centros de reacción en los que no se ha reducido  $Q_A$  ( $Q_A Q_B$ ,  $Q_A \square$ ,  $Q_A Q_B^-$ ,  $Q_A Q_B^{2-}$ ,  $Q_A Q_B H_2$ ), o centros de reacción cerrados ( $Q_A^- Q_B$ ,  $Q_A^- \square$ ,  $Q_A^- Q_B^-$ ,  $Q_A^- Q_B^{2-}$ ,  $Q_A^- Q_B H_2$ ) (Strasser *et al.* 1995). Independiente del estado de  $Q_B$ , cada electrón que se transfiere desde el centro de reacción

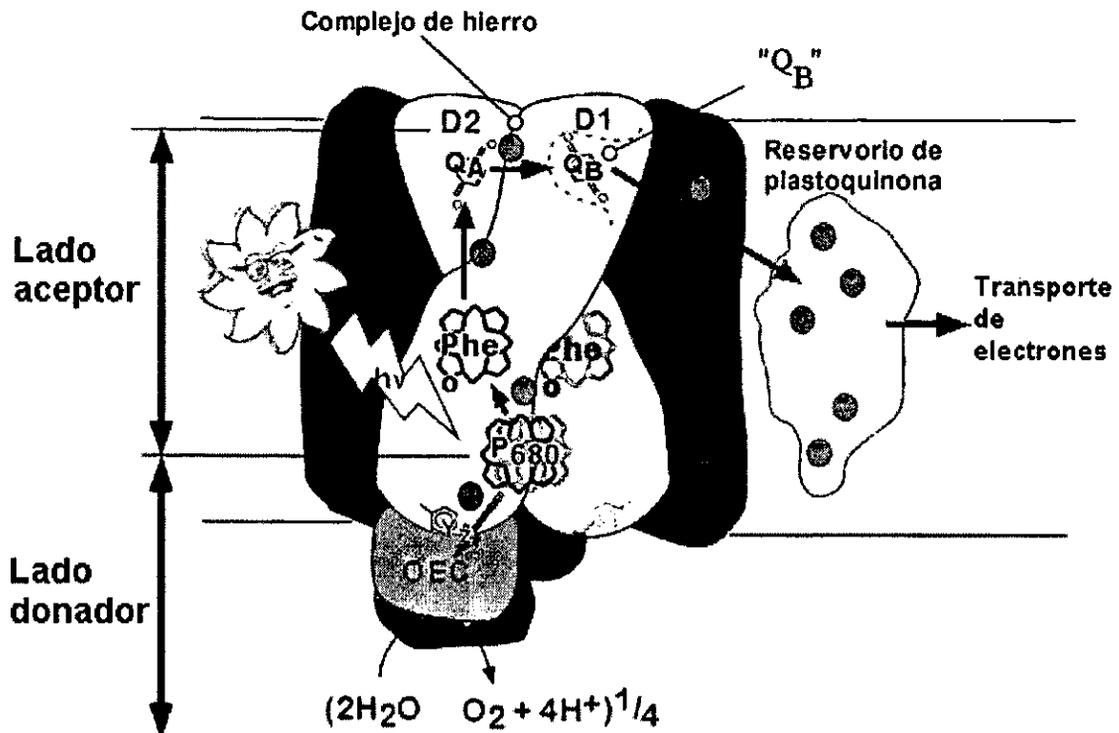


Fig. A.1 Estructura del Fotosistema II, donde D1 y D2: polipéptidos unidos directamente al centro de reacción P680, Pheo: feofitina, QA y QB: plastoquinonas, Z: tirosina, OEC: complejo de evolución de oxígeno.

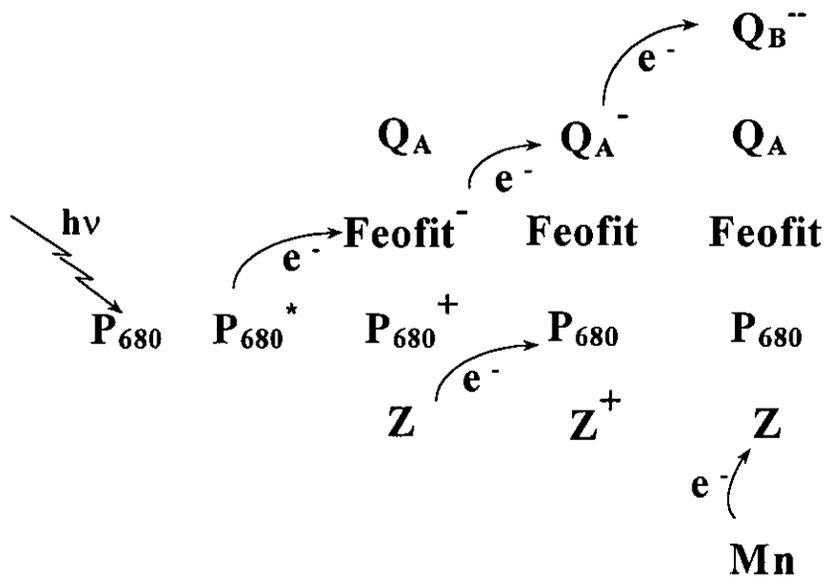


Fig. A.2 Separación de carga en el Fotosistema II.

del FSII a  $Q_A$  transforma el estado del centro de reacción de un estado abierto a uno cerrado (Strasser *et al.* 1995).

En ausencia de estrés térmico la mayoría de las  $1\text{Chl } a^*$  retornan al estado basal mediante la transferencia de excitación a otra molécula de  $\text{Chl } a$ , hasta que la excitación es “atrapada” en alguno de los centros de reacción en donde se lleva a cabo la separación de carga (Fig. A.2). Una fracción pequeña de  $\text{Chl } a^*$  (aprox. 1:1000) espontáneamente se convierte en el estado de triplete excitado  $3\text{Chl } a^*$  a través del llamado cruzamiento intersistemas. Este estado tiene un tiempo de vida medio mucho mayor que el de la  $1\text{Chl } a^*$  ( $10^{-3}$  s) y es sumamente reactivo (Young 1991), en la presencia de  $\text{O}_2$  se produce  $1\text{O}_2^*$  (oxígeno molecular singlete excitado). Esta última reacción produce la fotodestrucción irreversible de la  $\text{Chl } a$  (Young 1991).

Los carotenoides, en especial el  $\beta$ -caroteno, previenen la fotodestrucción de la clorofila en la vecindad de los centros de reacción y evitan daños posteriores en las membranas del aparato fotosintético. Tales moléculas pueden desactivar la clorofila triplete a través de la transferencia de energía y su posterior disipación en forma de calor, además de que también puede desactivar al oxígeno singlete  $1\text{O}_2^*$  (Young 1991).

El máximo de emisión del espectro de fluorescencia de una molécula es de una longitud de onda más larga que la longitud de onda del espectro de absorción correspondiente. Los extractos de  $\text{Chl } a$ , por ejemplo, absorben en las regiones azul y rojo del espectro pero fluorescen sólo en el rojo; lo anterior debido a que el decaimiento del estado excitado 2 al 1 de la clorofila ocurre dentro de los  $10^{-13}$  s de la captura de fotones, mientras que la descarga de fluorescencia requiere aproximadamente  $10^{-9}$  s. Por esto independientemente de la calidad de luz de excitación, la fluorescencia de la clorofila ocurre siempre por la vía del estado excitado 1 - en el rojo - (Hall y Rao 1994a).

En tejidos fotosintéticos esta fracción de energía de excitación que es disipada como fluorescencia *in vivo* es pequeña (3-5%); sin embargo en solución, dependiendo del solvente, esta fracción puede aumentar a 30%. La fluorescencia es una medida de los cuantos absorbidos que no son utilizados en fotosíntesis. Las características espectrales de la fluorescencia, tales como la naturaleza e intensidad de las bandas de absorción, tiempo de

vida, cosecha cuántica, y cinéticas de inducción, todas reflejan las propiedades de las moléculas de clorofila y su ambiente, y pueden ser utilizadas para estudiar la tasa de transporte de electrones fotosintético (ETR) y procesos fisiológicos asociados (Hall y Rao 1994b).

Por otra parte, la sobrerreducción del lado aceptor del FSII durante la fotoinhibición (disminución reversible de la fotosíntesis dependiente de la intensidad de luz y tiempo de exposición, que conduce a una reducción en la eficiencia fotoquímica del FSII) resulta en la formación de la especie  $Q_A$  doblemente reducida (Iglesias-Prieto 1997). Aún cuando este estado es inactivo en términos de transporte de electrones fotosintético, promueve muy efectivamente la formación de clorofila en estado triplete en el centro de reacción (Vass *et al.* 1992), y subsecuentemente la formación de oxígeno singlete  $^1O_2^*$  (una de las formas activas del oxígeno que ya se mencionaron). Por eso, condiciones en que la transferencia de electrones del FSII a la  $Q_B$  es limitada, facilitan la formación de esta clorofila triplete y consecuentemente aumenta el riesgo de fotodestrucción del aparato fotosintético (Vass *et al.* 1992). Así, si la tasa de formación de tripletes supera a la tasa de disipación de energía (fotoprotección), se acumula el daño en el FSII.

Entre los mecanismos fotoprotectivos, que se han propuesto recientemente para la desactivación del estado triplete de la clorofila, está la disipación térmica controlada y sin daño de la energía en exceso del sistema fotoquímico, que ocurre supuestamente en la antena (Bilger y Björkman 1990). Este proceso de disipación involucra al ciclo de las xantofilas (carotenoides oxigenados), donde ocurre por ejemplo la de-epoxidación de la diatoxantina en cromofitas (Olaizola y Yamamoto 1994).

Cuando una muestra fotosintéticamente activa se ilumina, su fluorescencia puede variar entre dos valores extremos,  $F_0$  y  $F_m$  (fluorescencia mínima y máxima respectivamente), los cuales se pueden evaluar después de la aclimatación a la oscuridad (Strasser *et al.* 1995). Cualquier disminución en  $F_m$  puede ser debida a un aumento en la conversión de energía fotoquímica o por un incremento en la disipación de calor (comparada al estado de oscuridad). Los análisis de desactivación con pulsos de saturación permite distinguir entre estos dos diferentes tipos fundamentales de desactivación (véase fluorescencia de amplitud

modulada en Material y métodos). La desactivación fotoquímica se puede suprimir por un pulso de luz saturante (la fase fotoquímica se satura), mientras que la desactivación no fotoquímica no cambia durante el pulso saturante (ya que los cambios en la disipación de calor involucran procesos relativamente lentos).

La fluorescencia de la clorofila *a* en condiciones fisiológicas proviene de la antena del FSII y se puede desactivar (*quenching* en inglés) por medio de dos procesos competitivos; la desactivación fotoquímica ( $Q_p$ ) y la desactivación no-fotoquímica ( $Q_n$ ) (Schreiber *et al.* 1993).  $Q_p$  resulta de la competencia en el centro de reacción del FSII, entre la separación de carga y la fluorescencia por la desactivación de una molécula de clorofila excitada  $Chl\ a^*$ . Por otra parte  $Q_n$  se origina por la suma de todas las vías de desactivación térmica de los estados excitados de la clorofila *a*. Esta desactivación no-fotoquímica comprende por lo menos tres componentes con diferentes tasas de decaimiento. Los componentes de  $Q_n$  incluyen la formación de un gradiente de pH entre ambos lados de la membrana del tilacoide, la desactivación de los estados excitados de clorofila *a* vía los carotenoides de fotoprotección en los complejos colectores de luz (el ciclo de las xantofilas que ya se describió), y los llamados estados de transición, que resultan de la fosforilación y migración reversible, bajo el control del estado óxido-reducción de la cadena de transporte de electrones, de los complejos colectores de luz (Schreiber *et al.* 1993).

Por otro lado, en condiciones en las que la tasa de captura de fotones es mayor que la tasa de recambio del FSII (irradiancias supersaturantes, o altas temperaturas) es posible que  $Q_e$  (el componente de  $Q_n$  dependiente de la formación del gradiente de pH en el tilacoide) resulte de la transformación de algunos FSII a un estado no funcional que actúan como pozos para los estados excitados (Schreiber *et al.* 1993; Strasser *et al.* 1995). La formación la heterogeneidad funcional del FSII puede ser detectada mediante el análisis de los cambios en la eficiencia cuántica de las reacciones que ocurren en el FSII (Strasser *et al.* 1995). Para documentar esta heterogeneidad se han realizado estudios en los que se proponen dos tipos de FSII, unos reductores ( $\alpha$ ) y otros no reductores ( $\beta$ ) de la plastoquinona, y donde se sugiere que los  $FSII_\beta$  pueden servir como reservas del FSII que aumentan las tasas de evolución de oxígeno durante la exposición a irradiancia en exceso y

compensa parcialmente el efecto adverso de la fotoinhibición sobre los FSII $\alpha$  (Neale y Melis 1990).

Está ampliamente demostrado que la detección de la emisión variable de fluorescencia de los pigmentos de los sistemas fotosintéticos proveen una prueba no invasiva para examinar los eventos fotoquímicos de la fotosíntesis y puede ser utilizada efectivamente para detectar cambios en las actividades y organización del aparato fotosintético "*in vivo*" cuando los organismos están expuestos a estrés ambiental. Las demostraciones recientes de que los cambios en la emisión de fluorescencia de la clorofila durante la inducción de la fotosíntesis están muy relacionados a la velocidad de asimilación de bióxido de carbono y evolución de oxígeno, han aumentado el interés en la aplicación de la fluorescencia como un conveniente monitor de la actividad fotosintética.