



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ECOLOGÍA

**LA LUZ EN LA ECOLOGÍA POBLACIONAL Y CONDUCTUAL DE**  
***ELYSIA CRISPATA* (MOLLUSCA: SACOGLOSSA): PREFERENCIA**  
**EN DIFERENTES ESPECTROS E INTENSIDADES**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**XOCHITL GUADALUPE VITAL ARRIAGA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

**DR. FERNANDO NUNO DIAS MARQUES SIMÕES**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: **DRA. EDNA NARANJO GARCÍA**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

**DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDÍA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**DRA. SÓNIA MARISA GONÇALVES DA CRUZ**  
CESAM, UNIVERSIDAD DE AVEIRO



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ECOLOGÍA

**LA LUZ EN LA ECOLOGÍA POBLACIONAL Y CONDUCTUAL DE**  
***ELYSIA CRISPATA* (MOLLUSCA: SACOGLOSSA): PREFERENCIA**  
**EN DIFERENTES ESPECTROS E INTENSIDADES**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**XOCHITL GUADALUPE VITAL ARRIAGA**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:  
**DR. FERNANDO NUNO DIAS MARQUES SIMÕES**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
COMITÉ TUTOR: **DRA. EDNA NARANJO GARCÍA**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**DRA. GUILLERMINA ALCARAZ ZUBELDÍA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
**DRA. SÓNIA MARISA GONÇALVES DA CRUZ**  
CESAM, UNIVERSIDAD DE AVEIRO

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
OFICIO FCIE/DAIP/436/2023  
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité de Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de agosto de 2023 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la estudiante VITAL ARRIAGA XOCHITL GUADALUPE con número de cuenta 103005722 con la tesis titulada: “La luz en la ecología poblacional y conductual de *Elysia crispata* (Mollusca: Sacoglossa): preferencia en diferentes espectros e intensidades”, realizada bajo la dirección del DR. FERNANDO NUNO DIAS MARQUES-SIMOES:

Presidente:	DRA. BRIGITTA INE VAN TUSSENBROEK RIBBINK
Vocal	DR. CARLOS ROSAS VÁZQUEZ
Vocal:	DR. ALEJANDRO EMMANUEL GONZÁLEZ VOYER
Vocal:	DRA. LUISA ISaura FALCÓN ÁLVAREZ
Secretario:	DRA. EDNA NARANJO GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 23 de agosto de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**

c. c. p. Expediente del alumno  
AGNS/AAC/GEMF/EARR/ipp



## Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por el apoyo otorgado para mi formación académica y la realización de mi proyecto. Agradezco a todo el personal administrativo del Posgrado y de sus entidades académicas, particularmente de la Facultad de Ciencias, que sostiene a sus estudiantes.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención que me otorgó durante mis estudios de Doctorado (CVU: 564148).

Agradezco los apoyos económicos del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) que me permitieron participar en congresos y cursos fundamentales para mi desarrollo educativo y profesional.

Al Harte Research Institute, la Harte Charitable Foundation y la Texas A&M University quienes financiaron una parte de este proyecto.

A Unitas Malacologica, quien me otorgó financiamiento con el “Student Research Award 2020” para la realización de los experimentos de mi proyecto y me dio una beca para asistir al World Congress of Malacology 2019.

A la American Malacological Society quien me dio una beca para asistir al World Congress of Malacology 2022 y me reconoció por la ponencia que presenté en la misma conferencia con el “Boone Award for Best Student Presentation”.

A mi tutor, el Dr. Nuno Simões, a mi comité tutor: la Dra. Edna Naranjo, Dra. Guillermina Alcaraz y Dra. Sónia Cruz y, a la Dra. Maite Mascaró, cuyos comentarios, preguntas, sugerencias y apoyo enriquecieron el proyecto y, principalmente, mi desarrollo como investigadora.

Agradecimientos a título personal:

Este doctorado fue posible debido al apoyo de todas estas personas, quienes me impulsaron, motivaron, inspiraron, sostuvieron, escucharon y ayudaron. Sin duda, hay más personas de las que puedo mencionar en estas páginas, así que no duden de mi agradecimiento sincero aun cuando no aparecen aquí.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y todos los contribuyentes de este país, que hicieron posible mi formación académica durante tantos años.

Al Doc Nuno, quien fue un pilar fundamental en esta etapa. Gracias por aventarse conmigo en este reto y, sobre todo, por impulsarme siempre.

A Maite, por ser una guía extraordinaria. Gracias por toda la paciencia, la discusión de ideas, las enseñanzas, la ayuda y la empatía.

A Sónia, por todo el apoyo, por recibirme con los brazos abiertos y siempre motivarme. Gracias por la comprensión y la amistad.

A la Doctora Edna, mi mentora en la malacología, quien después de 14 años sigue inspirándome y enseñándome tanto.

A la Doctora Guille, por toda su disposición para apoyar mi formación. Gracias por darme los comentarios más constructivos.

A la Dra. Felisa Rey, el Dr. Paulo Cartaxana, el Dr. Ricardo Calado y la Dra. Rosário Domíngues de la Universidad de Aveiro, en Portugal por permitirme realizar una estancia y hacer parte de los análisis en sus laboratorios. Gracias Felisa y Paulo, por todo su apoyo y por la paciencia y enseñanzas a esta babosóloga.

A la Facultad de Ciencias de la UNAM, a través de la UMDI-Sisal, Yucatán, por el uso de instalaciones y transporte, particularmente al Laboratorio de Ecología, Costas y Mares donde se desarrolló la mayor parte de este proyecto.

A la M. en C. Gemma Martínez Moreno, técnica encargada del Área Experimental de Ecología y Conducta de la UMDI-Sisal F. Ciencias, por todas las facilidades y el apoyo otorgado para que realizara el componente experimental de mi proyecto de la mejor manera posible.

Agradezco a la M. en C. Erica Escalante, la M. en C. Pamela Tapia, la M. en C. Maryjose García, el Biól. Mar. José Sansores y a todos los estudiantes del Programa de Investigaciones en Ecología y Cultivo de Especies Marinas de Ornato (PIECEMO) de la UMDI-Sisal que apoyaron en el cuidado de las babosas marinas involucradas en el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a las técnicas Dra. Patricia Guadarrama, M. en C. Karla Escalante, M. en C. Angélica Márquez y M. en C. Claudia Caamal de la UMDI-Sisal, F. Ciencias por brindar equipo, material, sustancias o las facilidades para la realización de alguna etapa de este

proyecto. También, a los técnicos de la UMDI-Sisal F. Ciencias, M. en C. Alberto Hernández, quien fue un gran apoyo en las distintas salidas a campo y la M. en C. Quetzalli Hernández, por la ayuda otorgada en diferentes cuestiones de buceo y campo.

Al Dr. Edlin Guerra de la ENES Mérida, UNAM por todos los comentarios que ayudaron en el diseño experimental y los análisis estadísticos de este trabajo.

Al M. en C. Antar Pérez por su ayuda en la visualización de datos y a la M. en C. Nancy Suárez por su apoyo en la liofilización de muestras.

Al Mtro. Oscar Santillán Carvantes por realizar el modelo digital del prototipo experimental y al Lic. Andrés Altamira por construir la primera versión del prototipo experimental.

Al equipo de Biodiversidad Marina de Yucatán, que apoyó de diversas formas para que este proyecto se desarrollara. Especialmente agradezco a los que me apoyaron en campo e hicieron posibles los muestreos.

A la Secretaría de Marina Armada de México (SEMAR) por su disposición y apoyo para realizar los muestreos en Cayo Arcas.

A la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA) por otorgar los permisos de colecta para la realización de este estudio (PPF/DGOPA-082/19 y PPF/DGOPA-061/21).

Al Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano, Parque Nacional Arrecife Alacranes y al Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos por permitir el acceso a las áreas correspondientes.

A Dorado Buceo (Veracruz y Puerto Morelos) y toda la tripulación del Caribbean Kraken por su constante apoyo a la Ciencia y sus atenciones. Particularmente agradezco la ayuda del M. en C. Manuel Victoria y el Capitán Manuel Andrade (el mejor Capi del mundo), sin ustedes este proyecto simplemente no hubiese sido posible.

A Dr. Carlos Rosas, Dra. Anastazia Banaszak y Dr. Michel Hendrickx quienes me brindaron comentarios muy constructivos durante mi examen predoctoral.

A los miembros de mi jurado: Dr. Carlos Rosas, Dra. Brigitta Van Tussenbroek, Dr. Alejandro González y Dra. Luisa Falcón por sus valiosos comentarios y apoyo para acelerar mi titulación dentro de lo posible.

Al Programa de mentorías del British Council, por la beca para ser parte de su programa. Particularmente agradezco a mi mentora, la Dra. Mónica Jacinto quien me dio su experiencia, empatía y motivación.

Al Programa de Atención a la Salud Emocional del campus Yucatán y ENES Mérida, por haberme brindado un espacio para atender este aspecto en mi etapa estudiantil.



A toda mi familia, especialmente a mis papás Mariluz y Antonio, mis hermanas Luz, Blanquis y Liber, mis tíos Pepe y Fede, mis tías Coca y Paty, mi prima Naye, mis primos Fedito y Marquito y, por supuesto, mis sobrinos. Forman parte de mí y siempre están conmigo. Este logro también es suyo.

A mis mosqueteras queridas, Di y Mosqui (alias Lily), porque con ustedes las salidas fueron más que un muestreo. Fue un gusto que me atropellara un doctorado en su compañía.

A Eri, una amiga y colega que es admirable y cuyo apoyo nunca tuvo límites. Gracias por la ayuda con las babositas, por compartir las risas y las lágrimas en este proceso.

A Jaz, Paty y Andy, quienes hicieron posible mi ingreso al doctorado, al estar a mi lado desde la primerísima etapa.

A Tonacea, por ser el aire que siempre me rescataba cuando no podía respirar durante estos años. “Y fue por ti que aprendí a querer los gatos...”

A Deneb, mi mentora, maestra, colega y amiga que quiero y admiro más de lo que le he dicho. Gracias por impulsarme a llegar a este punto.

Al resto de mi familia en Yucatán que no he mencionado hasta aquí: Charly, Isaac, Mary, Antar, Quetza, Maryjo, Raúl, Nancy, Lina, Gemma y Pam, por todos los momentos compartidos y el apoyo que me dieron en innumerables formas y aspectos.

A David, por ser el mejor amigo en el manglar de amigos. Gracias por ayudar a mi cordura durante el encierro.

A las y los roomies que compartieron conmigo, ya sea mucho o poco, especialmente a Nats, Marta del Oriente, Ili, Dalia e Itzel.

A las y los compas de posgrado que pasaron parte de esta etapa a mi lado de una u otra forma en el cubo, en cursos, en salidas, en congresos... en particular a Efra, quien siempre despejaba mis dudas del PCB y a Adri, mi compañerita de *carrera*, literal y metafóricamente.

A mis tesisas, porque me dieron su confianza para aprender juntos.

A mi maestra Mayté Chávez, una mujer increíble y solidaria que me inspira siempre. Gracias por enseñarme tanto, especialmente a través de la controlología.

A Mayra Gutiérrez, Isaura Rojano y Roxana Íñigo, quienes me han ayudado a conocer, deconstruir y construir a la Xochitl de hoy.

A mis morritas, Dianuchi y Evamorada, con quienes se congela el tiempo y me transportan a nuestros Forever 21.

A más personas especiales que siempre están cuando les necesito y con quienes el cariño no conoce tiempos ni espacios: Fio, Cuauh, Gus, Tanis Truchis, Freyermuth, Maritzonia, Marcius, Borrego (alias Jesús), Galaxia, Mar y Xime.

A las personas que han formado mucho de lo que soy: Paty, Edith, Daff y Alfred. Gracias por ser y estar, pero principalmente, gracias por querer a todas las versiones de mí que han conocido. Soy muy afortunada de crecer a su lado.

A todas aquellas mujeres en la ciencia que abrieron (y siguen abriendo) camino para que cualquier joven pudiese (y pueda) llegar a ser científica, GRACIAS POR SU LUCHA.  
"¡Nunca más una ciencia sin nosotras!"

A todo el personal de salud que estuvo al frente de la pandemia desde que inició en 2020.  
Gracias por su inmenso trabajo.

Dedicatoria

Para mi tía Coca, María Antonieta Arriaga Lemus, mi primera maestra y mi segunda mamá

Para la Luz *cristinata* más Vital de todas y, que afortunadamente, es mi hermana

Para Mariluz, la mejor mamá del mundo

Para mí tía Paty, Patricia Vital Torres, un brazo que no sabía que necesitaba, hasta que lo tuve para sostenerme

Este trabajo fue posible gracias a su inconmensurable apoyo, ejemplo y amor.

*In memoriam*

Marctl Rich, el más rojo revolución

Jorge Rosas, el coquefléix que se fue antes de tiempo

Cristina Martínez, una mujer fuerte que sigue presente

Dan Leahy, el "gringo" que me enseñó el significado de la solidaridad

"El señor" Horacio Tovalín, mi abuelito adoptivo

Dobby, mi compañero perruno de vida

Mi papá Antonio, el *vitaminas* que me falta diario, a quien quiero de aquí al fondo del mar,  
misterioso mar.

La vida en la tierra es más como un verbo. Se repara, se mantiene, se recrea y se supera a sí misma

-Lynn Margulis

Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light

-Albus Dumbledore

Quiero reconocer a todas las babosas marinas que se tuvieron que sacrificar para este trabajo. Un agradecimiento no sería suficiente, así que solo quería externar que las vidas de los organismos con los que trabajamos no deben ser subestimadas.

## Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	3
Introducción general .....	5
Artículo I. La heterogeneidad de pigmentos y ácidos grasos en la babosa marina <i>Elysia crispata</i> no está relacionada a la profundidad del hábitat .....	9
Artículo II. Animales fotosintéticos y dónde encontrarlos: Abundancia y talla de una babosa marina solar en diferentes condiciones de luz.....	26
Introduction .....	29
Materials and methods.....	31
Results .....	35
Discussion.....	40
References.....	45
Artículo III. Preferencia lumínica en una babosa marina fotosintética: ¿la aclimatación a la luz de los cleptoplastos es importante?.....	53
Introducción.....	53
Materiales y métodos .....	56
Resultados .....	67
Discusión.....	82
Literatura citada .....	89
Discusión general y conclusiones.....	93
Referencias bibliográficas.....	97
Apéndices .....	102
Apéndice I. Datos complementarios del artículo II.....	102
Apéndice II. Artículos publicados adicionalmente durante el desarrollo de este proyecto .....	116

## Resumen

La luz es uno de los factores más importantes en determinar la presencia y distribución de los seres vivos en su hábitat. Existen animales que poseen cloroplastos y pueden efectuar la fotosíntesis, como algunas babosas marinas sacoglosas; las cuales retienen estos organelos de las algas con las que se alimentan (proceso denominado cleptoplastia) y se benefician de ellos. Este proyecto indagó la ecología de *Elysia crispata*, una especie de molusco con retención longeva de cloroplastos funcionales, con relación a aspectos poblacionales y conductuales, en diferentes condiciones de la luz. El primer artículo fue una primera aproximación para relacionar la biología de la especie con su hábitat. El objetivo fue caracterizar el perfil de los pigmentos fotosintéticos, el contenido de lípidos totales, glicolípidos y fosfolípidos y, la composición de ácidos grasos de *E. crispata* de distintas profundidades. Para ello, se analizaron organismos de dos hábitats: somero (0–4 m) y profundo (8–12 m), en un arrecife del Sistema Arrecifal Veracruzano. Se encontró que la composición y concentración de biomoléculas no están relacionadas con la profundidad, ya que hubo una gran variación en composición y concentraciones de las muestras de las mismas profundidades. En el segundo artículo, el objetivo fue caracterizar la variación en la abundancia y talla de tres poblaciones de *E. crispata* en arrecifes del Atlántico mexicano en un gradiente de profundidad y a lo largo de un día. Los individuos fueron contados y medidos en cuadrantes en diferentes sitios de las localidades. Usando un modelo de binomial negativa “inflado” de ceros (ZINB), se encontró que el número de babosas esperadas es distinto entre los arrecifes Arcas y Verde, con respecto a Puerto Morelos (PM) y, en los primeros arrecifes mencionados se predijo que a menores profundidades (< 2 m), se puede encontrar una mayor abundancia (> 50), mientras que en PM pocos organismos se encuentran sin importar la profundidad; además, el amanecer es el único periodo del día en el que se espera una abundancia menor con respecto al resto de los periodos estudiados. La talla de *E. crispata* varió con el periodo del día y dicha variación fue distinta dependiendo del arrecife. De acuerdo con estos resultados, se sugiere que esta babosa marina tiene cierta movilidad dentro de los arrecifes. En el tercer y último artículo, se determinó la preferencia (selección activa) de *E. crispata* por el espectro y la intensidad de la luz y, se estableció si su preferencia por cierta intensidad lumínica se modificaba después de haber sido alimentada con algas aclimatadas a luz alta ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), comparado con las babosas marinas correspondientes a esas intensidades que participaron en un experimento anterior, las cuales habían consumido algas aclimatadas a luz baja (40

$\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Para ello, se realizaron tres experimentos en el laboratorio: 1) espectro, 2) intensidad y 3) aclimatación. En general, se observó mucha variación en el comportamiento de los 115 organismos analizados durante los tres experimentos. *Elysia crispata* prefiere intensidades lumínicas bajas ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y su espectro menos preferido es el rojo ( $\sim 665 \text{ nm}$ ); las variables analizadas (frecuencia final, frecuencia de 1ª elección, frecuencia de muestreo, latencia y duración) mostraron que *E. crispata* modifica su elección por la intensidad lumínica después de haber consumido alga aclimatada a luz alta ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). No obstante, sólo fue posible asociar la elección (frecuencia) final por la luz de alta intensidad a una conducta de selección activa. En síntesis, esta investigación permitió concluir que la cantidad y calidad de la luz es relevante para la distribución y el comportamiento de *E. crispata*. Los resultados de este estudio ayudan a entender al sistema animal-cloroplasto en conjunto con su entorno natural.

## Abstract

Light is one of the most important factors defining the presence and distribution of the organisms in their habitat. There are animals that possess chloroplasts and can photosynthesize, such as some sacoglossan sea slugs, which retain these organelles from the algae they feed on (a process called kleptoplasty) and benefit from them. This project analyzed the ecology of *Elysia crispata*, a mollusk species with long-term retention of functional chloroplasts, in relation to population and behavioral aspects, in different light conditions. The first paper was a first approach to relate the biology of the species with its habitat. The aim was to characterize the photosynthetic pigment profile, total lipid, glycolipid and phospholipid content, and fatty acid composition of *E. crispata* from different depths. For this purpose, organisms from two habitats were analyzed: shallow (0–4 m) and deep (8–12 m), in a reef from Sistema Arrecifal Veracruzano. It was found that the composition and concentration of biomolecules are not related to depth, as there was a large variation in the results of samples from the same depths. In the second paper, the aim was to characterize the variation in abundance and size of three populations of *E. crispata* in the Mexican Atlantic in a depth gradient and throughout one day. Individuals were counted and measured in quadrats at different sites of the localities. Using a zero inflated negative binomial model (ZINB), it was found that the number of expected slugs is different between Arcas and Verde reefs, with respect to Puerto Morelos (PM) and, in the first mentioned reefs it was predicted that at shallower depths (< 2 m), a higher abundance (> 50) can be found, while in PM few organisms are found regardless of depth; in addition, sunrise is the only period of the day in which a lower abundance is expected with respect to the rest of the periods studied. The size of *E. crispata* varied with the period of the day and this variation was different depending on the reef. According to these results, it is suggested that this sea slug has some mobility within the reefs. In the third and last paper, the preference (active selection) of *E. crispata* for the light spectrum and intensity was determined and, it was established whether its preference for a certain light intensity was modified after being fed with algae acclimated to high light ( $425 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) compared to sea slugs from a previous experiment, which had consumed algae acclimated to low light ( $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). For this goal, three experiments (1: spectrum, 2: intensity, 3: acclimation) were performed in the laboratory. In general, large variation was observed in the behavior of the 115 organisms analyzed during the three experiments. *Elysia crispata* prefers low light intensities ( $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and its least preferred spectrum is red ( $\sim 665 \text{ nm}$ ); the



variables analyzed showed that *E. crispata* modifies its choice for light intensity after having consumed algae acclimated to high light. However, it was only possible to associate the final choice for high light intensity to an active selection behavior. In summary, this research led to the conclusion that the quantity and quality of light is relevant for the distribution and behavior of *E. crispata*. The results of this study help to understand the animal-chloroplast system in combination with its natural environment.

## Introducción general

Entre los distintos factores que rigen la presencia y distribución de los seres vivos en su hábitat, la luz<sup>1</sup> representa uno de los recursos más importantes, especialmente para los organismos autótrofos porque es su principal fuente de energía para realizar funciones metabólicas. Este recurso también es una condición, ya que sus variaciones de intensidad a lo largo del día y del año, determinan la conducta y fisiología de otros organismos, además de los autótrofos. En muchos animales, la luz señala el inicio o fin de periodos de actividad (ritmos circadianos); por ejemplo, define cuándo es el mejor momento para alimentarse o para evitar depredadores (Begon *et al.* 2006, Alcock 2009).

Dos características fundamentales de los organismos autótrofos, como las plantas y las algas, son tener cloroplastos y efectuar la fotosíntesis. No obstante, también existen animales, como las babosas marinas del superorden Sacoglossa, que pueden incorporar y retener esos organelos de las algas de las cuales se alimentan y, mantenerlos activos en sus células digestivas (Rumpho *et al.* 2001). Esta capacidad es llamada cleptoplastía y, sólo mantiene funcionando a los organelos (cleptoplastos), no al alga completa. De acuerdo con distintos trabajos, existe un traspaso de productos fotosintéticos al animal, que le beneficia (Greene 1970, Trench *et al.* 1973a, Laetz *et al.* 2017, Cruz *et al.* 2020, Cartaxana *et al.* 2021), aunque todavía no es claro cómo ocurre el proceso.

La cleptoplastía también se presenta en foraminíferos, dinoflagelados, ciliados y, recientemente, se encontró en otro grupo de metazoarios, los gusanos policlados (Van Steenkiste *et al.* 2019, Cartaxana *et al.* 2021). Sin embargo, la retención funcional longeva (de más de una semana) en animales sólo ocurre en las babosas marinas sacoglosas (Händeler *et al.* 2009). Algunos estudios han demostrado que se pueden observar cloroplastos en diferentes estados de degradación dentro de las células de las glándulas digestivas, lo que depende de la especie de babosa marina y la especie de alga que estos animales consumen (de Vries *et al.* 2014), además de su capacidad de incorporar plástidos (reflejada en la estructura de los fagosomas) y de la duración de su periodo de hambruna (Curtis *et al.* 2010, Wägele y Martin 2014).

---

<sup>1</sup> En este trabajo, la irradiancia se usará como el término para describir a la luz; éste se refiere al flujo de radiación por unidad de área en una superficie (medida en  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e incluye sólo una porción del espectro, particularmente la que penetra la atmósfera de la Tierra; es decir, la energía radiante de longitudes de onda de 300 a 720 nm.

La duración de la retención de cloroplastos activos en las células de las babosas marinas también depende de la cantidad de luz a la que son expuestos (Vieira *et al.* 2009). Similar a las plantas y algas acuáticas, los organismos fotosimbiontes marinos como estas babosas, tienen que enfrentar una variación adicional de la luz, la que ocurre con los cambios de profundidad en su hábitat, ya que el medio acuático absorbe y dispersa la luz (Kirk 2011). En ambientes acuáticos someros, las intensidades lumínicas muy altas pueden generar fotoinhibición de la fotosíntesis, lo que implica una disminución en la tasa de fijación de carbono. Una de las respuestas fisiológicas que las babosas sacoglosas tienen ante la disminución de dicho proceso por un exceso de luz, involucra cambios en la composición y concentración de pigmentos de los cleptoplastos (Vieira *et al.* 2009, Jesus *et al.* 2010).

Los pigmentos fotosintéticos son compuestos captadores de luz presentes en los cloroplastos, cuya función principal es absorber la energía luminosa necesaria para generar la fotosíntesis (Terashima *et al.* 2009). La composición de los pigmentos es muy variable en función del tipo de alga y de la aclimatación al régimen lumínico (Wilhelm *et al.* 2014). Debido a que la luz es un factor que determina la actividad fotosintética de dichos organelos en las babosas marinas sacoglosas, es importante entender cómo el tipo y cantidad de luz afectan la cleptoplastía en distintos niveles (Serôdio *et al.* 2014), por ejemplo, celular, individual o poblacional. La caracterización de los pigmentos fotosintéticos presentes en los cleptoplastos proporciona una línea base para entender mejor la fotorregulación en este grupo de moluscos que habita en ambientes marinos costeros (Ventura *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2014).

Los lípidos y los ácidos grasos (AG) son una importante fuente de energía metabólica (Parrish 2013). En los moluscos, estas moléculas son importantes para la gametogénesis y pueden utilizarse como fuente de energía durante periodos de escasez de alimentos (Voogt 1983). El perfil de los AG en moluscos marinos depende de factores ambientales y biológicos (Joseph 1982). Algunos de los trabajos en el tema han encontrado que los lípidos sintetizados por los cleptoplastos en el interior de *Elysia chlorotica* son cruciales para el establecimiento y la estabilización de la cleptoplastía (Pelletreau *et al.* 2014) y también, que el lipidoma de los cleptoplastos secuestrados por *Elysia viridis*, no muestra cambios importantes a largo plazo en condiciones de ayuno (Rey *et al.* 2017). Por lo tanto, la información sobre la composición y abundancia de diferentes clases de lípidos y AG puede ayudar a dilucidar la importancia y la interacción de los cloroplastos y las células animales.

Las condiciones de luz influyen en el traspaso de carbono y nitrógeno de los cleptoplastos a las babosas marinas (Cruz *et al.* 2020, Cartaxana *et al.* 2021). Existe evidencia de que la fotosíntesis de los cleptoplastos minimiza la disminución de peso y talla, así como aumenta la supervivencia en *E. viridis*, *Elysia timida* y *E. chlorotica* durante condiciones de ayuno (Giménez-Casalduero y Muniain 2008, Pelletreau *et al.* 2014, Cartaxana *et al.* 2017). También, el crecimiento eficiente de *E. viridis* se ha correlacionado con la exposición a una luz regular y un aumento de la fotosíntesis (Baumgartner *et al.* 2015). Por lo tanto, sería razonable esperar que las condiciones de luz determinan la abundancia y la talla de *E. crispata* en su ambiente porque limitan la obtención de recursos fotosintéticos y su desarrollo óptimo.

Al igual que otros animales, las babosas marinas pueden cambiar su comportamiento dependiendo de las condiciones lumínicas, ya sea exhibiendo una fototaxia (positiva o negativa) o mostrando preferencia por ciertas intensidades y/o espectros de la luz (Weaver y Clark 1981, Miyamoto *et al.* 2015, Cartaxana *et al.* 2018, 2019). La cleptoplastía se reconoce como una endosimbiosis (Pelletreau *et al.* 2011), por lo que examinar la relación de la luz con la distribución y conducta de animales fotosintéticos, proveerá información para entender cómo aspectos genéticos, bioquímicos y ecológicos de taxones lejanamente emparentados han evolucionado para resultar en un modelo biológico excepcional (Cruz *et al.* 2013).

Las babosas marinas estudiadas en este trabajo son moluscos gasterópodos principalmente de coloración verdosa, con morfología muy variable que incluye estructuras como las ceratas, los parapodios<sup>2</sup> o la concha (Händeler *et al.* 2009). El grupo al que pertenecen, Sacoglossa, se distingue porque sus miembros son herbívoros succionadores (usualmente consumen algas verdes Sifonales) y por poseer una rádula uniseriada, estructura con forma de cinta que sirve para alimentarse, en la que los dientes más viejos y desgastados se retienen en un saco. Generalmente, los dientes tienen forma de espada y son utilizados para atravesar las células algales y de esta forma, succionar y tragar los contenidos de los fluidos de las algas (Jensen 1993). Con excepción de los cloroplastos, el contenido citoplásmico es digerido, por lo que estas babosas marinas han sido clasificadas como animales mixotróficos.

---

<sup>2</sup> Las ceratas y los parapodios son prolongaciones del manto, las primeras tienen forma alargada y delgada, mientras que los segundos tienen forma de alas.

*Elysia crispata* es un buen modelo para estudiar la distribución y comportamiento de babosas marinas fotosintéticas, ya que es una de las especies de Sacoglossa con mayor tiempo de retención de cloroplastos en condiciones de ayuno (Wägele y Martin 2014), tiene una talla que permite hacer observaciones directas y es viable mantenerla en laboratorio (Curtis *et al.* 2015, Dionísio *et al.* 2017). Aunque la fisiología y bioquímica de la cleptoplastía en babosas sacoglosas ha sido bastante estudiada (revisado por Pelletreau *et al.* 2011, Rumpho *et al.* 2011, Wägele y Martin 2014), conocer la ecología poblacional y conductual contribuirá a relacionar cómo influye la luz en la distribución espacio-temporal de estos organismos (Weaver y Clark 1981, Cruz *et al.* 2013, Serôdio *et al.* 2014, Miyamoto *et al.* 2015). Por ello, este estudio fue dirigido a conocer aspectos poblacionales y conductuales de la babosa marina *E. crispata*, en diferentes condiciones de la luz, grupo y proceso poco conocidos en el mundo y, particularmente, en las poblaciones que se distribuyen en nuestro País.

# Artículo I. La heterogeneidad de pigmentos y ácidos grasos en la babosa marina *Elysia crispata* no está relacionada a la profundidad del hábitat



animals



Article

## Pigment and Fatty Acid Heterogeneity in the Sea Slug *Elysia crispata* Is Not Shaped by Habitat Depth

Xochitl Guadalupe Vital <sup>1,2</sup>, Felisa Rey <sup>3,4,\*</sup>, Paulo Cartaxana <sup>5</sup>, Sónia Cruz <sup>5</sup>, Maria Rosário Domingues <sup>3,4</sup>, Ricardo Calado <sup>5</sup> and Nuno Simões <sup>2,6,7,\*</sup>

- <sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; vital@ciencias.unam.mx
  - <sup>2</sup> UMDI-Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de Abrigo S/N, Sisal 97356, Mexico
  - <sup>3</sup> Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), Department of Chemistry, Campus Universitário de Santiago, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal; mrd@ua.pt
  - <sup>4</sup> Mass Spectrometry Centre & LAQV-REQUIMTE, Department of Chemistry, Campus Universitário de Santiago, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal
  - <sup>5</sup> ECOMARE, CESAM, Department of Biology, Campus Universitário de Santiago, University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal; pcartaxana@ua.pt (P.C.); sonia.cruz@ua.pt (S.C.); rcalado@ua.pt (R.C.)
  - <sup>6</sup> International Chair for Coastal and Marine Studies, Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies, Texas A and M University-Corpus Christi, Corpus Christi, TX 78412, USA
  - <sup>7</sup> Laboratorio Nacional de Resiliencia Costera (LANRESC), Laboratorios Nacionales, CONACYT, Sisal 97356, Mexico
- \* Correspondence: felisa.rey@ua.pt (F.R.); ns@ciencias.unam.mx (N.S.);  
Tel.: +52-988-931-10-00 (N.S.), +351-234-370-692 (F.R.)



**Citation:** Vital, X.G.; Rey, F.; Cartaxana, P.; Cruz, S.; Domingues, M.R.; Calado, R.; Simões, N. Pigment and Fatty Acid Heterogeneity in the Sea Slug *Elysia crispata* Is Not Shaped by Habitat Depth. *Animals* **2021**, *11*, 3157. <https://doi.org/10.3390/ani11113157>

Received: 24 September 2021  
Accepted: 30 October 2021  
Published: 5 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Simple Summary:** Some species of sacoglossan sea slugs are able to steal chloroplasts from the algae they feed on and maintain them functional for several months, a process termed “kleptoplasty”. One of these photosynthetic slugs is *Elysia crispata*, found in coral reefs of the Gulf of Mexico. This sacoglossan inhabits different depths (0–25 m), being exposed to different food sources and contrasting light conditions. In this work, we characterized the pigment and fatty acid (FA) profiles, and quantified the total lipid, glycolipid and phospholipid contents of *E. crispata* from shallow (0–4 m) and deeper (8–12 m) waters, after a month of starvation to determine the longest and more stable retention of chloroplasts and its relation to habitat depth. Biochemical analyses allowed the identification of 12 photosynthetic pigments and 27 FAs. Heterogeneity in the composition of pigments confirmed the long-term retention of functional chloroplasts ingested from different algae. However, the differences found in pigment profile, total lipid content, and FA composition on individuals of *E. crispata* were not related to habitat depth. High amounts of glycolipids, exclusive chloroplast lipids, suggest a good condition of these photosynthetic organelles in animal cells. These results contribute baseline physiological data that may help explain evolutionary associations such as endosymbiosis.

**Abstract:** Long-term retention of functional chloroplasts in animal cells occurs only in sacoglossan sea slugs. Analysis of molecules related to the maintenance of these organelles can provide valuable information on this trait (kleptoplasty). The goal of our research was to characterize the pigment and fatty acid (FA) composition of the sea slug *Elysia crispata* and their associated chloroplasts that are kept functional for a long time, and to quantify total lipid, glycolipid and phospholipid contents, identifying differences between habitats: shallow (0–4 m) and deeper (8–12 m) waters. Specimens were sampled and analyzed after a month of food deprivation, through HPLC, GC-MS and colorimetric methods, to ensure an assessment of long-term kleptoplasty in relation to depth. Pigment signatures indicate that individuals retain chloroplasts from different macroalgal sources. FA classes, phospholipid and glycolipid contents displayed dissimilarities between depths. However, heterogeneities in pigment and FA profiles, as well as total lipid, glycolipid and phospholipid amounts in *E. crispata* were not related to habitat depth. The high content of chloroplast origin molecules, such as Chl *a* and glycolipids after a month of starvation, confirms that *E. crispata* retains

chloroplasts in good biochemical condition. This characterization fills a knowledge gap of an animal model commonly employed to study kleptoplasty.

**Keywords:** Mollusca; Heterobranchia; kleptoplasty; lipidomics; phospholipids; glycolipids

## 1. Introduction

Superorder Sacoglossa includes sea slug species that are able to acquire chloroplasts from the algae they feed upon and keep them functional inside their digestive gland cells, a process termed kleptoplasty [1]. Until recently, sacoglossan sea slugs were the only known metazoans displaying such a mechanism [2]. Van Steenkiste et al. [2] reported the first known case of other metazoans (flatworms) capable of maintaining functional algal chloroplasts for one week. The retention period of “stolen” functional chloroplasts (kleptoplasts) within sacoglossan sea slugs may vary from a few hours to several weeks or months, depending on sea slug species, its life stage and the chloroplast algal source [3–6]. Moreover, abiotic factors such as irradiance levels and temperature can also play a key role over the time frame during which kleptoplasts are retained [7–9]. For instance, Vieira et al. [7] found that retention of photosynthetic activity of chloroplasts in starved *Elysia viridis* under high-light conditions decreased exponentially and lasted only 6 to 15 days, compared to low-light conditions in which retention times were longer (15 to 57 days) [7].

Photosynthetic sea slugs are generally stenophagous, feeding on a specific genus or species of algae. For example, *E. timida* only consumes algal species of genus *Acetabularia*, and *E. chlorotica* feeds exclusively on genus *Vaucheria* [10,11]. However, one of the exceptions to this stenophagous pattern is *E. crispata*, which can consume up to 17 different species of macroalgae according to DNA analyses [12]. The main genera of macroalgae this sacoglossan is known to feed upon are *Bryopsis*, *Penicillus* and *Halimeda* [12,13], although occasionally other genera are also mentioned [6,14,15]. *Elysia crispata* kleptoplast sources assessed through different techniques (e.g., electron microscopy, DNA barcoding) or observations are listed in Supplementary Table S1. Although *E. crispata* can feed on several species, only chloroplasts from the macroalgae *Bryopsis plumosa* and *Penicillus capitatus* have been reported to be kept functional for more than 10 weeks [16,17], while those originating from *Halimeda incrassata* were kept functional for up to 49 days [6]. In the case of *P. capitatus*, kleptoplasts were still present in slug tissues with different degradation levels after 120 days of starvation [18]. In another study, after one week of starvation of *E. crispata*, chloroplasts from four algal species were detected by DNA analysis: *P. capitatus*, *P. lamourouxii*, *H. incrassata* and *H. monile* [13]. Christa et al. [6] also analyzed the DNA of chloroplasts from *E. crispata* under 7, 28, 35 and 49 days of starvation and found different unidentified algae belonging to Bryopsidales, as well as the consistent presence of *H. incrassata* in the 8 sea slug specimens surveyed. The rest of macroalgal species reported through DNA barcoding (see Supplementary Table S1) were identified in sea slugs analyzed immediately after collection, without a period of starvation to clean their gut. As such, if chloroplasts from those food sources can also be retained functional for a long-term in this sacoglossan remains to be studied.

Many of the known photosynthetic pigments are light harvesting compounds present in chloroplasts, whose main function is to absorb the light energy necessary to power photosynthesis [19]. Pigment composition is highly variable depending on the type of algae and acclimation to the light regime [20]. Some pigments (i.e., xanthophylls) have been related to photoprotection, and it has been hypothesized that they may play an important role in kleptoplasts retention by sea slugs [21–24]. Chlorophyll *a* and *b* have been reported to be synthesized in sea slugs’ cells by some authors [25,26], while others have found no evidence supporting this synthesis [27]. Even though it is not clear if pigments are broken down or synthesized in the animal cells, they are still present after several days of starvation in different species of Sacoglossa. The presence of these molecules

can be related to long-term retention inside sea slug cells because they may alleviate light-induced oxidative stress [20,22,23]. As such, the characterization of photosynthetic pigments present in kleptoplasts provides a baseline to better understand photoregulation in sea slugs inhabiting coastal marine environments [28,29].

Lipids and fatty acids (FAs) are a major source of metabolic energy, the main constituents of biological membranes, and play a relevant role in cell signaling [30]. In mollusks, these molecules are important for gametogenesis and can be used as an energy source during periods of food shortage [31]. The FA profile in mollusks and marine invertebrates depends on environmental and biological factors, such as diet, temperature or reproductive cycle [32]. Few works have related lipids to kleptoplasty in sacoglossan sea slugs. Pelletreau et al. [33] proposed that lipids synthesized by kleptoplasts inside *E. chlorotica* were crucial for the establishment and stabilization of kleptoplasty; moreover, Trench et al. [34] studied the incorporation of CO<sub>2</sub> into glycolipids from the chloroplasts of *Codium fragile* to *E. viridis*. More recently, Rey et al. [35,36] analyzed the lipidome of two sea slug species, *E. viridis* and *Placida dendritica* feeding upon the same macroalgae, *C. tomentosum*, but with contrasting kleptoplasty performance. These studies revealed that the lipidome of the chloroplasts sequestered by *E. viridis*, which can perform long-term retention of functional chloroplasts, displays no major shifts and that the lipidome of this sea slug was unaffected by the absence of food for one week [35]. However, in *P. dendritica*, whose retention of chloroplasts is non functional, the lipidome varied significantly in this short period of time [36]. Therefore, information on composition and abundance of different lipid classes and FAs can help elucidate the importance and interaction of chloroplasts and animal cells.

*Elysia crispata*, the largest and most abundant species of Sacoglossa in the Caribbean and Gulf of Mexico, is one of the few species that can retain functional kleptoplasts for up to four months [1,6,13]. This sea slug can reach up to 15 cm in size [37], and inhabits mangrove areas and coral reefs from shallow water (<1 m) up to 25 m depth [38]. Different habitats at different depths provide diverse sources of macroalgal food, as well as contrasting environmental conditions, such as irradiance [39]. Distinct light conditions that change with depth can affect pigment composition and photosynthesis performance, and consequently, they may affect kleptoplasty as evidenced in experiments developed by Vieira et al. [7].

The goal of the present study was to characterize the photosynthetic pigment profile, total lipid, glycolipid-GL and phospholipid-PL contents and FA composition of *E. crispata* sampled at two habitat depths with different light conditions: shallow (0–4 m) and deeper (8–12 m) waters after a month of starvation to determine if the longest and more stable retention of chloroplasts is related to habitat depth. We hypothesized that the molecular composition of sea slugs varies with habitat depth.

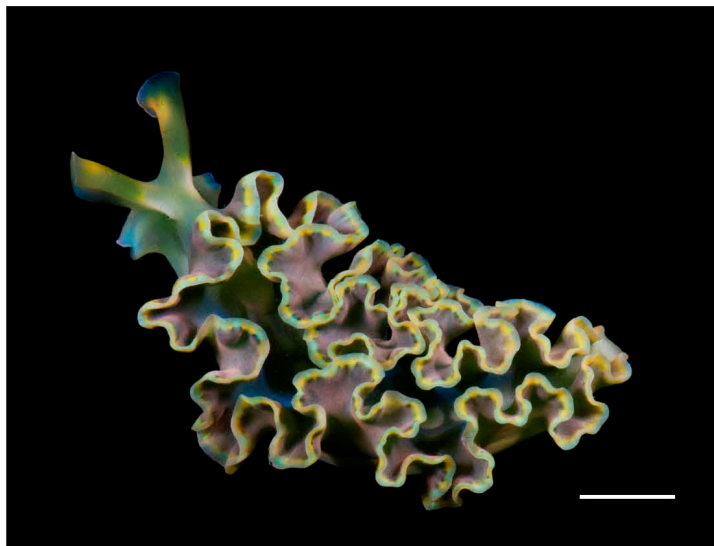
## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sample Collection

Specimens of *Elysia crispata* (Figure 1) from the same population were collected in three different sampling sites, less than 400 m apart from each other and with an approximate area of 300 m<sup>2</sup>, at the Verde coral reef (Sistema Arrecifal Veracruzano) in Veracruz, Southern Gulf of Mexico (19° 12' 8.80" N, 96° 4' 17.20" W) in a single day of September 2019. No macroalgae were spotted nearby, only turf algae were seen on top of hard substrate. Collecting was limited to the minimal sample size needed and was conducted under a permit issued by SAGARPA (PPF/DGOPA-082/19). Fourteen organisms measuring at least 40 mm in size (total length) were collected on hard substratum at 0–4 m depth ( $n = 7$ ) and 8–12 m depth ( $n = 7$ ). Their morphological characteristics matched the “*crispata*” ecotype described by Krug et al. [40]. Animals were transported to the laboratory, where they were maintained in a recirculating filtered seawater system (temperature: 26 °C, salinity: 35, light-dark photoperiod 12:12 h, with an irradiance of 40 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Animals were maintained for a month under starvation to ensure that sea slugs emptied their guts and digested short-term retained chloroplasts. Individuals were then flash frozen in liquid



nitrogen and freeze-dried for biochemical analysis. The whole biomass of each sea slug was individually homogenized and used for extractions.



**Figure 1.** Specimen of *Elysia crispata* collected from the coral reef Verde (Sistema Arrecifal Veracruzano) in Veracruz, Southern Gulf of Mexico. Scale bar = 10 mm.

### 2.2. Photosynthetic Pigment Analysis

Photosynthetic pigments were extracted using methods detailed in Cruz et al. [29]. Briefly, samples were extracted in 95% cold buffered methanol with 2% ammonium acetate. Samples were ground with a plastic rod and sonicated for 30 s and vortexed. Samples were then transferred to  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min in the dark. Extracts were filtered through  $0.2\text{ }\mu\text{m}$  PTFE membrane filters and immediately injected into a Prominence-i LC 2030C High-performance liquid chromatography (HPLC) system (Shimadzu, Japan) with a photodiode array detector. Chromatographic separation was carried out using a Supelcosil C18 column (250 mm length; 4.6 mm diameter;  $5\text{ }\mu\text{m}$  particles; Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) for reverse phase chromatography and a 35 min elution program [41]. Photosynthetic pigments were identified from retention times and absorbance spectra, and concentrations calculated from the signals in the photodiode array detector. Pigment calibration was done using pure crystalline standards from DHI (Hørholm, Denmark).

### 2.3. Lipid Analysis

Total lipids were extracted following a modification of the Bligh and Dyer method [42]. Briefly, animal tissues were homogenized, mixed with  $800\text{ }\mu\text{L}$  of methanol and  $400\text{ }\mu\text{L}$  of dichloromethane, vortexed and sonicated for 1 min, then, incubated on ice for 30 min on a rocking platform shaker and centrifuged at 2000 rpm for 10 min at room temperature. The organic phase was collected, and the biomass residue was re-extracted.

Ultrapure water was added ( $800\text{ }\mu\text{L}$ ) and centrifuged at 2000 rpm for 10 min to recover the organic phase. An additional volume of  $800\text{ }\mu\text{L}$  of dichloromethane was added to the aqueous phase, centrifuged at 2000 rpm for 10 min and the organic phase was recovered. Organic phases were dried under a nitrogen stream and preserved at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for further analysis. Total lipid extract weight was estimated by gravimetry.

Glycolipid (GL) quantification in total lipid extracts was performed using the orcinol colorimetric method [43]. Briefly, 200 µg of total lipid extract was transferred to a glass tube and 1 mL of orcinol solution (0.2% in 70% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) was added after drying dichloromethane under a nitrogen flow. Tubes were then incubated for 20 min at 80 °C. D-Glucose standards of 2–50 µg (standard solution of D-glucose 2.0 mg mL<sup>-1</sup>) were used to prepare the calibration curve. At room temperature, the absorbance of standards and samples was measured at 505 nm using a microplate UV-Vis spectrophotometer. The conversion factor 100/35 (ca. 2.8) was used to estimate the total GL content in total lipid extracts [44].

Phospholipid (PL) content from total lipid extract was quantified through the phosphorus assay, according to Bartlett and Lewis [45]. Lipid extracts were re-suspended in 300 µL of dichloromethane and 10 µL of each sample were transferred to a glass tube washed with 5% nitric acid. After drying under a nitrogen flow, 125 µL of perchloric acid (70%) was added and samples were incubated for 1 h at 180 °C in a heating block. A total of 825 µL of ultrapure water, 125 µL of NaMoO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2.5%), and 125 µL of ascorbic acid (10%) were added to each sample, with the mixture being homogenized in a vortex following each addition. Tubes were then incubated for 10 min at 100 °C in a water bath. Standards of 0.1–2.0 µg phosphate (standard solution of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 100 µg of phosphorus mL<sup>-1</sup>) underwent the same treatment as samples, without the heating block step. At room temperature, absorbance of standards and samples was measured at 797 nm, using a microplate UV-Vis spectrophotometer. The conversion factor 775/31 (25) was used to estimate the total PL content in total lipid extracts.

FA profile of *E. crispata* was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). FA methyl esters (FAME) were prepared using 30 µg of total lipid extract, 1 mL of the internal standard 19:0 (0.5 µg mL<sup>-1</sup> in *n*-hexane, CAS number 1731-94-8, Merck) and 200 µL of a methanolic solution of potassium hydroxide (2 M) [46]. After homogenization of this mixture, 2 mL of an aqueous solution of sodium chloride (10 mg mL<sup>-1</sup>) were added. Sample was centrifuged at 2000 rpm for 5 min to separate the phases. The organic phase containing the FAME was transferred to a microtube and dried under a nitrogen stream. FAME were then dissolved in 40 µL of *n*-hexane, and 2 µL of this solution were injected on an Agilent Technologies 6890 N Network chromatograph equipped with a DB-FFAP column with 30 m length, an internal diameter of 0.32 mm, and a film thickness of 0.25 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). The GC was connected to an Agilent 5973 Network Mass Selective Detector operating with an electron impact mode at 70 eV and scanning the mass range *m/z* 50–550 in 1 s cycle in a full scan mode acquisition. The initial oven temperature was 80 °C, staying at this temperature for 3 min and increasing linearly to 160 °C at 25 °C min<sup>-1</sup>, followed by linear increases to 210 °C at 2 °C min<sup>-1</sup> and 250 °C at 30 °C min<sup>-1</sup>. Temperature was maintained at 250 °C for 10 min. The injector and detector temperatures were 220 °C and 250 °C, respectively. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.4 mL min<sup>-1</sup>. FAME present in the sample were identified by comparing their retention time and mass spectra with a commercial FAME standard mixture (Supelco 37 Component FAME Mix, ref. 47885-U, Sigma-Aldrich) and confirmed by comparison with the spectral library from 'The Lipid Web' [47]. FAME were quantified by using calibration curves of FAME standards acquired under the same instrumental conditions [48].

#### 2.4. Statistical Analysis

Total lipid, GL, PL and FA classes were analyzed through a Student's *t*-test for independent samples, to assess if statistical differences existed between depths. Assumptions were verified through visual examinations (normal distribution) and Levene's (homogeneity of variances) test [49,50]. Almost all of the distributions did not follow normality, thus, all of the data mentioned above (lipids, GL, PL and FA classes) were *log*<sub>2</sub> transformed, and then, the *t*-tests were performed [50].

To compare pigments and FA profiles of sea slugs from different depths, concentrations were first transformed to weight the contributions of all variables ( $\sqrt{x}$  was applied to pigments and  $\log(x + 1)$  to FAs), then collinearity of variables was analyzed using a

Draftsman Plot, and transformation of single variables was implemented whenever needed ( $\log x + 0.1$  for Anth and  $\beta\epsilon$ -Car, and  $\log x$  for 16:2  $n-6$ ). Subsequently, all samples were normalized before analyses due to differences in the magnitude of values [51], and a principal component's analysis (PCA) was performed for each data set to explore if any grouping occurred between organisms from the same depths. Subsequently, using these data, a resemblance matrix based on Euclidean distances among individual samples was made and used to perform a one-way analysis of similarities (ANOSIM), with depth as factor, for pigments and FAs separately, to test if statistically significant differences existed between depths. Data obtained in this study and used for analyses is available in <https://doi.org/10.5281/zenodo.5398824> (Accessed on 25 October 2021). All procedures and graphs were performed using ggplot2 and stats packages in R v. 4.0.5 software [52], or PRIMER v.7 software [53]. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

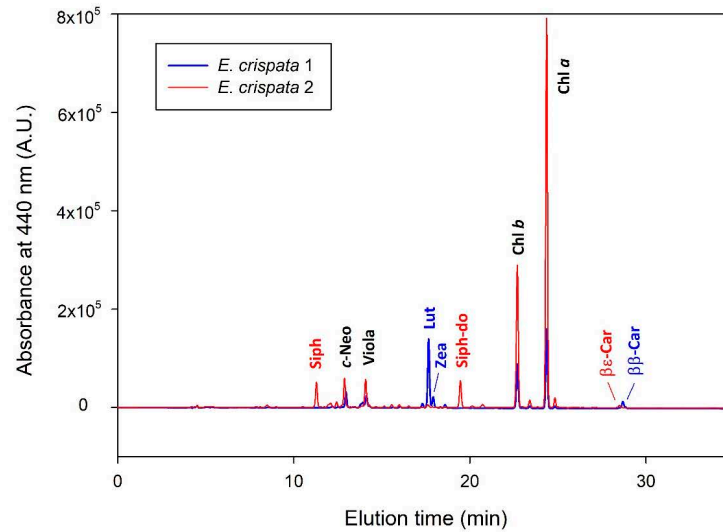
A total of 12 photosynthetic pigments were found in the samples of *E. crispata* (Table 1): 2 chlorophylls, 8 xanthophylls and 2 carotenes. While chlorophylls *a* and *b* (Chls *a* and *b*) were present in all individuals, the composition in carotenoids (xanthophylls and carotenes) differed between conspecifics. Some specimens displayed carotenoids typical of chloroplasts of siphonous green algae: siphonoxanthin (Siph), siphonoxanthin-dodecenoate (Siph-do) and  $\beta,\epsilon$ -carotene ( $\beta\epsilon$ -Car); while others contained pigments from other algal types, such as lutein (Lut), zeaxanthin (Zea) and  $\beta,\beta$ -carotene ( $\beta\beta$ -Car) (Figure 2); some specimens even displayed both sets of these carotenoids. To show examples of this pigment diversity, the profiles of two organisms from the same depth are represented in Figure 2.

**Table 1.** Photosynthetic pigments found in samples of *Elysia crispata* collected in Southern Gulf of Mexico (Sistema Arrecifal Veracruzano), with retention times and absorption maxima ( $\lambda$  max).

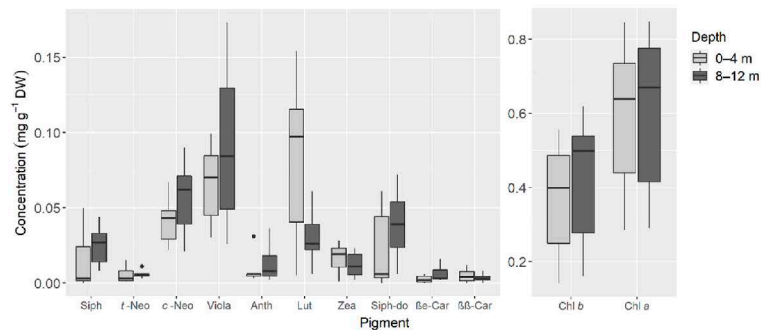
Pigment	Retention Time (min)	$\lambda$ max (nm)
Siphonoxanthin (Siph)	11.38	448
all- <i>trans</i> -neoxanthin ( <i>t</i> -Neo)	12.46	440, 471
<i>cis</i> -neoxanthin ( <i>c</i> -Neo)	12.98	414, 438, 467
Violaxanthin (Viola)	14.21	418, 442, 471
Antheraxanthin (Anth)	16.18	448, 476
Lutein (Lut)	17.86	448, 476
Zeaxanthin (Zea)	18.11	453, 480
Siphonoxanthin-dodecenoate (Siph-do)	19.76	454
Chlorophyll <i>b</i> (Chl <i>b</i> )	23.09	458, 646
Chlorophyll <i>a</i> (Chl <i>a</i> )	24.71	431, 663
$\beta,\epsilon$ -Carotene ( $\beta\epsilon$ -Car)	29.01	449, 477
$\beta,\beta$ -Carotene ( $\beta\beta$ -Car)	29.22	454, 478

The concentration of photosynthetic pigments recorded in sea slugs originating from the two habitat depths is shown in Figure 3. Although some differences were observed, particularly for Lut (higher concentrations at the shallower habitat), differences in pigment profiles between individuals were not statistically related to habitat depth (ANOSIM:  $p = 0.305$ ;  $R = 0.024$ ).

Principal components analysis (PCA) of pigments did not exhibit grouping depending on depth (Figure 4). A total of 80.6% of the variation of pigment's concentrations was explained by the first two components (PC1 63.8%, PC2 16.9%) (Figure 4). Most of the samples from 0 to 4 m habitats seemed to group in the right area of the  $x$  axis, but in general, samples were dispersed over both components. Vectors included in the graph show the different contribution of certain pigments in some of the individuals, as represented in Figure 2.

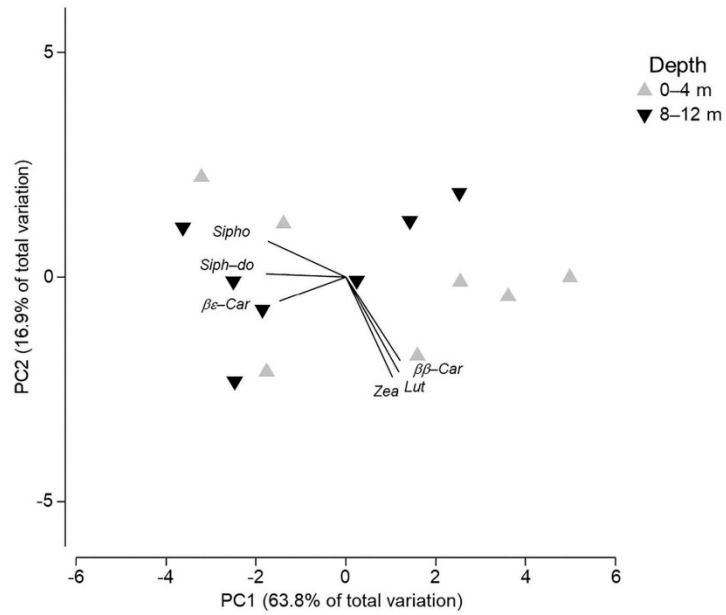


**Figure 2.** HPLC absorbance (440 nm) chromatograms of two specimens of *Elysia crispata* sampled at the same depth (0–4 m) and showing different photosynthetic pigment profiles. Common photosynthetic pigments are labeled in black, while specific photosynthetic pigments of samples 1 and 2 are shown in blue and red, respectively. See Table 1 for photosynthetic pigment abbreviations.

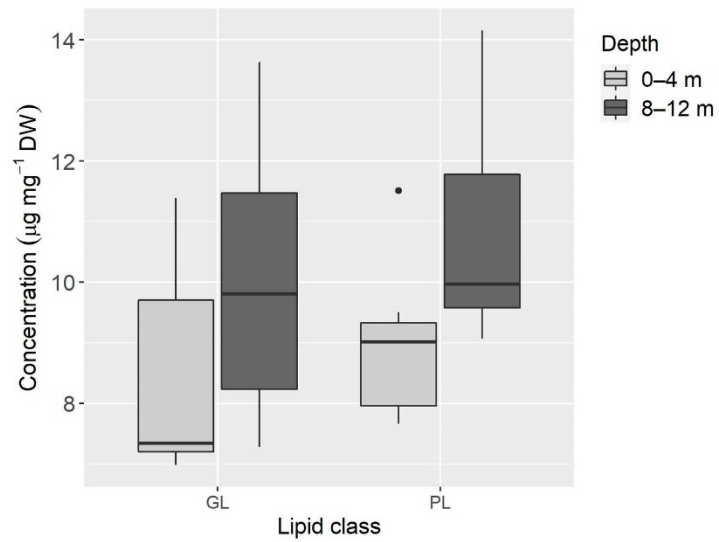


**Figure 3.** Concentration of photosynthetic pigments from samples of *Elysia crispata* collected at 0–4 m ( $n = 7$ ) and 8–12 m ( $n = 7$ ) depth, in the Southern Gulf of Mexico. The line represents the median, top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the maximum and minimum values, and dots are outliers. See Table 1 for full names and respective abbreviations of pigments.

The amount of total lipid recorded averaged  $79.0 \pm 27.8 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DW}$  (mean  $\pm$  SD) in specimens collected from the shallow habitat (0–4 m) and  $82.0 \pm 17.1 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DW}$  (mean  $\pm$  SD) in those from the depth range of 8–12 m; no statistical differences were found between samples from both depths ( $t(8.437) = -0.496, p = 0.632$ ). Likewise, GL and PL contents did not show statistical differences between depths (GL:  $t(11.87) = -1.346, p = 0.203$ ; PL:  $t(11.36) = -2.134, p = 0.055$ ), even though higher amounts (GL:  $10.0 \pm 2.3 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DW}$ ; PL:  $10.8 \pm 2.0 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DW}$ ) were found in the deeper habitat when compared to the shallow one (GL:  $8.5 \pm 1.9 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DW}$ ; PL:  $8.9 \pm 1.3 \mu\text{g mg}^{-1} \text{DW}$ ) (Figure 5).

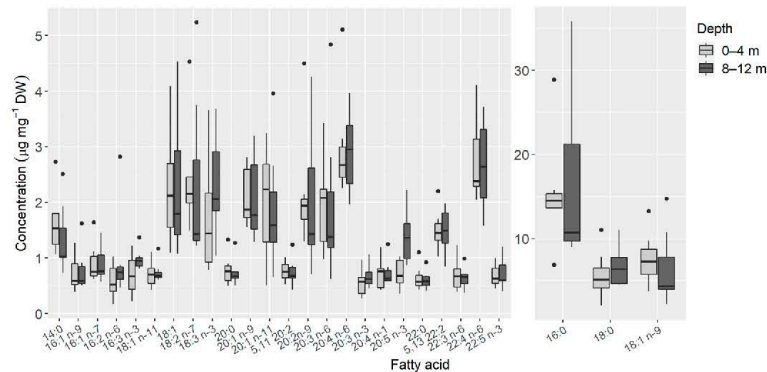


**Figure 4.** Principal components analysis (PCA) of photosynthetic pigment concentrations from samples of *Elysia crispata* collected at different depths in the Southern Gulf of Mexico.



**Figure 5.** Glycolipid (GL) and phospholipid (PL) concentrations from samples of *Elysia crispata* collected at 0–4 m ( $n = 7$ ) and 8–12 m ( $n = 7$ ) depths, in the Southern Gulf of Mexico. The line represents the median, top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the maximum and minimum values, and dots are outliers.

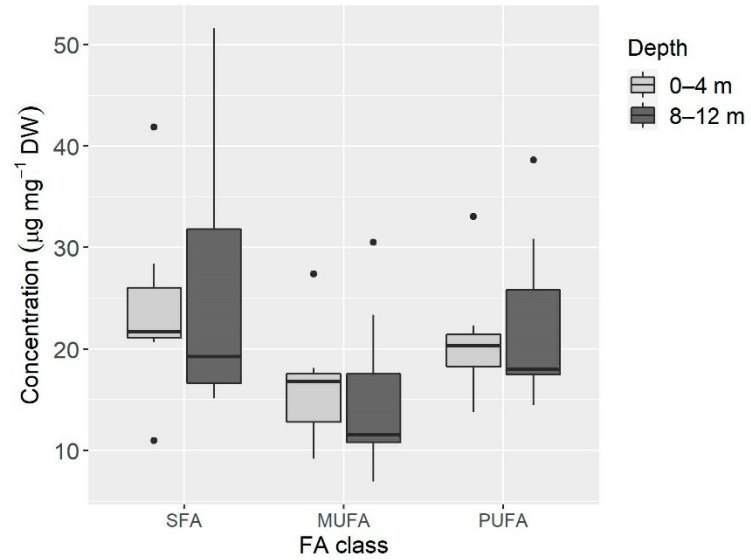
A total of 27 FAs were identified in the samples of *E. crispata* (Figure 6). Some variation was observed in the composition of FAs present in specimens collected at different depths, but also within those habitats. Therefore, no significant differences were found in the FA profiles between samples collected at 0–4 and 8–12 m depth (ANOSIM:  $p = 0.671$ ;  $R = -0.046$ ).



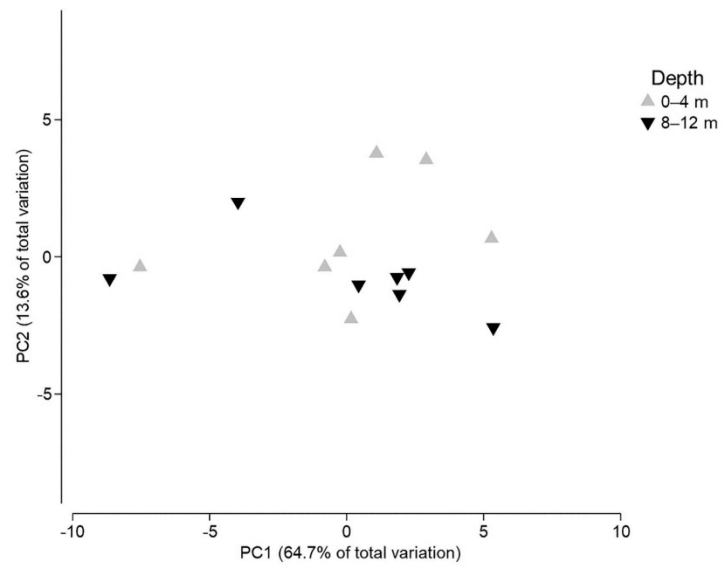
**Figure 6.** Fatty acid (FA) concentrations from samples of *Elysia crispata* collected at 0–4 m ( $n = 7$ ) and 8–12 m ( $n = 7$ ) depths, in the Southern Gulf of Mexico. The line represents the median, top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the maximum and minimum values, and dots are outliers.

Saturated FAs (SFA) 16:0 and 18:0, as well as the monounsaturated FA (MUFA) 18:1  $n-9$  were the most abundant FAs found in samples from sea slugs sampled at both depths, with all other FAs displaying average values lower than  $5 \mu\text{g mg}^{-1}$  DW (Figure 6). Of the FAs found in these sea slugs, 5 were SFA, 7 were MUFA and 15 were polyunsaturated FAs (PUFA). SFA represented almost 40% of the FA content, while PUFA (35%) and MUFA (25%) levels were lower. None of the FA classes showed statistically significant differences with depth (SFA:  $t(11.769) = -0.201$ ,  $p = 0.843$ ; MUFA:  $t(10.577) = 0.615$ ,  $p = 0.551$ ; PUFA:  $t(11.18) = -0.287$ ,  $p = 0.779$ ), despite higher mean values of SFA ( $26.1 \pm 13.4 \mu\text{g mg}^{-1}$  DW) and PUFA ( $22.5 \pm 8.8 \mu\text{g mg}^{-1}$  DW) being recorded in specimens collected at the deeper habitat (Figure 7). MUFA was the only FA class with slightly higher mean values in the shallower habitat at 0–4 m ( $16.3 \pm 5.8 \mu\text{g mg}^{-1}$  DW), compared to the 8–12 m depth ( $15.1 \pm 8.5 \mu\text{g mg}^{-1}$  DW).

Finally, the PCA showed that a total of 78.3% of the variation of FA's concentrations was explained by the first two components (PC1 64.7%, PC2 13.6%) (Figure 8). However, almost all FAs contributed to the distribution of samples, as no grouping was observed. Figure 8 is a good representation of the ANOSIM analysis results mentioned previously, where differences were not statistically related to habitat depth.



**Figure 7.** Concentrations of fatty acid (FA) classes from samples of *Elysia crispata* collected at 0–4 m ( $n = 7$ ) and 8–12 m ( $n = 7$ ) depths, in the Southern Gulf of Mexico. The line represents the median, top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles. The whiskers represent the maximum and minimum values, and dots are outliers. SFA—Saturated fatty acids; MUFA—Monounsaturated fatty acids; PUFA—Polyunsaturated fatty acids.



**Figure 8.** Principal components analysis (PCA) of fatty acid (FA) concentrations from samples of *Elysia crispata* collected at different depths in the Southern Gulf of Mexico.

#### 4. Discussion

In the present study, we provided a characterization of pigments, FAs and lipid classes (PL and GL) from *E. crispata* sampled at different depths, which helps to fill a knowledge gap of one of the animal models most commonly employed to study kleptoplasty. To our knowledge, this is the first effort assessing differences in depth for a population of a sacoglossan sea slug, and the first work in the most western distribution recorded for this species. Concentrations of pigments were heterogeneous over different specimens of this sea slug and were not related to habitat depth.

A chloroplast photosynthetic pigment profile was previously described for specimens of *E. crispata* collected in Florida, where authors found matching profiles between *Caulerpa sertularioides* and sea slugs, with the exception of the presence of two subproducts in the sea slug: phaeophorbide *a* and phaeophytin *a* [54]. These pigments are chlorophyll breakdown intermediates [55] and were not found in our samples. Chlorophyll synthesis in sea slug tissues has been reported to occur in *E. chlorotica* [25], and *E. crispata* [26]; however, Trench and Smith [27] stated that this mechanism was unlikely to occur in *E. crispata* and *E. viridis*, as they only detected small traces of Chl *a* and *b* in both species [27]. These dissimilarities could be due to the macroalgal origin of kleptoplast or differences in technique employed to perform this assessment. Similarly, Trench et al. [34] did not find evidence of chlorophyll synthesis in *E. viridis* after 24 h of starvation [34]. Studies in other long-term retention species have reported Chl *a* values of 0.3 mg g<sup>-1</sup> DW after 2 weeks of starvation in *E. viridis* [29] and <0.4 mg g<sup>-1</sup> DW after 28 days of starvation in *E. timida* [56]; here, we found mean values of almost 0.6 mg g<sup>-1</sup> DW after 1 month of starvation in *E. crispata*. Thus, this higher amount of Chl *a*, together with the absence of Chl *a* breakdown products, support the apparent good condition of kleptoplasts within the cells of this sea slug species.

Photosynthetic pigment analysis of three species of *Elysia* has shown that their profile is almost identical to their food source, *E. viridis*-*C. tomentosum*, *E. timida*-*Acetabularia acetabulum* and *E. chlorotica*-*Vaucheria litorea*, except for an unidentified carotenoid in the first two *Elysia* species [11,21–24,29,48,57]. The photosynthetic pigment composition recorded in *E. crispata* in the present study not only reflects the different macroalgal origins of acquired kleptoplasts but, most importantly, it also shows that after a month of food deprivation, these sea slugs conserved the heterogeneity of their photosynthetic pigment profiles and the relatively high values of Chls *a* and *b*. Curtis et al. [13,17] working with *E. crispata* provided evidence of a simultaneous chloroplast sequestration of at least two macroalgal species (*P. capitatus* and *B. plumosa*) for several weeks [13,17], while Christa et al. [6] found that kleptoplasts originating from *H. incrassata* could be retained for up to 49 days. These last authors assessed *E. crispata*'s food sources through DNA barcoding and signaled the presence of several unidentified algae from order Bryopsidales retained for 7, 28, 35 and 49 days, as well as *Acicularia schenkii* (found in one starved slug for 7 days) and *A. acetabulum* (found in a non-starved individual) [6]. Only these last two species belong to the group of algae with a pigment profile that includes lutein, antheraxanthin, zeaxanthin, or ββ-Carotene [11], a profile matching those recorded in some specimens surveyed in the present study. Thus, the present work confirms that the long-term retention of kleptoplasts from this type of algae does occur in *E. crispata*.

Unlike photosynthetic pigments, whose origin in Sacoglossa sea slugs is exclusive from sequestered chloroplasts, the FA profiles recorded are biosynthesized by animal metabolism and/or have origin in their macroalgal diet (including the digested cytoplasmic content and the kleptoplasts retained). However, GL are exclusive lipids of chloroplast membranes [58]; thus, finding high concentration of GL in *E. crispata* after 1 month of starvation confirms the preservation of chloroplast membranes integrity inside sea slug cells. *Elysia crispata* shows a similar concentration of PL and GL (Figure 5); nevertheless, in *E. viridis* and *P. dendritica* the concentration of PL is higher than GL under starved or fed conditions [36]. This could be due to the larger size of *E. crispata*, when compared to *E. viridis* and *P. dendritica*, as well as the foliose shape of its parapodia, hence allowing *E.*



*crispata* to harbour a higher number of kleptoplasts in proportion to its body size. Analyses of lipids and FAs, as performed before for *E. chlorotica*, *E. viridis* and *E. timida*, could be important for estimating kleptoplast energetic contribution for the animal and their specific support in reproductive fitness [33,36,48,59]. To understand if something similar occurs in *E. crispata*, further studies using isotope labeling are still required [36].

We acknowledge that sample size may have contributed for no statistically significant differences having been recorded. Unfortunately, we were not able to collect more organisms due to logistic constraints in the field and the laboratory. Therefore, we suggest that a higher number of specimens should be sampled in future studies addressing *E. crispata*, as this species presents high intraspecific variability. The amount of PL recorded between specimens collected at different depths did not show significant statistical differences according to the *t*-test ( $p = 0.055$ ); such a marginal value should not be considered conclusive. PL are the main lipids in animal cell membranes and thus, are quite adaptive to specific environmental conditions. In the study area, several physical and chemical parameters can change in a few meters of the water column depending on the season [60,61]. Differences in PL could be present between habitats, but not detected because they occur in a gradient or in a distinct depth range. Then, differences in PL should not be completely discarded.

No other studies have addressed a characterization of FAs in *Elysia crispata*. FA composition is influenced by external (i.e., environmental) conditions and diet. Most FAs are esterified in different lipid classes, such as polar lipids and triglycerides, which play diverse roles (e.g., structural, signaling, energy reserves). Previous lipidomics studies in marine sacoglossan sea slugs and macroalgae have identified the molecular composition of different polar lipids, such as PL (e.g., phosphatidylcholine [PC], phosphatidylethanolamine [PE]) and GL (e.g., sulfoquinovosyl diacylglycerol [SQDG], monogalactosyl diacylglycerol [MGDG], digalactosyl diacylglycerol [DGDG]), providing information at molecular level on their structural and fatty acyl chains composition [35,36]. The high concentration of 16:0 in this group of sea slugs must be related with its structural role in membrane lipids, since this FA is usually esterified in GL and PL. For example, the most abundant SQDG molecular species recorded in *E. viridis* were SGDGDG (16:0/16:0), SQDGDG (18:3/16:0) and SQMG (16:0), characteristic lipids of chloroplast membranes [35]. Both 16:0 and 18:0 occur as FAs esterified in several PL molecular species of *E. viridis* such as PC 36:4, PC 38:4, PC 38:5, PE 38:2, PE 38:3, PE 38:4 and PE 38:5 [36]. In addition, the high content of PUFA is probably derived from dietary items. *Elysia crispata* had high amount of GL, and could have a similar composition with *E. viridis*, who presented MGDG and DGDG, with a high proportion of 16:3 and 18:3 [35].

FAs such as 20:5 *n*-3 (EPA), 22:6 *n*-3 (DHA) and 20:4 *n*-6 (ARA) are essential for marine organisms. Although recent studies have found that several marine groups possess desaturase genes that allow them to produce PUFA de novo [62], most marine invertebrates and fish cannot biosynthesize enough *n*-3 PUFA to cover their physiological demand. As such, most of these marine organisms rely on their diets as the main source to acquire these biomolecules [31,63]. Many marine mollusks have EPA and DHA accounting for half of their total FAs [32]. However, in our results, only 20:5 *n*-3 was found, and in low amounts (Figure 6). In 0–4 m samples, we identified the characteristic EPA fragmentation in the MS spectrum at its retention time (21.6 min in standard mix); in 8–12 m, the MS spectrum at the same retention time showed some fragment ions characteristic of EPA, however, the most abundant fragment ions correspond to an unknown compound. Hence, the abundance of this FA must be interpreted with caution in sea slugs sampled at the 8–12 m depth, because this FA might be overestimated due to the presence of another unknown compound with a similar retention time.

The lack of DHA in *E. crispata* samples may be related to the absence of this FA in its food sources. Although this is a common FA in marine organisms, it is absent in macroalgae recognized as common food sources of sacoglossan sea slugs, such as *C. tomentosum* [64], and *A. acetabulum* [59]. Moreover, the most abundant PUFA in *E. crispata* was 20:4 *n*-6. In other sea slugs without kleptoplasty, such as nudibranchs and cephalaspideans, high

amounts of ARA have also been recorded [65,66]. Therefore, these high amounts of ARA may be phylogenetically driven and part of the natural FA profile of sea slugs [66,67].

The amount of FA classes depends on gastropod species [31]. Some gastropod herbivores have higher amounts of PUFA, for instance, in *Littorina littorea* these FAs account for 52% of total lipids [32], and in *E. timida* represents 57% [59]. In this study, PUFA in *E. crispata* represents around 35% of the total pool of FAs, while in chromodorid nudibranchs, which feed on sponges, it accounts for 15–31% [65]. Low proportions of SFA (8–16%) can be found in chromodorid nudibranchs. In contrast, SFA in *Arminia* nudibranchs, which feed on cnidarians [66], *Patella peroni*, a gastropod herbivore [32], and *E. crispata* correspond to around 40% of total lipids. As diet influences FA composition, the FA profiles mentioned above, and its proportions are most likely explained by dietary items. Nudibranchs have FAs similar to their sponge preys [65], and *E. viridis* has a glycolipid profile very similar to its food source, *C. tomentosum*, due to the preservation of chloroplasts in their cells [35,36].

To date, 25 species of macroalgae have been reported as potential food sources for *E. crispata* (Supplementary Table S1). Some authors recommend considering only the 17 species confirmed by DNA molecular analysis [12]. Apparently, its preferred dietary items are those within genera *Bryopsis*, *Penicillus*, and *Halimeda*, while consumption of genus *Caulerpa* has triggered controversy [12,40,68], even when the photosynthetic pigment profiles of this macroalgae match those of this sea slug [54]. For a different project, our own preliminary observations in the laboratory suggest *E. crispata* from the same population of the present study does not consume *Udotea*, *Ulva*, *Rhipocephalus* and *Caulerpa*. The specimens of *E. crispata* sampled in the present study retained kleptoplasts from Siphonales (the group of algae recognized as its favorite diet), as evidenced by the presence of siphonoxanthin and siphonoxanthin-dodecenoate; nonetheless, *E. crispata* also showed kleptoplasts from another group of macroalgae displaying lutein as their main xanthophyll (e.g., *Acetabularia*). This last pigment was relatively higher in sea slugs from shallower waters. As higher light levels occur in shallower environments, this pigment may be involved in photoprotection [69].

Light availability can drastically change in the coral reef where *E. crispata* was studied. For example, light intensity in a nearby reef (Anegada de Adentro) at 10 m depth only represents about 15% of the light levels recorded at 1 m depth [70]. Moreover, in another close by reef (Sacrificios) during the same season (August–September) as that during which the collection of specimens for the present study was performed, light intensity at 19 m depth varied from 1000 to 9000 Lux [71], an equivalent of  $\sim 18.5$ – $166.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  [72]. This suggests that the amount of light recorded in shallow habitats in these coral reefs can be very high; however, our results did not support differences in the acclimation state of kleptoplasts of sea slugs sampled in such distinct habitats. As longer distances between sampling depths (>4 m) might have helped to detect some differences, this issue should be considered in future works.

Long-term retention of chloroplasts in sacoglossans depends on sea slug species and the macroalgae they feed upon [3,4,6]. The longest retention time of kleptoplasts in *E. crispata* has been reported as 120 days [18], and here, we confirm a good physiological and biochemical condition of chloroplasts after 30 days. Our results support that *E. crispata* digests its kleptoplasts slowly and that, during long starvation periods (one month) chloroplast diversity remains [17,18]; in general, the heterogeneity observed in pigments, lipids and FAs was not related to habitat depth. More basic research on this sacoglossan is required to understand kleptoplasty and explain evolutionary associations, such as endosymbiosis.

## 5. Conclusions

The heterogeneity recorded in the profile of photosynthetic pigments and FA composition of *E. crispata* was not related to the habitat depth at the coral reef where they were sampled in the Southern Gulf of Mexico. The total lipid, PL and GL contents found in this

work were similar for specimens collected at shallow (0–4 m) and deeper (8–12 m) habitats. The conserved heterogeneity of their photosynthetic pigment profiles, as well as the high content of molecules exclusive of chloroplasts recorded on *E. crispata*, such as Chl *a* and GL after a month of food deprivation confirms that these sea slugs retain chloroplasts in good condition for long periods of time after stealing them from macroalgae.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani11113157/s1>, Table S1: Algae consumed by *Elysia crispata* and its presence in the study area, according to literature [1,6,12–16,40,54,68,73–81].

**Author Contributions:** Conceptualization, X.G.V., S.C. and N.S.; methodology, X.G.V., F.R., P.C., S.C., M.R.D. and R.C.; software, X.G.V., F.R. and P.C.; validation, F.R., P.C. and S.C.; formal analysis, X.G.V., F.R. and P.C.; investigation, X.G.V., F.R. and P.C.; resources, M.R.D., R.C. and N.S.; data curation, X.G.V., F.R. and P.C.; writing—original draft preparation, X.G.V. and S.C.; writing—review and editing, X.G.V., F.R., P.C., S.C., M.R.D., R.C. and N.S.; visualization, X.G.V. and P.C.; supervision, F.R., P.C., S.C. and N.S.; project administration, M.R.D., R.C. and N.S.; funding acquisition, M.R.D., R.C. and N.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Field work, life support systems and travel were funded by the Harte Charitable Foundation through the Harte Research Institute, Texas A&M at Corpus Christi and CONABIO-NE018 to NS. The authors acknowledge the University of Aveiro, FCT, and Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) for the financial support for CESAM [UIDB/50017/2020+UIDP/50017/2020] and LAQV-REQUIMTE (FCT UIDB/50006/2020) through national funds and, where applicable, co-financed by FEDER, within the Portugal 2020 Partnership Agreement and Compete 2020, and to the Portuguese Mass Spectrometry Network (RNEM, LISBOA-01-0145-FEDER-402-022125).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to all applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals.

**Data Availability Statement:** Data supporting reported results can be found at <https://doi.org/10.5281/zenodo.5398824>.

**Acknowledgments:** X.G.V. was given a PhD scholarship from CONACyT (CVU: 564148), this publication is one of the requirements of the Doctoral Program of Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. F.R., P.C. and S.C. thank Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) for their contracts [CEECIND/00580/2017 to F.R., CEECIND/01434/2018 to P.C., and 2020.03278.CEECIND to S.C.]. D. Ugalde, L. Palomino, and D. Ortigosa helped in the collection of specimens. Dorado Buceo provided diving services during field work. G. Martínez, C. Caamal, A. Márquez and K. Escalante from UMDI-F.Ciencias, UNAM, provided technical support. We thank E. Guerra and M. Mascaró for their comments on statistical analyses. This is a BDMY publication and a contribution of Marine Lipidomic laboratory. Sampling was performed with collecting permit issued by SAGARPA: PPF/DGOPA-082/19.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Händeler, K.; Grzybowski, Y.P.; Krug, P.J.; Wägele, H. Functional chloroplasts in metazoan cells—A unique evolutionary strategy in animal life. *Front. Zool.* **2009**, *6*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Van Steenkiste, N.W.L.; Stephenson, I.; Herranz, M.; Husnik, E.; Keeling, P.J.; Leander, B.S. A new case of kleptoplasty in animals: Marine flatworms steal functional plastids from diatoms. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, 1–9. [[CrossRef](#)]
- Baumgartner, F.A.; Pavia, H.; Toth, G.B. Individual specialization to non-optimal hosts in a polyphagous marine invertebrate herbivore. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
- de Vries, J.; Rauch, C.; Christa, G.; Gould, S.B. A sea slug's guide to plastid symbiosis. *Acta Soc. Bot. Pol.* **2014**, *83*, 415–421. [[CrossRef](#)]
- Rauch, C.; Tielens, A.G.M.; Serôdio, J.; Gould, S.B.; Christa, G. The ability to incorporate functional plastids by the sea slug *Elysia viridis* is governed by its food source. *Mar. Biol.* **2018**, *165*, 1–13. [[CrossRef](#)]
- Christa, G.; Händeler, K.; Kück, P.; Vleugels, M.; Franken, J.; Karmeinski, D.; Wägele, H. Phylogenetic evidence for multiple independent origins of functional kleptoplasty in Sacoglossa (Heterobranchia, Gastropoda). *Org. Divers. Evol.* **2015**, *15*, 23–36. [[CrossRef](#)]
- Vieira, S.; Calado, R.; Coelho, H.; Serôdio, J. Effects of light exposure on the retention of kleptoplastic photosynthetic activity in the sacoglossan mollusc *Elysia viridis*. *Mar. Biol.* **2009**, *156*, 1007–1020. [[CrossRef](#)]

8. Laetz, E.M.J.; Wägele, H. How does temperature affect functional kleptoplasty? Comparing populations of the solar-powered sister-species *Elysia timida* Risso, 1818 and *Elysia cornigera* Nuttall, 1989 (Gastropoda: Sacoglossa). *Front. Zool.* **2018**, *15*, 1–13. [[CrossRef](#)]
9. Dionísio, G.; Faleiro, F.; Bispo, R.; Lopes, A.R.; Cruz, S.; Paula, J.R.; Repolho, T.; Calado, R.; Rosa, R. Distinct bleaching resilience of photosynthetic plastid-bearing mollusks under thermal stress and high CO<sub>2</sub> conditions. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1–11. [[CrossRef](#)]
10. Green, B.J.; Li, W.-Y.; Manhart, J.R.; Fox, T.C.; Summer, E.J.; Kennedy, R.A.; Pierce, S.K.; Rumpho, M.E. Mollusc-algal chloroplast endosymbiosis. Photosynthesis, thylakoid protein maintenance, and chloroplast gene expression continue for many months in the absence of the algal nucleus. *Plant Physiol.* **2000**, *124*, 331–342. [[CrossRef](#)]
11. Costa, J.; Giménez-Casaldueiro, F.; Melo, R.; Jesus, B. Colour morphotypes of *Elysia timida* (Sacoglossa, Gastropoda) are determined by light acclimation in food algae. *Aquat. Biol.* **2012**, *17*, 81–89. [[CrossRef](#)]
12. Middlebrooks, M.L.; Curtis, N.E.; Pierce, S.K. Algal sources of sequestered chloroplasts in the sacoglossan sea slug *Elysia crispata* vary by location and ecotype. *Biol. Bull.* **2019**, *236*, 88–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Curtis, N.E.; Massey, S.E.; Pierce, S.K. The symbiotic chloroplasts in the sacoglossan *Elysia clarki* are from several algal species. *Invertebr. Biol.* **2006**, *125*, 336–345. [[CrossRef](#)]
14. Clark, K.B.; Busacca, M. Feeding specificity and chloroplast retention in four tropical Ascoglossa, with a discussion of the extent of chloroplast symbiosis and the evolution of the order. *J. Molluscan Stud.* **1978**, *44*, 272–282. [[CrossRef](#)]
15. Jensen, K.R. A review of sacoglossan diets with comparative notes on radular and buccal anatomy. *Malacol. Rev.* **1980**, *13*, 55–77.
16. Middlebrooks, M.L.; Pierce, S.K.; Bell, S.S. Foraging behavior under starvation conditions is altered via photosynthesis by the marine gastropod, *Elysia clarki*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Curtis, N.E.; Middlebrooks, M.L.; Schwartz, J.A.; Pierce, S.K. Kleptoplastic sacoglossan species have very different capacities for plastid maintenance despite utilizing the same algal donors. *Symbiosis* **2015**, *65*, 23–31. [[CrossRef](#)]
18. Curtis, N.E.; Schwartz, J.A.; Pierce, S.K. Ultrastructure of sequestered chloroplasts in sacoglossan gastropods with differing abilities for plastid uptake and maintenance. *Invertebr. Biol.* **2010**, *129*, 297–308. [[CrossRef](#)]
19. Terashima, I.; Fujita, T.; Inoue, T.; Chow, W.S.; Oguchi, R. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiol.* **2009**, *50*, 684–697. [[CrossRef](#)]
20. Wilhelm, C.; Jungandreas, A.; Jakob, T.; Goss, R. Light acclimation in diatoms: From phenomenology to mechanisms. *Mar. Genom.* **2014**, *16*, 5–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Cruz, S.; Cartaxana, P.; Newcomer, R.; Dionísio, G.; Calado, R.; Seródio, J.; Pelletreau, K.N.; Rumpho, M.E. Photoprotection in sequestered plastids of sea slugs and respective algal sources. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cartaxana, P.; Morelli, L.; Quintaneiro, C.; Calado, G.; Calado, R.; Cruz, S. Kleptoplasts photoacclimation state modulates the photobehaviour of the solar-powered sea slug *Elysia viridis*. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*. [[CrossRef](#)]
23. Cartaxana, P.; Morelli, L.; Jesus, B.; Calado, G.; Calado, R.; Cruz, S. The photon menace: Kleptoplast protection in the photosynthetic sea slug *Elysia timida*. *J. Exp. Biol.* **2019**, *222*, 3–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Jesus, B.; Ventura, P.; Calado, G. Behaviour and a functional xanthophyll cycle enhance photo-regulation mechanisms in the solar-powered sea slug *Elysia timida* (Risso, 1818). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2010**, *395*, 98–105. [[CrossRef](#)]
25. Pierce, S.K.; Curtis, N.E.; Schwartz, J.A. Chlorophyll a synthesis by an animal using transferred algal nucleargenes. *Symbiosis* **2009**, *49*, 121–131. [[CrossRef](#)]
26. Middlebrooks, M.L.; Bell, S.S.; Pierce, S.K. The kleptoplastic sea slug *Elysia clarki* prolongs photosynthesis by synthesizing chlorophyll a and b. *Symbiosis* **2012**, *57*, 127–132. [[CrossRef](#)]
27. Trench, R.K.; Smith, D.C. Synthesis of pigment in symbiotic chloroplasts. *Nature* **1970**, *227*, 196–197. [[CrossRef](#)]
28. Ventura, P.; Calado, G.; Jesus, B. Photosynthetic efficiency and kleptoplast pigment diversity in the sea slug *Thuridilla hopei* (Vérany, 1853). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2013**, *441*, 105–109. [[CrossRef](#)]
29. Cruz, S.; Calado, R.; Seródio, J.; Jesus, B.; Cartaxana, P. Pigment profile in the photosynthetic sea slug *Elysia viridis* (Montagu, 1804). *J. Molluscan Stud.* **2014**, *80*, 475–481. [[CrossRef](#)]
30. Parrish, C.C. Lipids in Marine Ecosystems. *ISRN Oceanogr.* **2013**, *2013*, 1–16. [[CrossRef](#)]
31. Voogt, P.A. Lipids: Their Distribution and Metabolism. In *The Mollusca. Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics*; Hochachka, P.W., Ed.; Academic Press, Inc.: New York, NY, USA, 1983; Volume 1, pp. 329–370. ISBN 0127514015.
32. Joseph, J.D. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Prog. Lipid Res.* **1982**, *21*, 109–153. [[CrossRef](#)]
33. Pelletreau, K.N.; Weber, A.P.M.; Weber, K.L.; Rumpho, M.E. Lipid accumulation during the establishment of kleptoplasty in *Elysia chlorotica*. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Trench, R.K.; Boyle, J.E.; Smith, D.C. The association between chloroplasts of *Codium fragile* and the mollusc *Elysia viridis*. II. Chloroplast ultrastructure and photosynthetic carbon fixation in *E. viridis*. *Proc. R. Soc. Lond.-Biol. Sci.* **1973**, *184*, 63–81. [[CrossRef](#)]
35. Rey, F.; Da Costa, E.; Campos, A.M.; Cartaxana, P.; Maclel, E.; Domingues, P.; Domingues, M.R.M.; Calado, R.; Cruz, S. Kleptoplasty does not promote major shifts in the lipidome of macroalgal chloroplasts sequestered by the sacoglossan sea slug *Elysia viridis*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–10. [[CrossRef](#)]
36. Rey, F.; Melo, T.; Cartaxana, P.; Calado, R.; Domingues, P.; Cruz, S.; Domingues, M.R.M. Coping with starvation: Contrasting lipidomic dynamics in the cells of two sacoglossan sea slugs incorporating stolen plastids from the same macroalga. *Integr. Comp. Biol.* **2020**, *60*, 43–56. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Clark, K.B. Ascoglossan (=Sacoglossa) molluscs in the Florida Keys: Rare marine invertebrates at special risk. *Bull. Mar. Sci.* **1994**, *54*, 900–916.
38. Camacho-García, Y.E.; Pola, M.; Carmona, L.; Padula, V.; Villani, G.; Cervera, J.L. Diversity and distribution of the heterobranch sea slug fauna on the Caribbean of Costa Rica. *Cah. Biol. Mar.* **2014**, *55*, 109–127.
39. Lalli, C.M.; Parsons, T.R. *Biological Oceanography, An Introduction*, 2nd ed.; The Open University: Burlington, MA, USA, 1997.
40. Krug, P.J.; Vendetti, J.E.; Valdés, Á. Molecular and morphological systematics of *Elysia* Risso, 1818 (Heterobranchia: Sacoglossa) from the Caribbean region. *Zootaxa* **2016**, *4148*, 1–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mendes, C.R.; Cartaxana, P.; Brotas, V. HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: Comparing resolution and sensitivity of a C18 and a C8 method. *Limnol. Oceanogr. Methods* **2007**, *5*, 363–370. [[CrossRef](#)]
42. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [[CrossRef](#)]
43. Leray, C. CyberLipid. Available online: <http://cyberlipid.gerli.com/techniques-of-analysis/analysis-of-complex-lipids/glycoglycerolipid-analysis/quantitative-estimation/> (accessed on 13 May 2021).
44. Bell, B.M.; Daniels, D.G.H.; Fearn, T.; Stewart, B.A. Lipid compositions, baking qualities and other characteristics of wheat varieties grown in the U.K. *J. Cereal Sci.* **1987**, *5*, 277–286. [[CrossRef](#)]
45. Bartlett, E.M.; Lewis, D.H. Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate. *Anal. Biochem.* **1970**, *36*, 159–167. [[CrossRef](#)]
46. Aued-Pimentel, S.; Lago, J.H.G.; Chaves, M.H.; Kumagai, E.E. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropanoids fatty acids from *Sterculia striata* St. Hil. Et Nauds seed oil. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 235–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Christie, W.W. The Lipid Web. Available online: [www.lipidmaps.org/resources/lipidweb](http://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb) (accessed on 4 December 2019).
48. Cartaxana, P.; Rey, F.; Ribeiro, M.; Moreira, A.S.P.; Rosário, M.; Domingues, M.; Calado, R.; Cruz, S. Nutritional state determines reproductive investment in the mixotrophic sea slug *Elysia viridis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2019**, *611*, 167–177. [[CrossRef](#)]
49. Zuur, A.F.; Ieno, E.N.; Elphick, C.S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol. Evol.* **2010**, *1*, 3–14. [[CrossRef](#)]
50. Zar, J.H. *Biostatistical Analysis*, 5th ed.; Prentice-Hall/Pearson: Upper Saddle River, NJ, USA, 2009; ISBN 0131008463.
51. Clarke, K.R.; Gorley, R.; Somerfield, P.; Warwick, R. *Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation*, 3rd ed.; PRIMER-E: Plymouth, UK; Ivybridge, UK, 2014; ISBN 8003098955.
52. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing 2021*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2021.
53. Clarke, K.R.; Gorley, R.N. *Software PRIMER v7*; PRIMER-E Ltd.: Devon, UK, 2015.
54. Roller, R.A.; Bianchi, T.S. HPLC analysis of chloroplast pigments from the marine ascoglossan *Tridachia crispata* (Mörch, 1863) (Mollusca: Opisthobranchia). *Am. Malacol. Bull.* **1995**, *11*, 139–143.
55. Schelbert, S.; Aubry, S.; Burla, B.; Agne, B.; Kessler, F.; Krupinska, K.; Hörtensteiner, S. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2009**, *21*, 767–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Giménez-Casaldueiro, F.; Muniain, C. The role of kleptoplasts in the survival rates of *Elysia timida* (Risso, 1818) (Sacoglossa: Opisthobranchia) during periods of food shortage. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **2008**, *357*, 181–187. [[CrossRef](#)]
57. Evertsen, J.; Johnsen, G. In vivo and in vitro differences in chloroplast functionality in the two north Atlantic sacoglossans (Gastropoda, Opisthobranchia) *Placida dendritica* and *Elysia viridis*. *Mar. Biol.* **2009**, *156*, 847–859. [[CrossRef](#)]
58. Murata, N.; Siegenthaler, P.-A. Lipids in photosynthesis: An overview. In *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics*; Siegenthaler, P.-A., Murata, N., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1998; pp. 1–20.
59. Cartaxana, P.; Rey, F.; LeKieffre, C.; Lopes, D.; Hubas, C.; Spangenberg, J.E.; Escrig, S.; Jesus, B.; Calado, G.; Domingues, M.R.M.; et al. Photosynthesis from stolen chloroplasts can support sea slug reproductive fitness. *Proc. R. Soc. B* **2021**, *288*. [[CrossRef](#)]
60. Salas-Perez, J.J.; Granados-Barba, A. Oceanographic characterization of the Veracruz reefs system. *Atmosfera* **2008**, *21*, 281–301.
61. Mateos-Jasso, A.; Zavala-Hidalgo, J.; Romero-Centeno, R.; Allende-Arandia, M.E. Variability of the thermohaline structure in the northern Veracruz Coral Reef System, Mexico. *Cont. Shelf Res.* **2012**, *50–51*, 30–40. [[CrossRef](#)]
62. Monroig, Ó.; Kabeya, N. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: A comprehensive review. *Fish. Sci.* **2018**, *84*, 911–928. [[CrossRef](#)]
63. Parrish, C.C. Essential fatty acids in aquatic food webs. In *Lipids in Aquatic Ecosystems*; Kainz, M., Brett, M.T., Arts, M.T., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 309–326. ISBN 978-0-387-89366-2.
64. Rey, F.; Cartaxana, P.; Melo, T.; Calado, R.; Pereira, R.; Abreu, H.; Domingues, P.; Cruz, S.; Domingues, R.M. Domesticated populations of *Codium tomentosum* display lipid extracts with lower seasonal shifts than conspecifics from the wild-relevance for biotechnological applications of this green seaweed. *Mar. Drugs* **2020**, *18*, 188. [[CrossRef](#)]
65. Zhukova, N.V. Lipids and fatty acids of nudibranch mollusks: Potential sources of bioactive compounds. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4578–4592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Gomes, N.G.M.; Fernandes, F.; Madureira-Carvalho, Á.; Valentão, P.; Lobo-da-Cunha, A.; Calado, G.; Andrade, P.B. Profiling of Heterobranchia sea slugs from portuguese coastal waters as producers of anti-cancer and anti-inflammatory agents. *Molecules* **2018**, *23*, 1027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Zhukova, N.V. Lipid classes and fatty acid composition of the tropical nudibranch mollusks *Chromodoris* sp. and *Phyllidia coelestis*. *Lipids* **2007**, *42*, 1169–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Middlebrooks, M.L.; Bell, S.S.; Curtis, N.E.; Pierce, S.K. Atypical plant-herbivore association of algal food and a kleptoplastic sea slug (*Elysia clarki*) revealed by DNA barcoding and field surveys. *Mar. Biol.* **2014**, *161*, 1429–1440. [[CrossRef](#)]
69. Jahns, P.; Holzwarth, A.R. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenerg.* **2012**, *1817*, 182–193. [[CrossRef](#)]
70. Medel-Alvarado, T. Estructura de la comunidad de corales y peces en profundidades someras y mesofóticas en el suroeste del golfo de México. Master's Thesis, Universidad Veracruzana, Boca del Río, México, 2019.
71. Liaño-Carrera, F.; Camarena-Luhns, T.; Gómez-Barrera, A.; Martos-Fernández, F.J.; Ramírez-Macias, J.I.; Salas-Monreal, D. New coral reef structures in a tropical coral reef system. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **2019**, *47*, 270–281. [[CrossRef](#)]
72. Thimijan, R.W.; Heins, R.D. Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: A review of procedures for interconversion. *HortScience* **1983**, *18*, 818–822. [[CrossRef](#)]
73. Galicia-García, C.; Morales-García, A. Investigaciones sobre macroalgas realizadas en el Sistema Arrecifal Veracruzano. In *Investigaciones Científicas en el Sistema Arrecifal Veracruzano*; Universidad Autónoma de Campeche: Campeche, México, 2007; pp. 141–160.
74. Curtis, N.E.; Pierce, S.K.; Massey, S.E.; Schwartz, J.A.; Mangel, T.K. Newly metamorphosed *Elysia clarki* juveniles feed on and sequester chloroplasts from algal species different from those utilized by adult slugs. *Mar. Biol.* **2007**, *150*, 797–806. [[CrossRef](#)]
75. Pierce, S.K.; Curtis, N.E.; Massey, S.E.; Bass, A.L.; Karl, S.A.; Finney, C.M. A morphological and molecular comparison between *Elysia crispata* and a new species of kleptoplastic sacoglossan sea slug (Gastropoda: Opisthobranchia) from the Florida Keys, USA. *Molluscan Res.* **2006**, *26*, 23–38.
76. Thompson, T.E.; Jarman, G.M. Nutrition of *Tridachia crispata* (Mörch) (Sacoglossa). *J. Molluscan Stud.* **1989**, *55*, 239–244. [[CrossRef](#)]
77. Trench, R.K.; Trench, M.E.; Muscatine, L. Symbiotic chloroplasts; their photosynthetic products and contribution to mucus synthesis in two marine slugs. *Biol. Bull.* **1972**, *142*, 335–349. [[CrossRef](#)]
78. Jensen, K.; Clark, K.B. Annotated checklist of Florida Ascoglossan Opisthobranchia. *Nautilus (Philadelphia)* **1983**, *97*, 1–13.
79. Trench, R.K. Chloroplasts: Presumptive and de facto organelles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1981**, *361*, 341–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Pierce, S.K.; Massey, S.E.; Hanten, J.J.; Curtis, N.E. Horizontal transfer of functional nuclear genes between multicellular organisms. *Biol. Bull.* **2003**, *204*, 237–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Tufiño-Velázquez, R.C.; Pedroche, F.F. Las especies del género *Bryopsis* (Chlorophyta) presentes en la costa del Atlántico mexicano. *Rev. Mex. Biodivers.* **2019**, *90*, 1–12.

## Artículo II. Animales fotosintéticos y dónde encontrarlos: Abundancia y talla de una babosa marina solar en diferentes condiciones de luz

### Marine Biology

#### Photosynthetic animals and where to find them: Abundance and size of a solar-powered sea slug in different light conditions --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	MABI-D-23-00091R1	
<b>Full Title:</b>	Photosynthetic animals and where to find them: Abundance and size of a solar-powered sea slug in different light conditions	
<b>Article Type:</b>	Original paper	
<b>Keywords:</b>	Kleptoplasty; Photosymbiosis; Elysia crispata; Mollusca; Gulf of Mexico; coral reefs	
<b>Corresponding Author:</b>	Maite Mascaró, Ph.D. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias MEXICO	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias: Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	Xochitl Guadalupe Vital	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	Xochitl Guadalupe Vital Nuno Simões Sónia Cruz Maite Mascaró	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Funding Information:</b>	Harte Research Institute	Dr. Nuno Simões
	Harte Charitable Foundation	Dr. Nuno Simões
	Texas A and M University-Corpus Christi	Dr. Nuno Simões
<b>Abstract:</b>	<p>Three populations of the solar-powered sea slug <i>Elysia crispata</i> on reefs from the southern Gulf of Mexico and the Caribbean were analyzed. The aim was to describe and compare the changes in abundance and size of this species in different localities, as a function of depth and time of day. We hypothesized that differences in abundance would be related to locality, time of the day and depth, and differences in size would be related to locality and time of the day. Using snorkeling and SCUBA diving, all individuals within quadrats were counted and measured. A total of 680 organisms were recorded at Verde, Arcas and Puerto Morelos (PM) reefs at five times of the day (sunrise, morning, zenith, evening, night) and depths of 0-13 m. Zero Inflated Negative Binomial (ZINB) regressions adjusted to abundance data showed that <i>E. crispata</i> in Arcas and Verde reefs is expected to be more abundant (&gt; 50) in shallow depths (&lt; 2 m) at any time of the day except sunrise, whereas a low abundance (<math>\leq 1</math> organism) is predicted in PM regardless of depth and time of day. According to linear models, size was not related to depth, but was related to locality and time-of-day, with sea slugs from Arcas and Verde having similar size, and both larger than those in PM. This information suggests that this sea slug is capable of moving within the reefs and helps to understand the unique biological phenomena of kleptoplasty.</p>	

## Title page

Xochitl G. Vital<sup>1,2</sup>, Nuno Simões<sup>2,3,4</sup>, Sónia Cruz<sup>5</sup> and Maite Mascaró<sup>\*2</sup>

Photosynthetic animals and where to find them: Abundance and size of a solar-powered sea slug in different light conditions

1. Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México

2. UMDI-Sisal, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto de Abrigo S/N, Sisal, Yucatan, Mexico

3. International Chair for Coastal and Marine Studies, Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies, Texas A and M University–Corpus Christi, Texas, USA

4. Laboratorio Nacional de Resiliencia Costera, Laboratorios Nacionales, CONACYT, México

5. Laboratory for Innovation and Sustainability of Marine Biological Resources (ECOMARE), Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), Department of Biology, University of Aveiro, Campus Universitário de Santiago, Aveiro 3810-193, Portugal.

\*Corresponding author: [mmm@ciencias.unam.mx](mailto:mmm@ciencias.unam.mx)

ORCID ID: Xochitl G. Vital (0000-0002-8748-8154), Nuno Simões (0000-0001-7490-3147), Sónia Cruz (0000-0003-4775-8161) and Maite Mascaró (0000-0003-3614-4383).

## Abstract

Three populations of the solar-powered sea slug *Elysia crispata* on reefs from the southern Gulf of Mexico and the Caribbean were analyzed. The aim was to describe and compare the changes in abundance and size of this species in different localities, as a function of depth and time of day. We hypothesized that differences in abundance would be related to locality, time of the day and depth, and differences in size would be related to locality and time of the day. Using snorkeling and SCUBA diving, all individuals within quadrats were counted and measured. A total of 680 organisms were recorded at Verde, Arcas and Puerto Morelos (PM) reefs at five times of the day (sunrise, morning, zenith, evening, night) and depths of 0-13 m. Zero Inflated Negative Binomial (ZINB) regressions adjusted to abundance data showed that *E. crispata* in Arcas and Verde reefs is expected to be more abundant ( $> 50$ ) in shallow depths ( $< 2$  m) at any time of the day except sunrise, whereas a low abundance ( $\leq 1$  organism) is predicted in PM regardless of depth and time of day. According to linear models, size was not related to depth, but was related to locality and time-of-day, with sea slugs from Arcas and Verde having similar size, and both larger than those in PM. This information suggests



that this sea slug is capable of moving within the reefs and helps to understand the unique biological phenomena of kleptoplasty.

**Keywords:** Kleptoplasty, photosymbiosis, *Elysia crispata*, Mollusca, Gulf of Mexico, Caribbean, coral reefs

**Compliance with Ethical Standards:** Authors declare that they have no conflict of interest.

**Acknowledgements:** First author (Xochitl G. Vital) was given a PhD scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU: 564148), this publication is one of the requirements of the Doctoral Program of Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. We are very thankful to Diana Ugalde, Lilian Palomino-Álvarez and Deneb Ortigosa who helped during field trips and data collection, and to Alberto Hernández and Gemma L. Martínez-Moreno from UMDI-F. Ciencias, UNAM who provided technical support. We acknowledge the help and enriching comments from the entire team of Biodiversidad Marina de Yucatán (BDMY). We thank Dorado Buceo, especially Manuel Victoria and Manuel Andrade (¡Muchas gracias Capi!), for helping and providing diving services in Veracruz and Puerto Morelos. We acknowledge Secretaría de Marina Armada de México for their support in transportation to Cayo Arcas. Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano and Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos are acknowledged for allowing the entrance to the parks. Antar Pérez-Botello assisted in data visualization. We thank the reviewers for their comments to improve the manuscript. This study was partially funded by the Harte Research Institute, the Harte Charitable Foundation and Texas A&M University. Sónia Cruz acknowledges funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement no. 949880), and from Fundação para a Ciência e a Tecnologia, grants no. UIDB/50017/2020+UIDP/50017/2020 (CESAM) and 2020.03278 (CEECIND). This is a BDMY publication.

Text

## Introduction

Light conditions in the ocean depend on the amount of radiation reaching different areas, due to variations in the sun's angle throughout the day, as well as depth, turbidity and other parameters (Kirk 2011). Light is a resource for autotroph organisms because it represents the source of energy to maintain metabolic functions, but it also represents a limiting condition. In mobile animals with photosynthetic capacity, it can determine physiological and behavioral aspects, such as activity peaks (circadian rhythms) or be the cue to initiate certain displays, such as food searching or predator avoidance (Begon et al. 2006). Light changes, thus, define the occurrence and distribution of all photosynthetic organisms (Lalli and Parsons 1997), and animals with photosymbioses are no exception (Melo Clavijo et al. 2018).

Sacoglossan sea slugs (Mollusca: Gastropoda) are the only metazoan group that can retain and keep functional for months the chloroplasts from the algae they feed on (Händeler et al. 2009). As these mollusks can benefit from the maintenance of the foreign organelles through the obtention of energetic products from their photosynthesis (Laetz et al. 2017; Cruz et al. 2020; Cartaxana et al. 2021), they have been named “solar-powered” sea slugs (Rumpho et al. 2000). The retention time of this process (also known as kleptoplasty) depends on the slug species, the algal source of the chloroplasts (kleptoplasts) and the light conditions (Cruz et al. 2013; de Vries et al. 2014). Light intensities mediate the photosynthesis within the animal cells, thereby affecting its fitness as well as kleptoplast survival (Vieira et al. 2009; Cruz et al. 2015). For instance, moderate irradiance in the habitat of *Plakobranthus ianthobaptus* can increase its fitness through kleptoplast survival (Donohoo et al. 2020), while high light intensities can decrease photosynthetic performance in *Elysia timida* and *Elysia viridis* (Vieira et al. 2009; Cruz et al. 2015; Cartaxana et al. 2018, 2019).

*Elysia crispata* is the most conspicuous solar-powered sea slug in the Gulf of Mexico and the Caribbean. Because of its large size (can reach 150 mm in length), it can be easier to find than other slugs. It is common on a broad variety of substrata all year long (e.g. dead coral, sea grass, algae and under rocks), inhabiting borrow pits and mangrove lagoons, as well as coral reefs throughout the Caribbean at up to 25 m depth (Sanvicente-Añorve et al. 2012; Camacho-García et al. 2014; Krug et al. 2016). Clark (1994) suggested the existence of two subspecies of *E. crispata*, one inhabiting mangrove areas and another living in coral reefs, and Pierce et al. (2006) later proposed a new species named *Elysia clarki* for the mangrove slugs. Krug et al. (2016) recently analyzed the populations and confirmed that *E. crispata* was a single species. Nonetheless, the latter study recognized two ecotypes coinciding with the proposed separation by Clark (1994): *clarki* animals of a more consistently green coloration, that inhabit shallow, low energy waters, with less light incidence; and *crispata* animals of more variable body coloration that are present in deeper, high energy waters with more light (Pierce et al. 2006; Krug et al. 2016). This species can keep functional kleptoplasts for up to four months, hence it is considered a long-term retention species (Curtis et al. 2010). These characteristics make *E. crispata* an ideal model to study the ecology of photosynthetic animals.

Field studies regarding sacoglossan sea slugs are difficult to perform, as they are small sized animals, cryptic in the substrate (host algae) they are usually associated to and a high effort is required to obtain data, challenging the studies of their populations (Clark 1994; Jensen 1994). Despite these adversities, some species, have been studied *in situ*. For instance, Baumgartner and Toth (2014) found that size and abundance of *E. viridis* vary amongst seasons and depend on the host algae: larger but fewer individuals were found on *Cladophora rupestris* in autumn, whereas smaller ones were more abundant on *Cladophora sericea* in summer. These authors hypothesized that predation might explain the differences in abundance and size of *E. viridis* between algal hosts and time of year.

Research on *E. crispata* has focused on describing biochemical and biomolecular components (Gavagnin et al. 1996, 1997; Middlebrooks et al. 2012; Vital et al. 2021), photosynthetic activity (Curtis et al. 2006; Christa et al. 2015), physiology related to kleptoplasty (Curtis et al. 2006, 2007, 2010; Middlebrooks et al. 2019) and even microbiota (Mahadevan and Middlebrooks 2020). In general, this species has been found to have a long-term retention of chloroplasts from different algae, with a good physiological condition after months of starvation. Population studies of *E. crispata* have only been conducted in Florida in mangrove swamps and pits, and most of them focused on the *clarki* ecotype (Clark 1994; Middlebrooks et al. 2014, 2020). Equivalent studies of this species in coral reefs in their western distribution are still lacking and would provide relevant information of this interesting biological model.

Light conditions influence the transfer of carbon and nitrogen from kleptoplasts to sea slugs (Cruz et al. 2020, Cartaxana et al. 2021). Whilst ecological research efforts have mainly focused on the relation between light and *Elysia*'s physiology and behavior (Schmitt and Wägele 2011; Miyamoto et al. 2015; Cartaxana et al. 2018), studies on its natural distribution are scarce. There is evidence that kleptoplast photosynthesis minimizes weight loss and size reduction, and increases survival in *E. viridis*, *E. timida* and *E. chlorotica* under starving conditions (Giménez-Casalduero and Muniain 2008; Pelletreau et al. 2014; Cartaxana et al. 2017). In addition, the growth rate of *E. viridis* relative to the rate in which it consumes algae (i.e. efficient growth) has been correlated with exposure to regular light and increased photosynthesis (Baumgartner et al. 2015). Thus, it is reasonable to expect that light conditions influence the abundance and size of *E. crispata* by limiting its access to photosynthetic resources.

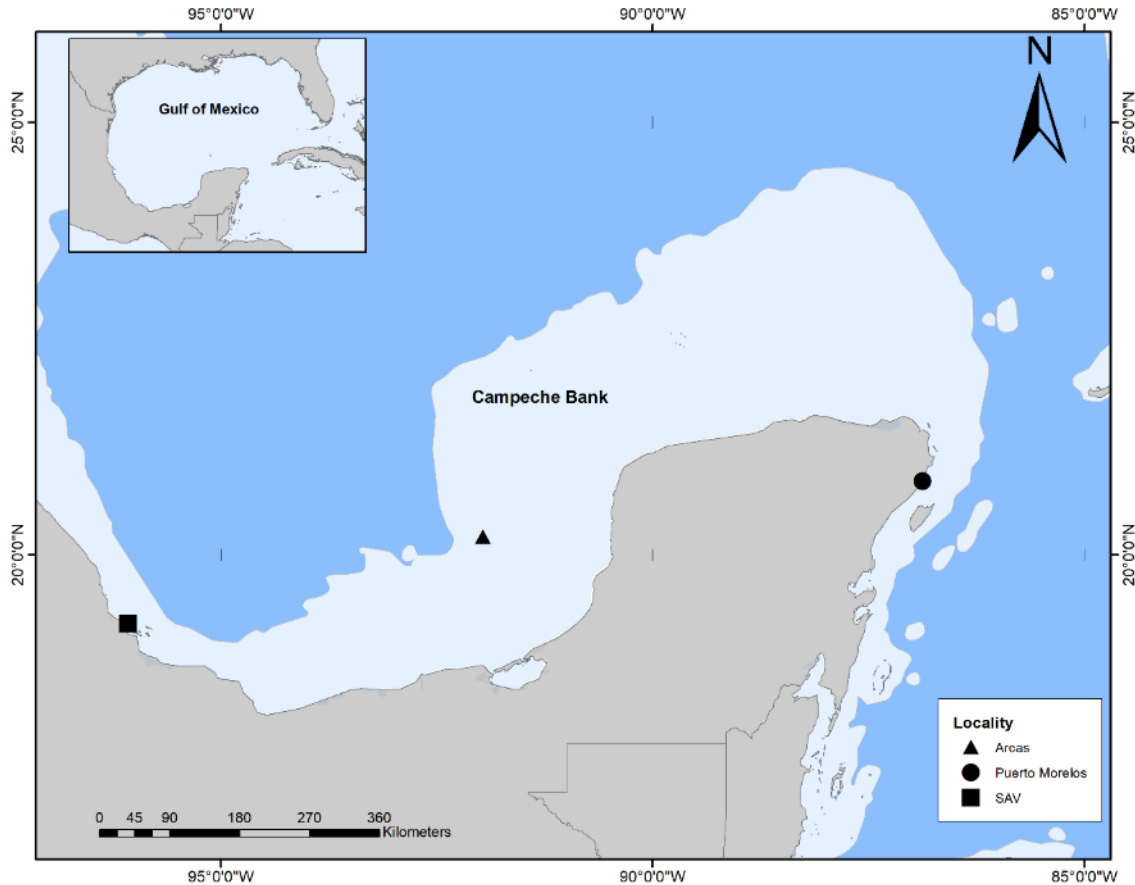
Solar-powered sea slugs will thrive in habitats where optimum light conditions are met. Light conditions vary both between localities and with depth due to the vertical attenuation of light caused by absorption, scattering and diffraction (Kirk 2011), and other factors related to it (e.g. turbidity). In addition, individuals at any site will experience variations in the quality and quantity of light throughout a 24-hour period. Circadian rhythms in sea slugs have been documented to be present in swimming and crawling behaviors (*Melibe leonina*, Newcomb et al. 2014) and the opening and closing of the parapodia (*E. timida*, Monselise and Rahat 1980). However, the need of light by photosynthetic sacoglossans makes them vulnerable to photodamage and predation, especially at higher light intensities, where the probability of location by visual predators is increased (Weaver and Clark 1981). If sea slugs can move within a small spatial scale between places with

varying light quality (e. g. from the top of a dead coral to a crevice nearby), then individuals of different size would occur in different numbers throughout the day. Information on changes in size and abundance of *E. crispata* throughout a 24-hour period will help understand the patterns and time scales of sea slug activity and mobility within the reef. Therefore, the aim of the present study was to describe and compare changes in size and abundance of three populations of *E. crispata* in Southern Gulf of Mexico and the Mexican Caribbean, as a function of time of the day and depth. We hypothesized that differences in abundance would be related to locality, time of the day and depth, and differences in size would be related to locality and time of the day.

## Materials and methods

### *Study area*

Field studies in three coral reefs of the Gulf of Mexico and Caribbean were conducted: Verde (19°12'09''N, 96°03'58''W) in August 2018 and June 2019, Cayo Arcas (20°13'12''N, 91°58'22''W) in April 2018 and Puerto Morelos (20°50'59''N, 86°52'23''W; Fig. 1) in March and July-August 2019. Verde, located 5 km off the coast, is part of the reef system “Sistema Arrecifal Veracruzano-SAV” in Southern Gulf of Mexico, and has a marked seasonal variation in salinity, temperature, and turbidity. These variation are due to the influence of three major rivers flowing into the Gulf of Mexico and winter winds locally known as “nortes” (Salas-Perez and Granados-Barba 2008; Mateos-Jasso et al. 2012). Arcas is a remote reef located 128 km off the coast of Campeche in the Yucatan and Campeche Bank-YCB (Tunnell 2010). Puerto Morelos (PM) is part of the Mesoamerican reef in the Mexican Caribbean-CAR and is located at an approximate distance ranging from 500 m to less than 3 km parallel to the coast. The continental platform in the Yucatan Peninsula is karstic with little or no transport of suspended sediments to the sea; thus, the coastal influence on the reef is minimal and waters are usually clear (SEMARNAP 2000). These coral reefs were selected because variations in the abundance and distribution of *E. crispata* between them are probably related to the diverse biological, geological, physical and chemical processes occurring within each region (SAV, YCB, CAR) (Carrillo et al. 2007).



**Fig. 1** Localities where populations of *Elysia crispata* were studied in Southern Gulf of Mexico and Caribbean: Arcas (YCB), Verde (SAV) and Puerto Morelos (CAR). Map created by authors in ArcGIS

#### *Sampling design and fieldwork*

Quadrats (1 and 25 m<sup>2</sup>) were haphazardly sampled in different sites of the three localities at five different times of day: sunrise (57), morning (48), zenith (78), evening (86) and night (55). Sampled quadrats were located at either side of different transects (20-40 m) which were used as guides to facilitate the identification of the area that had been searched and assure it was not sampled repeatedly. Searching times ranged between 0620-0745 hr (sunrise), 0930-1110 hr (morning), 1200-1340 hr (zenith), 1700-1930 hr (evening) and 2040-2300 hr (night). By means of snorkeling and SCUBA diving, all individuals of *E. crispata* in each quadrat were counted and measured (head-tail length) with a Vernier caliper ( $\pm 0.1$  mm). Sea slugs on all types of substrata occurring within each quadrat were counted and measured but were never collected. As sacoglossan sea slugs are cryptic, we reduced searching bias by only using experienced divers in sampling trips and dive lights were used during night searches. Depth and light intensity were measured with a dive computer (Hollis DG03) and a light logger (HOBO® Pendant MX2202, Onset Computer Pocasset, MA, USA, with a precision of  $\pm 1$ -40 lux), respectively. Measurements were recorded every time that slugs were found and averaged per sampling unit.

## Statistical analyses

To model the number of sea-slugs as a function of reef (Verde, Arcas and PM), time of day (sunrise, morning, zenith, evening, night) and depth (from 0 to 13 m), a zero-inflated negative binomial (ZINB) generalized linear model with a log link function was used. The log link function ensures positive fitted values, whilst the negative binomial distribution is typically used for count data with many zero observations and strong overdispersion (Zuur et al. 2009). The ZINB model has two components to estimate the expected values of abundance as a function of a set of explanatory variables: a logit (zero inflated) component to assess the probability of finding false zeros and a negative binomial (count) component to predict the number of individuals.

Absence of organisms (zeros in counts) could be the result of 1) sampling in habitats that are unsuitable for the species, 2) poor experimental design or sampling practices, 3) the lack of experience or otherwise ability to identify specimens by the observer, 4) sampling in habitats that are suitable, but contain unexploited sites or 5) sampling outside the distribution range of the species, among others (Zuur et al. 2009). Thus, true zeros refer to the real absence of organisms in that site, while false zeros refer to the inability to record organisms where they are most likely to be found. When the probability of finding a false zero is low, then, a recorded zero will truly reflect the absence of an organism (i.e. it is likely to be a true zero). By contrast, when the probability of finding a false zero is high, then, the study might not have been able to record true zeros (for instance, individuals could have been at the sampling site, but passed unnoticed by the observer). In ZINB models, if you find organisms in any of the conditions studied, their abundance will be predicted by the NB component of the model, hence the expected abundance would be consistent with having recorded them.

The terms in the ZINB model were *reef* (categorical factor with three levels), *time-of-day* (categorical factor with five levels), and *depth* (continuous). The interaction term was *depth* × *time-of-day* in the logit component.

$$EC_i \sim ZINB_{(\mu_i, k, \pi_i)}$$

$$E(EC_i) = \mu_i \times (1 - \pi_i) \text{ and } \text{var}(EC_i) = (1 - \pi_i) \times \mu_i \times \left(1 + \pi_i \times \mu_i + \frac{\mu_i^2}{k}\right)$$

$$\log(\mu_i) = \alpha_1 + \text{Reef} + \text{Depth}$$

$$\text{logit}(\mu_i) = \alpha_2 + \text{TimeOfDay} + \text{Depth} + \text{TimeOfDay} \times \text{Depth}$$

$EC_i$  represents the abundance (counts) of *E. crispata* in observation  $i$ , which follow a negative binomial distribution with mean  $\mu_i$ ,  $k$  as the dispersion parameter and  $\pi_i$  as the probability that observation  $EC_i$  is a false zero. We simplified the notation for the predictor function by omitting the regression parameters that are usually provided before the variable names (Zuur et al. 2009).

The procedure to select the optimal ZINB model consisted of dropping terms one by one in a systematic order and deciding whether they were likely to pertain to the model. To assist each decision the Akaike Information Criterion (AIC) and likelihood ratio tests were used (Zuur et al. 2009). Because all three reefs had suitable habitats for this species, we considered that origin of false zeros were most likely explained by differences in *time-of-day (TOD)* or *depth*, but not by differences between localities. Thus, the initial full model in the count component included *reef*, *TOD*, *depth*, and the interactions of *depth* with *reef* and *time*, whereas *TOD*, *depth* and their interaction were included only in the logit component.

In addition, a linear model was adjusted to the size data using *depth*, *reef*, *TOD* and the interaction of *reef* and *TOD* as explanatory variables. A model selection sequence based on *F* tests similar to the one described previously, was used to find the best combination of variables explaining changes in sea slug size. This procedure showed that the model including *reef* and *TOD* and their interaction was the optimal model. Tukey's tests for unequal *N* samples were then performed to assess significant differences in size between *reef* and *TOD* once these terms resulted statistically significant (Zar 2009). As a low number of organisms were found in PM reef (*N*=7), size data from this reef was only described and not considered in the hypothesis testing procedures.

Models were validated by visual analysis of the residuals using plots of Pearson residuals versus fitted values and each explanatory variable (Zuur et al. 2010). The best ZINB model derived from these procedures included *reef* and *depth* for the count data, while the best model for the binomial data included *TOD*, *depth*, and the interaction between them. All statistical analyses and graphs were performed in *R* v. 3.5.3 (R Core Team 2019), using *stats* v3.5.3 (R Core Team, 2019), *pscl* v.1.5.1 (Jackman et al. 2017), *lmtest* v. 0.9-37 (Hothorn et al. 2019) and *ggplot2* v3.3.5 (Wickham et al. 2021) packages. Differences were considered significant at  $p < 0.05$  (Zar 2009).

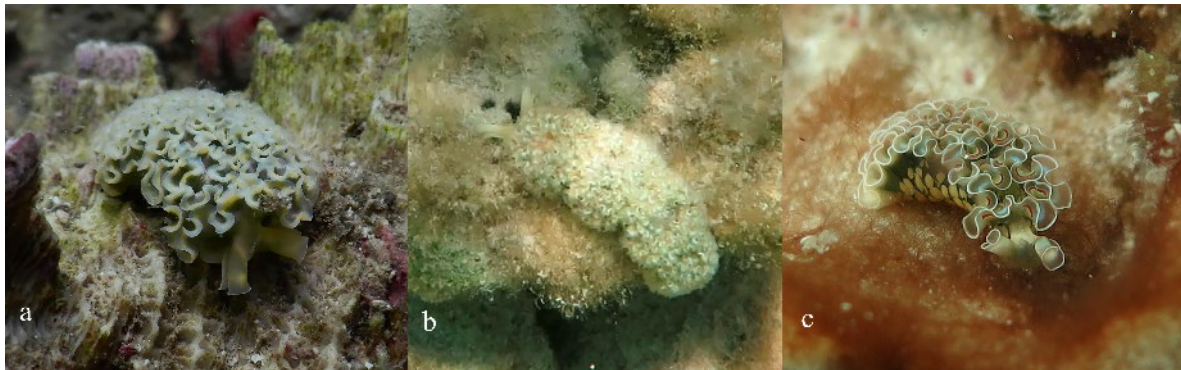
## Results

A total of 680 organisms of *E. crispata* was recorded in Verde, Arcas and PM reefs at five moments of the day (sunrise, morning, zenith, evening, night) and depths ranging from 0 to 13 m. Sampling covered a similar area of ~1.5 km in PM and Verde, but was reduced to 0.44 km<sup>2</sup> in Arcas. Despite differences in sampling effort, Arcas and Verde had a more similar sea slug density compared to PM, where only seven individuals of *E. crispata* were recorded (Table 1).

Arcas and Verde slugs resembled the description of the *crispata* ecotype in possessing a completely white foot, whereas sea slugs from PM had a darker green coloration and presented green diverticula in the foot, similar to the *clarki* ecotype (Fig. 2). Sea slugs were usually found exposed on top of hard substrates, such as coral fragments and coral pavement, yet some individuals were spotted on algae of the genus *Halimeda* and *Padina*. In general, few macroalgae species consistent with their potential food sources were observed near the sea slugs. An unidentified filamentous green alga was frequently found on the rocky substrates where sea slugs were common.

Table 1. Number of sites sampled, depth range and total sampled area at each locality. The number and average density of *E. crispata* individuals recorded at each locality is also included.

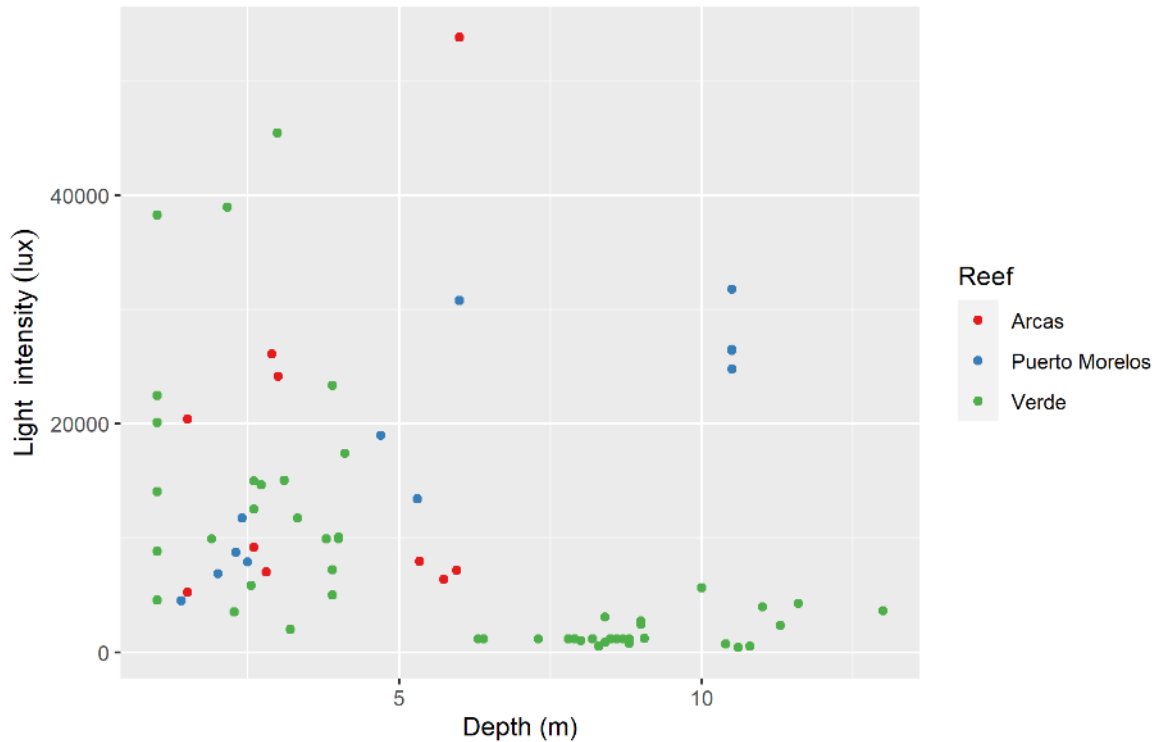
Locality	Number of sites	Depth (m)	Sampled area (m <sup>2</sup> )	Number of individuals	Density (individuals m <sup>-2</sup> )
Arcas	11	0.5–11	440	152	0.35
Puerto Morelos	9	1.5–10.5	1450	7	0.005
Verde	18	1–13	1546	521	0.63



**Fig. 2** *Elysia crispata* found in Verde (a), Arcas (b) and Puerto Morelos (c). Sea slugs from Verde and Arcas resembled the description of the *crispata* ecotype, whereas slugs from PM had some characteristics of the *clarki* ecotype (darker green coloration and presented green diverticula in the foot)



Measured at zenith (1200-1340 hr), the overall mean light intensity was the highest at Arcas ( $16,745 \pm 15,250$  lux), followed by PM ( $15,658.5 \pm 10,552.5$  lux), and Verde with the lowest mean light intensity ( $8,027.9 \pm 10,124.7$  lux). Light intensity also varied with depth (Fig. 3). In Arcas and Verde, light intensity decreased as depth increased, with mean values of 14,930.2 lux at  $< 5$  m and 3,849.6 lux at  $> 5$  m deep. In PM, however, abnormally high values of light intensity were recorded at 10.5 m deep (Fig. 3).



**Fig. 3** Light intensity as a function of depth measured in quadrats where *Elysia crispata* were sampled at zenith (1200-1340 hr) in Arcas (n=10), Verde (n=54) and Puerto Morelos (n=14)

#### Abundance

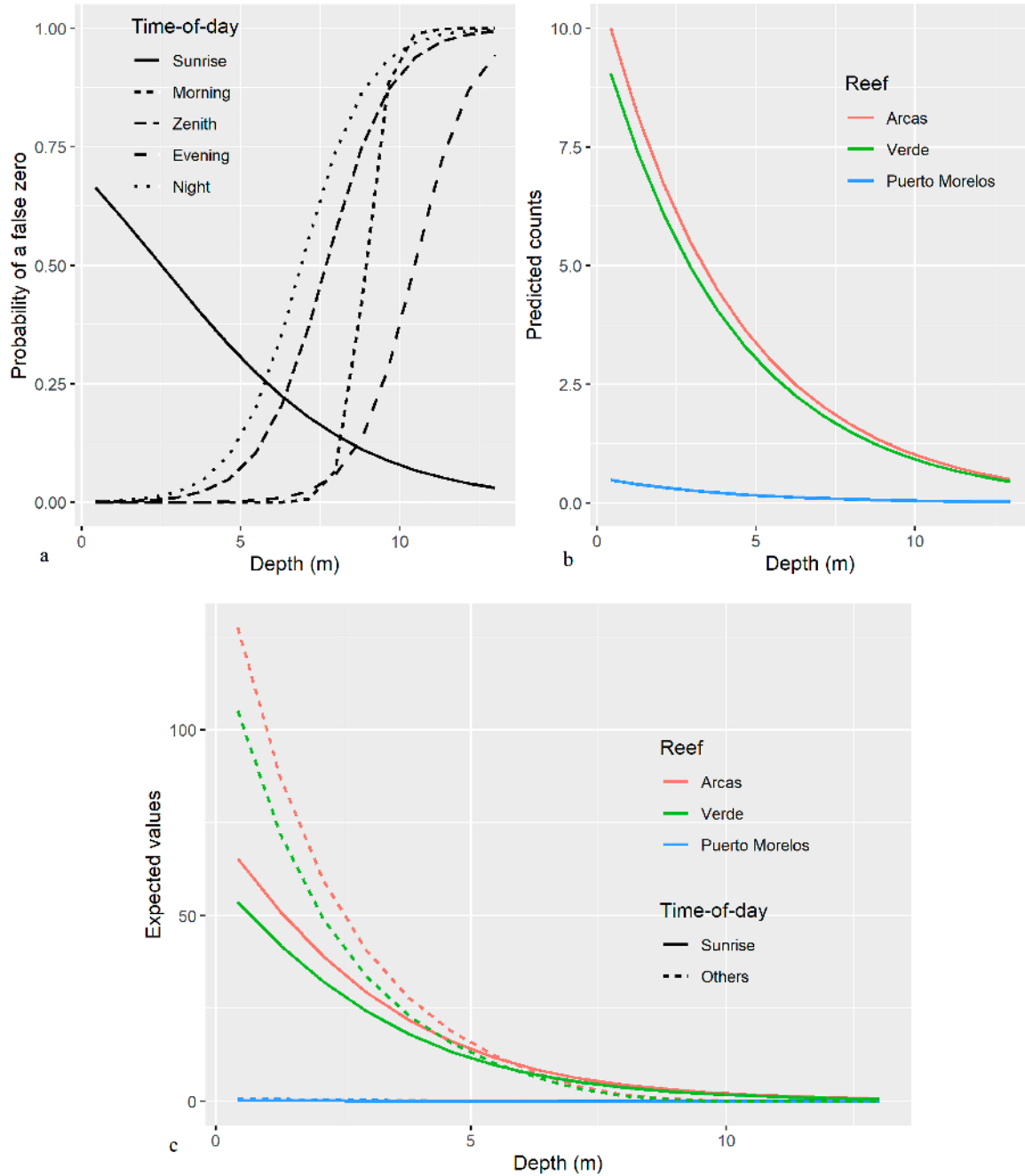
The highest numbers of slugs were found in Verde (521), followed by Arcas (152), and the lowest number of individuals was found in PM (7). When the times of day were considered, the highest number of organisms was found during night (203), followed by zenith (184) and evening (157), while the lowest during morning (58) and sunrise (78). Despite having a lower sampling effort in Arcas (i.e. less area sampled), the data was analyzed because it provides information of a very isolated population of sea slugs.

The zero inflated component of the ZINB model describing the absence of sea slugs showed that the interaction between *TOD* and *depth* was statistically significant (Chi-square test,  $\chi^2 = 32.898$ ,  $P < 0.001$ ), indicating that the probability of finding *E. crispata* changes with depth and these changes vary depending on the time of day (Table 2). During sunrise, the likelihood of false zeros decreased with depth, while in the morning, zenith, evening, and night, the likelihood of finding false zeros increased with depth (Fig. 4a).

Therefore, the model suggests that the true absence of sea slugs at any time of day, except sunrise, is likely to decrease with depth.

Table 2. Results of the model selection procedure applied to the NB segment. The terms in the model are the combination of explanatory variables included in each model tested, together with the corresponding degrees of freedom (df) and Akaike Information Criteria (AIC). At each step a model containing all but the term dropped was taken as the full model and the term's contribution assessed by means of a likelihood test using  $\chi^2$ ;  $p$  is the probability of the observed  $\chi^2$  under the null hypothesis of no contribution. D: Depth, R: Reef, TOD: Time-of-Day.

<b>Terms in the model</b>	<b>df</b>	<b>AIC</b>	<b>Term dropped</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	<b><math>p</math></b>
R + TOD + D + R:D + TOD:D	25	967.70	None		
R + TOD + D + R:D	21	964.55	TOD:D	4.85	0.303
R + TOD + D + TOD:D	23	989.13	R:D	25.08	< 0.001
R + D + R:D	17	962.83	TOD	11.01	0.201
R + D	15	980.66	R:D	32.89	< 0.001



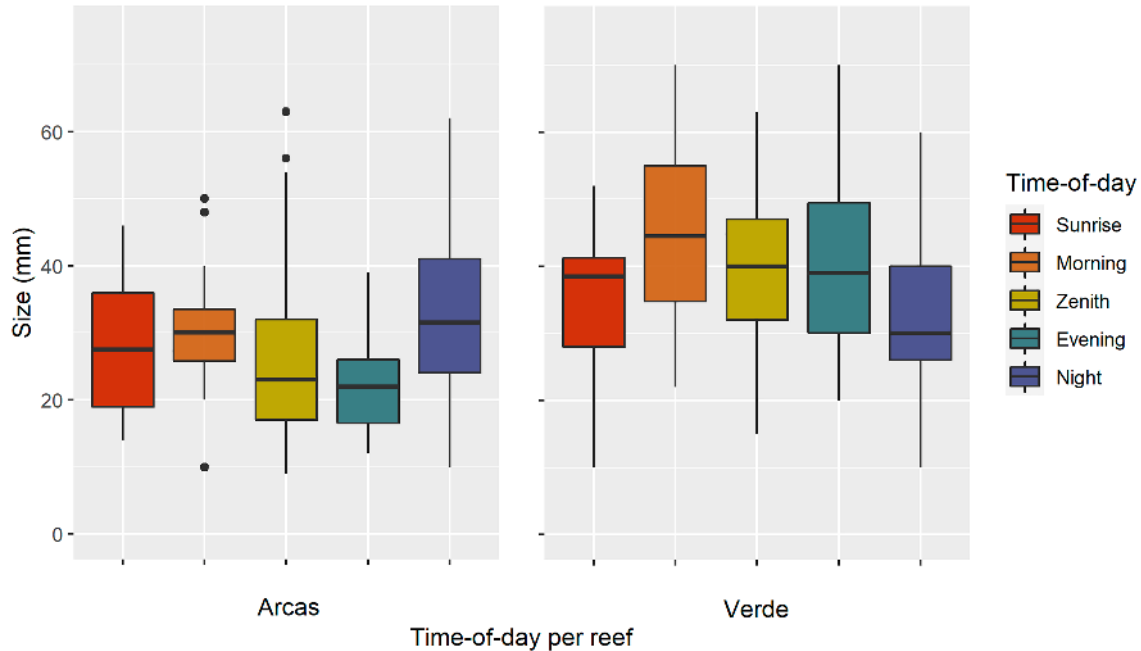
**Fig. 4** Zero Inflated Negative Binomial (ZINB) regressions adjusted to abundance data of *Elysia crispata* in the three localities studied (reefs: Arcas, Verde and Puerto Morelos) at five times of the day (sunrise, morning, zenith, evening, and night). a) Probability of finding false zeros of *E. crispata* in different times of day and depths; b) Predicted counts of *E. crispata* in the three localities and depths studied; c) Expected values of *E. crispata* considering the explanatory variables included in both components of the ZINB model; “others” represent all times of day, except sunrise

Once the condition of finding slugs was met, the negative binomial component of the model predicted the number of individuals that would be found. This logistic component predicts a decrease in the number of slugs with increasing depth in all three reefs. Nevertheless, the overall predicted counts in Arcas and Verde are much higher at lower depths compared to PM (Fig. 4b). In summary, the ZINB model showed that *E. crispata* in Arcas and Verde is expected to be more abundant ( $> 50$  individuals) in shallow depths ( $< 2$  m) at any time of the day except sunrise, when true zeros are most likely. By contrast, low abundance ( $\leq 1$  organism) is estimated in PM at all depths considered (Fig. 4c). The model, for example, implies that if there was an unfruitful search for this species in waters deeper than 6 m during the night in Verde and Arcas, sea slugs were probably there, but we failed to find them. In the event of finding them, the abundance of slugs would nonetheless have very low numbers ( $< 2$  individuals).

### *Size*

The smallest recorded individual (9 mm) was found in Arcas during zenith, whereas the three largest (70 mm) were found in Verde in the evening. Only small organisms were observed in shallower waters, and no sea slugs smaller than 20 mm were found deeper than 7 m. Despite these contrasting numbers, the observed changes in size with depth did not show statistical significance ( $F(1,663) = 0.365$ ,  $P = 0.545$ ; Online Resource 1 and 2).

The size of *E. crispata*, however, was statistically related to *reef* and *TOD*, as showed by the significant interaction term ( $F(4,666) = 8.66$ ,  $P < 0.001$ ; Online Resource 2). Pair-wise comparisons indicated that sea slugs sampled during the morning, zenith and evening in Verde were larger than those sampled at the same TOD in Arcas ( $P < 0.05$ ). Nonetheless, sea slugs sampled at sunrise and night were similar in size ( $P > 0.05$ ; Fig. 5). Sea slugs from PM ranged from 10 to 25 mm in length and their mean size was  $18.42 \pm 4.64$  mm ( $\pm$  SD).



**Fig. 5** Size of *Elysia crispata* at different times of day, sunrise, morning , zenith , evening and night in two localities, Arcas and Verde reefs. The line represents the median, top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles, the whiskers represent the maximum and minimum values, and dots are outliers

## Discussion

Decades of research in the laboratory have addressed the role of kleptoplasts in the fitness and survival of solar-powered sea slugs (see review by Wägele and Martin 2014). Still, the aspects of their abundance and distribution in their natural environments are unknown for most of the species. Even though *E. crispata* is a widely distributed and common species in the Caribbean, there are few records in the three localities studied herein (Gavagnin et al. 1997; Zamora-Silva and Ortigosa 2012; Ortigosa and Simões 2019). In preliminary field studies in the remote coral reef islands of Alacranes and the submerged shallow reef (10 m) at Bajos del Norte, both located in the Southern Gulf of Mexico, we found 95 and 26 organisms of *E. crispata*, respectively. However, in coastal reefs 23 km off the coast of Sisal, Yucatan (Madagascar and Bajo de 10), no organisms of this species were found, confirming previous reports (Ortigosa et al. 2013) as well as potential distribution predictions (Jiménez et al. 2021). It appears that not only the abundance of *E. crispata* is markedly variable, but its distribution is patchy with high numbers in some localities (e.g. Verde and Arcas) compared to very low occurrence in others (e.g. PM). Such heterogeneity poses a challenge in terms of describing and predicting the occurrence of *E. crispata* in the natural environment. Together with the sea slug’s cryptic nature, these irregular patterns allow for debate on the causes that explain its absence in places where they could be plausibly expected. To attend this difficulty, the model used in our study (ZINB) enables

to assess the probability of the true absence of sea slugs at different combinations of time of day and depth (in contrast with a false absence associated to a reduced ability of detection). Our results suggest that an effective detection of *E. crispata* depends on the light conditions found at certain depths and times of day.

Jiménez et al. (2021) found that distance to the coast was the best predictor with the highest contribution in the niche modelling of *Elysia* (including *E. crispata*) from the Caribbean. Authors associated this result to the fact that areas closer to the coast usually have more light availability because they are shallower, warmer and more productive. The characteristics of shallow waters can be found in reefs far from the coast, where large numbers of these organisms can be expected. Despite Arcas is noticeably more distant from the coast than Verde and PM, it has three islands that fulfill the description of the niche modelled for *Elysia* (Jiménez et al. 2021): high light availability due to shallow, warm, and productive waters. Accordingly, less favorable conditions for sea slugs should include turbidity, and excess of sediment. These conditions are present in Verde (at least in certain seasons; Mateos-Jasso et al. 2012; Avendaño et al. 2019), yet this reef had a high abundance of sea slugs. Additionally, mangrove lagoons and borrow pits are characteristic of another recognized habitat of the *clarki* ecotype in Florida (Middlebrooks et al. 2014). Taken as a whole, these results suggest that this species can inhabit a wide range of environmental conditions.

Studies in laboratory have shown that sacoglossan sea slugs regulate the potentially harmful excess of light through behavioral and physiological mechanisms (Jesus et al. 2010; Cartaxana et al. 2018). The differences in abundance of *E. crispata* found between Arcas, Verde and PM might be related to different light conditions (Fig. 3), particularly if turbidity is acting as a light regulator through the absorption by suspended particles (Carruthers et al. 2001). Verde is reported to have a high turbidity as the result of substantial discharge of Jamapa, La Antigua and Papaloapan rivers (Avendaño et al. 2019; Liaño-Carrera et al. 2019), while Arcas and Puerto Morelos usually present clear waters (SEMARNAP 2000; Chávez et al. 2007). Despite the contrasting conditions of Arcas and Verde, *E. crispata* were found in similar abundances, signaling that other factors such as food accessibility, larval availability or conditions at a microhabitat scale might be determinant in the distribution of this species.

Whilst sampling in Arcas, Verde and PM took place from March to August, it is unlikely that seasonal variability in environmental factors are responsible for the differences in sea slug abundance found between the reefs. Differences in temperature and photoperiod, which have been signaled as important factors regulating sea slug temperate populations (Clark 1975; Mondy and Pierce 2003), are less extreme in tropical than in temperate waters, and *E. crispata* occurs almost all year around in coral reefs of the Southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean (Gavagnin et al. 1997; Sanvicente-Añorve et al. 2012; Zamora-Silva and Ortigosa 2012; Ortigosa and Simões 2019). Moreover, the most contrasting abundances found in this study were between Puerto Morelos and both, Arcas and Verde, yet PM and Verde were both sampled in the same months. During this study, massive sargassum arrivals affected the area near PM. Sargassum so vastly accumulated can decrease light illuminance almost 75% (van Tussenbroek et al. 2017; Hendy et al. 2021) and such events can also increase temperature and decrease pH and oxygen concentrations (van Tussenbroek et al.

2017; Hendy et al. 2021). These factors are known to affect both the normal development and kleptoplasty of *E. crispata*, through bleaching and causing body deformities (Dionísio et al. 2017, 2018). As there is no previous data on the occurrence of *E. crispata* in PM, we can only suggest that sargassum arrivals could have been a cause for the low density of individuals found in this study.

Microhabitat availability is distinct between localities (Withers and Tunnell 2007), and could be providing different types of refuge for the slugs to take cover at different times of the day. As previously reported (Weaver and Clark 1981; Middlebrooks et al. 2014; Krug et al. 2016), most individuals in the present study were found on top of hard substrates without algae. Weaver and Clark (1981) suggest that this could be a tactic to increase photosynthesis; however, in Bahamas it is common to find *E. crispata* on the underside of rocks in < 2 m depth (Redfern 2013). It is possible that the occurrence of sea slugs on substrate depends on microhabitat conditions at a smaller spatial scale, which in turn, vary with depth (Chávez et al. 2007). In Verde, for example, crevices are common at most of the depths, but they are less frequent both in shallow waters and close to the reef lagoon. By contrast, the reef lagoon has larger rocks and sea grass patches that provide shade in these otherwise luminous shallow waters. The great variety of microhabitats found in these coral reefs can be expected to serve as shelter for slugs to avoid highly irradiated waters, a condition that could be physiologically limiting (Vieira et al. 2009).

The low abundance of *E. crispata* with increasing depth could be related to the reduction of resources at deeper waters. Macroalgae abundance and diversity can change with increasing depth in the reef system (SAV) where Verde is located (Horta-Puga et al. 2020). Adults from this species apparently consume a wide variety of macroalgae (Vital et al. 2021) but we rarely observed sea slugs associated to any macroalgae in the present study. Middlebrooks et al. (2014) also found low occurrence of *E. crispata* associated to their algal food in a completely different habitat in Florida. Adults might be temporarily staying at lower depths to lay eggs in algae and, moving back to deeper waters, as it has been suggested in other sea slugs (Willan 1979). Whilst juvenile *E. crispata* have a narrower food range compared to adults (Curtis et al. 2007), the induction of metamorphosis in the larvae does not depend on the presence of a particular food source (Krug 2009). It is possible that juveniles were consuming filamentous green algae other than *Bryopsis plumosa* or *Derbesia tenuissima* (Curtis et al., 2007), such as the one we observed near the rocky substrates where organisms were frequently found. Overall, these results suggest that the presence of food sources is unlikely to be the main factor determining the occurrence of this species within its geographical distribution, but further research should consider the feeding ecology of larval and juvenile stages.

A weak association of *E. crispata* to its food sources, would allow sea slugs to explore deeper waters under conditions of low abundance or even absence of food. Within aquatic ecosystems irradiance decreases and the spectral composition of light changes with depth, thereby influencing photosynthetic activity (Hill 1996). Long (red) wavelengths are absorbed at the first few meters and short (blue) wavelengths are the last to be absorbed as the depth increases (Kirk 2011). Moving deeper could be an advantageous strategy for sea slugs exploring lower light intensities, although limits to such advantages are surely imposed by the pigments in

their chloroplasts and how these respond to the varying wavelengths. *Elysia crispata* has a wide variety of pigments in its chloroplasts and its composition and concentration do not seem to be related to depth (Vital et al. 2021), which might represent an advantage to them. The relationship between pigment concentration and light preferences by sea slugs, hence, constitutes an interesting area of research yet to be investigated.

In the present study we confirmed the significant effect of TOD as a relevant factor predicting both sacoglossan occurrence and size, and suggest that they have circadian rhythms as do other sea slug groups (Newcomb et al. 2014). A daily pattern with a lower number of organisms of *E. crispata* at sunrise was statistically identified in Arcas and Verde, suggesting that sea slugs are capable of moving within the reef. Light wavelengths vary with the angle of the sun as it changes throughout the day. If sea slugs respond to daily variations in light by moving, its quality and quantity could be determining sea slug presence in these reefs. Research on circadian rhythms in sea slugs is very scarce, but studies on *E. timida* in the laboratory and their habitat, suggested the presence of a biological clock that partially controls its parapodial behavior (Rahat and Monselise 1979; Monselise and Rahat 1980). During daylight, *Plakobranthus ocellatus* seems to take cover on the underside of rocks or by burrowing in the sand (Tanamura and Hirose 2016); likewise, *E. crispata* might move to crevices in the reef or under rocks. While only experienced observers participated in the present study, sampling bias cannot be completely overruled. The use of lights during night dives might have increased the detection of organisms by focusing the observer's attention to a better illuminated, yet reduced field. It is unsure to what extent does *E. crispata* present nocturnal activity but results herein suggest mobility during that period of the day.

One of the main features of day light is that it synchronizes physiological mechanisms of living organisms to a period that allows the recognition of 24-h cycles. Changes in ambient light constitute an external signal to initiate certain activities (Takahashi 1991). The fact that *E. crispata* of varying size were found in certain times of day and that these differed between Arcas and Verde leads to suggest that sea slugs are capable of a relatively wide range of mobility within 0 and 13 m deep, and that this is influenced, at least partially by day light. Such light-dependent movement could be the result of one or more of the following explanations: 1) light stress avoidance, 2) circadian rhythms, and/or 3) predation avoidance.

Avoiding light stress to maintain functional chloroplasts has been supported by laboratory experiments in other species, such as *E. timida* (Jesus et al. 2010). Some of the algae used as food by slugs have photoprotection mechanisms through changes in pigments or by acclimating to depth and time of the day (Raniello et al. 2006). However, not all *E. crispata* present these pigments (Vital et al. 2021), and the macroalgae consumed most frequently by this species (e.g. *Bryopsis*, *Penicillus* and *Halimeda*) might not have them (Middlebrooks et al. 2019; Giossi et al. 2021). Other potential mechanisms for the protection of excessive light in *E. crispata* are mucus excretion, which has been speculated to be used as a sunscreen (Ireland and Scheuer 1979; Gavagnin et al. 1996; Havurinne et al. 2021), and behavioral strategies, such as closing the parapodia (Cartaxana et al. 2018, 2019) or moving towards areas in the reef that provide light protection.



Dial changes of light could also trigger movement of sea slugs within the reef. Whilst the solar elevation changes throughout the day, there is no simple relation between this and the spectral distribution (i.e. the proportion of different wavelengths) or total irradiance (i.e. light intensity/photon flux). When the solar elevation is reduced at sunrise, the ratio of short to long wavelength light in the direct solar beam decreases. This is due to a removal of short wavelength (blue) light in the atmospheric path caused by scattering (Kirk 2011). It might be that *E. crispata* detects changes of the spectral distribution at certain moments of the day and modifies its position in the reef by moving towards more sheltered areas. For this behavior to be displayed, photoreceptors detecting different wavelengths must exist. The eyes of *E. timida* perceive light at 540 nm and the presence of extraocular receptors has also been considered (Rahat and Monselise 1979). While *E. crispata* has eyes, the extent to which they can detect quality of light and display avoidance, or preference accordingly is still unknown. Either confirming light selective behaviors or finding other type of photoreceptors in *E. crispata* would constitute an additional element supporting the idea of behavioral mechanisms of photoprotection in this species and may help to explain some of the patterns in which they naturally occur.

Crypsis and secondary metabolites have been mentioned as mechanisms used by sacoglossans to avoid predation (Gavagnin et al. 1997, 2000). Predators of this sea slug group include crustaceans, fish, other sea slugs and even corals (Trowbridge 1994; Mehrotra et al. 2019). Whilst we witnessed sea slug attacks by different fish species during our field work, no consumption of *E. crispata* was observed. Predation avoidance could be considered the most unlikely explanation of the patterns described herein, but it should not be fully discarded until further studies assess the consumption of *Elysia* by visual predators.

Our research provided novel population information, showing that the abundance and size of *E. crispata* in coral reefs of Southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean Sea depend on locality, depth, and time of the day. Such information suggests that this sea slug is capable of moving a few meters within the reefs, and its mobility may be triggered by light quality and intensity. Further research is needed to better understand the unique biological phenomena of solar-powered sea slugs as they interact with their natural habitat and use it in management and conservation initiatives.

**Competing Interests:** The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

**Compliance with Ethical Standards:** This is an observational study. The study was conducted according to all applicable international, national and/or institutional guidelines for the care and use of animals.

**Funding:** This study was partially funded by the Harte Research Institute, the Harte Charitable Foundation and Texas A&M University.

**Author Contributions:** All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Xochitl G. Vital and Maite Mascaró. Funding for fieldwork and travel was procured by Nuno Simões. The first draft of the manuscript was written by Xochitl G. Vital and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Data Availability:** The datasets analyzed during the current study are available in the Zenodo repository and can be found at <https://doi.org/10.5281/zenodo.7686727>.

## References

- Avendaño O, Salas-Monreal D, Anis A, Salas-de-Leon DA, Monreal-Gomez MA (2019) Monthly surface hydrographical variability in a coral reef system under the influence of river discharges. *Estuar Coast Shelf Sci* 222:53–65. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.04.012>
- Baumgartner FA, Toth GB (2014) Abundance and size distribution of the sacoglossan *Elysia viridis* on co-occurring algal hosts on the Swedish west coast. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092472>
- Baumgartner FA, Pavia H, Toth GB (2015) Acquired phototrophy through retention of functional chloroplasts increases growth efficiency of the sea slug *Elysia viridis*. *PLoS One* 10:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120874>
- Begon M, Townsend C, Harper JL (2006) *Ecology: From individuals to ecosystems*, 4th edn. Blackwell Publishing
- Camacho-García YE, Pola M, Carmona L, Padula V, Villani G, Cervera JL (2014) Diversity and distribution of the heterobranch sea slug fauna on the Caribbean of Costa Rica. *Cah Biol Mar* 55:109–127.
- Carrillo L, Horta-Puga G, Carricart-Ganivet JP (2007) Climate and oceanography. In: Tunnell Jr. JW, Chávez EA, Withers K (eds) *Coral reefs of the southern Gulf of Mexico*. Texas A&M University Press, Corpus Christi, pp 34–40
- Carruthers TJB, Longstaff BJ, Dennison WC, Abal EG, Aioi K (2001) Measurement of light penetration in relation to seagrass. *Glob Seagrass Res Methods* 369–392. <https://doi.org/10.1016/b978-044450891-1/50020-7>
- Cartaxana P, Trampe E, Kühl M, Cruz S (2017) Kleptoplast photosynthesis is nutritionally relevant in the sea slug *Elysia viridis*. *Sci Rep* 7:7714. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08002-0>
- Cartaxana P, Morelli L, Quintaneiro C, Calado G, Calado R, Cruz S (2018) Kleptoplasts photoacclimation

- state modulates the photobehaviour of the solar-powered sea slug *Elysia viridis*. *J Exp Biol* 221:1–23. <https://doi.org/10.1242/jeb.180463>
- Cartaxana P, Morelli L, Jesus B, Calado G, Calado R, Cruz S (2019) The photon menace: Kleptoplast protection in the photosynthetic sea slug *Elysia timida*. *J Exp Biol* 222:3–6. <https://doi.org/10.1242/jeb.202580>
- Cartaxana P, Rey F, LeKieffre C, Lopes D, Hubas C, Spangenberg JE, Escrig S, Jesus B, Calado G, Domingues R, Kühl M, Calado R, Meibom A, Cruz S (2021) Photosynthesis from stolen chloroplasts can support sea slug reproductive fitness. *Proc R Soc B* 288:20211779. <https://doi.org/doi.org/10.1098/rspb.2021.1779>
- Chávez EA, Tunnell J, Withers K (2007) Reef zonation and ecology: Veracruz shelf and Campeche Bank. In: Coral reefs of the southern Gulf of Mexico. Texas A&M University Press. Corpus Christi, College Station, Texas, pp 41–67
- Christa G, Händeler K, Kück P, Vleugels M, Franken J, Karmeinski D, Wägele H (2015) Phylogenetic evidence for multiple independent origins of functional kleptoplasty in Sacoglossa (Heterobranchia, Gastropoda). *Org Divers Evol* 15:23–36. <https://doi.org/10.1007/s13127-014-0189-z>
- Clark KB (1975) Nudibranch life cycles in the Northwest Atlantic and their relationship to the ecology of fouling communities. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 27:28–69. <https://doi.org/10.1007/BF01611686>
- Clark KB (1994) Ascoglossan (=Sacoglossa) molluscs in the Florida Keys: rare marine invertebrates at special risk. *Bull Mar Sci* 54:900–916.
- Cruz S, Calado R, Serôdio J, Cartaxana P (2013) Crawling leaves: Photosynthesis in sacoglossan sea slugs. *J Exp Bot* 64:3999–4009. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert197>
- Cruz S, Cartaxana P, Newcomer R, Dionísio G, Calado R, Serôdio J, Pelletreau KN, Rumpho ME (2015) Photoprotection in sequestered plastids of sea slugs and respective algal sources. *Sci Rep* 5:1–8. <https://doi.org/10.1038/srep07904>
- Cruz S, LeKieffre C, Cartaxana P, Hubas C, Thiney N, Jakobsen S, Escrig S, Jesus B, Kühl M, Calado R, Meibom A (2020) Functional kleptoplasts intermediate incorporation of carbon and nitrogen in cells of the Sacoglossa sea slug *Elysia viridis*. *Sci Rep* 10:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66909-7>
- Curtis NE, Massey SE, Pierce SK (2006) The symbiotic chloroplasts in the sacoglossan *Elysia clarki* are from several algal species. *Invertebr Biol* 125:336–345. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2006.00065.x>
- Curtis NE, Pierce SK, Massey SE, Schwartz JA, Mangel TK (2007) Newly metamorphosed *Elysia clarki*

- juveniles feed on and sequester chloroplasts from algal species different from those utilized by adult slugs. *Mar Biol* 150:797–806. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0398-x>
- Curtis NE, Schwartz JA, Pierce SK (2010) Ultrastructure of sequestered chloroplasts in sacoglossan gastropods with differing abilities for plastid uptake and maintenance. *Invertebr Biol* 129:297–308. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2010.00206.x>
- de Vries J, Rauch C, Christa G, Gould SB (2014) A sea slug’s guide to plastid symbiosis. *Acta Soc Bot Pol* 83:415–421. <https://doi.org/10.5586/asbp.2014.042>
- Dionísio G, Faleiro F, Bilan M, Rosa IC, Pimentel M, Serôdio J, Calado R, Rosa R (2017) Impact of climate change on the ontogenetic development of “solar-powered” sea slugs. *Mar Ecol Prog Ser* 578:87–97. <https://doi.org/10.3354/meps12227>
- Dionísio G, Faleiro F, Bispo R, Lopes AR, Cruz S, Paula JR, Repolho T, Calado R, Rosa R (2018) Distinct bleaching resilience of photosynthetic plastid-bearing mollusks under thermal stress and high CO<sub>2</sub> conditions. *Front Physiol* 9:1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01675>
- Donohoo SA, Wade RM, Sherwood AR (2020) Finding the sweet spot: Sub-ambient light increases fitness and kleptoplast survival in the sea slug *Plakobranthus* cf. *ianthobaptus* Gould, 1852. *Biol Bull* 238:154–166. <https://doi.org/10.1086/709371>
- Gavagnin M, Mollo E, Cimino G, Ortea J (1996) A New  $\gamma$ -Dihydropyrone-Propionate from the Caribbean Sacoglossan *Tridachia crispata*. *Tetrahedron Lett* 37:4259–4262.
- Gavagnin M, Mollo E, Castelluccio F, Montanaro D, Ortea J, Cimino G (1997) A novel dietary sesquiterpene from the marine sacoglossan *Tridachia crispata*. *Nat Prod Lett* 10:151–156. <https://doi.org/10.1080/10575639708043731>
- Gavagnin M, Mollo E, Montanaro D, Ortea J, Cimino G (2000) Chemical studies of Caribbean sacoglossans: Dietary relationships with green algae and ecological implications. *J Chem Ecol* 26:1563–1578. <https://doi.org/10.1023/A:1005526526884>
- Giménez-Casalduero F, Muniain C (2008) The role of kleptoplasts in the survival rates of *Elysia timida* (Risso, 1818): (Sacoglossa: Opisthobranchia) during periods of food shortage. *J Exp Mar Bio Ecol* 357:181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2008.01.020>
- Giossi CE, Cruz S, Rey F, Marques R, Melo T, Domingues M do R, Cartaxana P (2021) Light induced changes in pigment and lipid profiles of Bryopsidales algae. *Front Mar Sci* 8:745083. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.745083>
- Händler K, Grzybowski YP, Krug PJ, Wägele H (2009) Functional chloroplasts in metazoan cells - A

- unique evolutionary strategy in animal life. *Front Zool* 6:1–18. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-28>
- Havurinne V, Aitokari R, Mattila H, Käpylä V, Tyystjärvi E (2021) Ultraviolet screening by slug tissue and tight packing of plastids protect photosynthetic sea slugs from photoinhibition. *Photosynth Res* 152:373–387. <https://doi.org/10.1007/s11120-021-00883-7>
- Hendy IW, Woolford K, Vincent-Piper A, Burt O, Schaefer M, Cragg SM, Sanchez-Navarro P, Ragazzola F (2021) Climate-driven golden tides are reshaping coastal communities in Quintana Roo, Mexico. *Clim Chang Ecol* 2:100033. <https://doi.org/10.1016/j.ecochg.2021.100033>
- Hill W (1996) Effects of light. In: Stevenson RJ, Bothwell ML, Lowe RL (eds) *Algal Ecology*. Academic Press, Inc., San Diego, pp 121–148
- Horta-Puga G, Tello-Musi JL, Córdova A, Gutiérrez-Carrillo A, Gutiérrez-Martínez J, Morales-Aranda AA (2020) Spatio-temporal variability of benthic macroalgae in a coral reef system highly influenced by fluvial discharge: Veracruz, Gulf of Mexico. *Mar Ecol* 41:1–18. <https://doi.org/10.1111/maec.12596>
- Hothorn T, Zeileis A, Farebrother RW, Cummins C, Millo G, Mitchell D (2019) *lmtree*. 1–47.
- Ireland C, Scheuer PJ (1979) Photosynthetic marine mollusks: In vivo  $^{14}\text{C}$  incorporation into metabolites of the sacoglossan *Placobranchus ocellatus*. *Science* (80) 205:922–923. <https://doi.org/10.1126/science.205.4409.922>
- Jackman S, Tahk A, Zeileis A, Maimone C, Fearon J, Meers Z (2017) *pscl*. 1–100.
- Jensen KR (1994) Behavioural adaptations and diet specificity of sacoglossan opisthobranchs. *Ethol Ecol Evol* 6:87–101. <https://doi.org/10.1080/08927014.1994.9523011>
- Jesus B, Ventura P, Calado G (2010) Behaviour and a functional xanthophyll cycle enhance photo-regulation mechanisms in the solar-powered sea slug *Elysia timida* (Risso, 1818). *J Exp Mar Bio Ecol* 395:98–105. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.08.021>
- Jiménez LM, Simões N, Yáñez-Arenas C (2021) Where is the genus *Elysia* in the western Atlantic? Potential distribution, species richness and representation in marine protected areas. *J Molluscan Stud*. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyab003>
- Kirk JTO (2011) *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*, 3rd edn. Cambridge University Press, New York
- Krug PJ (2009) Not my “type”: larval dispersal dimorphisms and bet-hedging in Opisthobranch life histories. *Biol Bull* 216:355–372. <https://doi.org/10.2307/25548166>
- Krug PJ, Vendetti JE, Valdés Á (2016) Molecular and morphological systematics of *Elysia* Risso, 1818

- (Heterobranchia: Sacoglossa) from the Caribbean region. *Zootaxa* 4148:1–137.  
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4148.1.1>
- Laetz EMJ, Moris VC, Moritz L, Haubrich AN, Wägele H (2017) Photosynthate accumulation in solar-powered sea slugs - starving slugs survive due to accumulated starch reserves. *Front Zool* 14:1–9.  
<https://doi.org/10.1186/s12983-016-0186-5>
- Lalli CM, Parsons TR (1997) *Biological oceanography, an introduction*, 2nd edn. The Open University, Burlington, USA
- Liaño-Carrera F, Camarena-Luhrs T, Gómez-Barrero A, Martos-Fernández FJ, Ramírez-Macias JI, Salas-Monreal D (2019) New coral reef structures in a tropical coral reef system. *Lat Am J Aquat Res* 47:270–281. <https://doi.org/10.3856/vol47-issue2-fulltext-7>
- Mahadevan P, Middlebrooks ML (2020) Bacterial diversity in the clarki ecotype of the photosynthetic sacoglossan, *Elysia crispata*. *Microbiologyopen* 9:1–9. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1098>
- Mateos-Jasso A, Zavala-Hidalgo J, Romero-Centeno R, Allende-Arandia ME (2012) Variability of the thermohaline structure in the northern Veracruz Coral Reef System, Mexico. *Cont Shelf Res* 50–51:30–40. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2012.10.001>
- Mehrotra R, Monchanin C, Scott CM, Phongsuwan N, Gutierrez MC, Chavanich S, Hoeksema BW (2019) Selective consumption of sacoglossan sea slugs (Mollusca: Gastropoda) by scleractinian corals (Cnidaria: Anthozoa). *PLoS One* 14:1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215063>
- Melo Clavijo J, Donath A, Serôdio J, Christa G (2018) Polymorphic adaptations in metazoans to establish and maintain photosymbioses. *Biol Rev* 93:2006–2020. <https://doi.org/10.1111/brv.12430>
- Middlebrooks ML, Bell SS, Pierce SK (2012) The kleptoplastic sea slug *Elysia clarki* prolongs photosynthesis by synthesizing chlorophyll a and b. *Symbiosis* 57:127–132.  
<https://doi.org/10.1007/s13199-012-0187-x>
- Middlebrooks ML, Bell SS, Curtis NE, Pierce SK (2014) Atypical plant-herbivore association of algal food and a kleptoplastic sea slug (*Elysia clarki*) revealed by DNA barcoding and field surveys. *Mar Biol* 161:1429–1440. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2431-9>
- Middlebrooks ML, Curtis NE, Pierce SK (2019) Algal sources of sequestered chloroplasts in the sacoglossan sea slug *Elysia crispata* vary by location and ecotype. *Biol Bull* 236:88–96.  
<https://doi.org/10.1086/701732>
- Middlebrooks ML, Curtis NE, Pierce SK (2020) The complete disappearance of a long standing sacoglossan sea slug population following Hurricane Irma, despite recovery of the local algal community. *Symbiosis*

80:231–237. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00670-3>

- Miyamoto A, Sakai A, Nakano R, Yusa Y (2015) Phototaxis of sacoglossan sea slugs with different photosynthetic abilities: a test of the ‘crawling leaves’ hypothesis. *Mar Biol* 162:1343–1349. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2673-1>
- Mondy WL, Pierce SK (2005) Apoptotic-like morphology is associated with annual synchronized death in kleptoplastic sea slugs (*Elysia chlorotica*). *Invertebr Biol* 122:126–137. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2003.tb00078.x>
- Monselise EBI, Rahat M (1980) Photobiology of *Elysia timida* (Mollusca: Opisthobranchia): Observations in the sea. *Isr J Zool* 29:125–128. <https://doi.org/10.1080/00212210.1980.10688489>
- Newcomb JM, Kirouac LE, Naimie AA, Bixby KA, Lee C, Malanga S, Raubach M, Watson WHI (2014) Circadian rhythms of crawling and swimming in the nudibranch mollusc *Melibe leonina*. *Biol Bull* 227:263–273. <https://doi.org/10.1002/adma.201403943>
- Ortigosa D, Simões N (2019) Sea slugs (Gastropoda: Heterobranchia) from two remote reefs of the southern Gulf of Mexico: Cayo Arenas and Cayo Arcas. *Rev Mex Biodivers*. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2596>
- Ortigosa D, Simoes N, Calado G (2013) Sea slugs (Mollusca: Opisthobranchia) from Campeche Bank, Yucatan Peninsula, Mexico. *Thalassas* 29:59–75.
- Pelletreau KN, Weber APM, Weber KL, Rumpho ME (2014) Lipid accumulation during the establishment of kleptoplasty in *Elysia chlorotica*. *PLoS One* 9:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097477>
- Pierce SK, Curtis NE, Massey SE, Bass AL, Karl SA, Finney CM (2006) A morphological and molecular comparison between *Elysia crispata* and a new species of kleptoplastic sacoglossan sea slug (Gastropoda: Opisthobranchia) from the Florida Keys, USA. *Molluscan Res* 26:23–38.
- R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
- Rahat PM, Monselise EB (1979) Photobiology of the chloroplast hosting mollusc *Elysia timida* (Opisthobranchia). *J Exp Biol* 79:225–233.
- Raniello R, Lorenti M, Brunet C, Buia MC (2006) Photoacclimation of the invasive alga *Caulerpa racemosa* var. *cylindracea* to depth and daylight patterns and a putative new role for siphonaxanthin. *Mar Ecol* 27:20–30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2006.00080.x>
- Redfern C (2013) Bahamian seashells: 1161 species from Abaco, Bahamas. Bahamianseashells.com Incorporated, Boca Ratón, Florida

- Rumpho ME, Summer EJ, Manhart JR (2000) Solar-Powered sea slugs. Mollusc/Algal Chloroplast Symbiosis. *Plant Physiol* 123:29–38. <https://doi.org/0.1104/pp.123.1.29>
- Salas-Perez JJ, Granados-Barba A (2008) Oceanographic characterization of the Veracruz reefs system. *Atmosfera* 21:281–301.
- Sanvicente-Añorve L, Hermoso-Salazar M, Ortigosa J, Solís-Weiss V (2012) Opisthobranch assemblages from a coral reef system: the role of habitat type and food availability. *Bull Mar Sci* 88:1061–1074. <https://doi.org/10.5343/bms.2011.1117>
- Schmitt V, Wägele H (2011) Behavioral adaptations in relation to long-term retention of endosymbiotic chloroplasts in the sea slug *Elysia timida* (Opisthobranchia, Sacoglossa). *Thalassas* 27:225–238.
- SEMARNAP (2000) Programa de Manejo del Parque Nacional Arrecife de Puerto Morelos. Distrito Federal, México
- Takahashi JS (1991) Circadian rhythms: From gene expression to behavior. *Curr Opin Neurobiol* 1:556–561. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(05\)80028-5](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(05)80028-5)
- Tanamura D, Hirose E (2016) Population dynamics of the sea slug *Plakobranthus ocellatus* (Opisthobranch: Sacoglossa: Elysioidea) on a subtropical coral reef off Okinawa-Jima Island, Ryukyu Archipelago, Japan. *Zool Stud* 55:1–8. <https://doi.org/10.6620/ZS.2016.55-43>
- Trowbridge CD (1994a) Defensive responses and palatability of specialist herbivores - Predation on NE Pacific ascoglossan gastropods. *Mar Ecol Prog Ser* 105:61–70. <https://doi.org/10.3354/meps105061>
- Tunnell JWJ (2010) Distribución de los arrecifes. In: Tunnell JWJ, Chávez EA, Withers K (eds) Arrecifes coralinos del sur del Golfo de México. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN, México, pp 17–29
- van Tussenbroek BI, Hernández Arana HA, Rodríguez-Martínez RE, Espinoza-Avalos J, Canizales-Flores HM, González-Godoy CE, Barba-Santos MG, Vega-Zepeda A, Collado-Vides L (2017) Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Mar Pollut Bull* 122:272–281. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.06.057>
- Vieira S, Calado R, Coelho H, Serôdio J (2009) Effects of light exposure on the retention of kleptoplastic photosynthetic activity in the sacoglossan mollusc *Elysia viridis*. *Mar Biol* 156:1007–1020. <https://doi.org/10.1007/s00227-009-1144-y>
- Vital XG, Rey F, Cartaxana P, Cruz S, Domingues MR, Calado R, Simões N (2021) Pigment and fatty acid heterogeneity in the sea slug *Elysia crispata* is not shaped by habitat depth. *Animals* 11:1–17. <https://doi.org/10.3390/ani11113157>



- Wägele H, Martin WF (2014) Endosymbioses in sacoglossan sea slugs: Plastid-bearing animals that keep photosynthetic organelles without borrowing genes. In: Löffelhardt W (ed) Endosymbiosis. Springer-Verlag Wien, pp 291–324
- Weaver S, Clark KB (1981) Light intensity and color preferences of five Ascoglossan (=Sacoglossan) Molluscs (Gastropoda: Opisthobranchia): a comparison of chloroplast-symbiotic and aposymbiotic species. *Mar Behav Physiol* 7:297–306.
- Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen TL, Takahashi K, Wilke C, Woo K, Yutani H, Dunnington D (2021) *ggplot2*. 1–292.
- Willan RC (1979) The ecology of two New Zealand opisthobranch molluscs. University of Auckland
- Withers K, Tunnell JWJ (2007) Reef biodiversity. In: Coral reefs of the southern Gulf of Mexico. Texas A&M University Press. Corpus Christi, College Station, Texas, pp 68–87
- Zamora-Silva A, Ortigosa D (2012) Nuevos registros de opistobranquios en el Parque Nacional Sistema Arrecifal Veracruzano, México. *Rev Mex Biodivers* 83:359–369.
- Zar JH (2009) *Biostatistical Analysis*, 5th edn. Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, NJ, USA
- Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, Saveliev AA, Smith GM (2009) *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. Springer
- Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS (2010) A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods Ecol Evol* 1:3–14. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210x.2009.00001.x>

### **Artículo III. Preferencia lumínica en una babosa marina fotosintética: ¿la aclimatación a la luz de los cleptoplastos es importante?**

#### Introducción

Algunas babosas marinas del grupo Sacoglossa son los únicos metazoarios capaces de secuestrar y mantener en funcionamiento durante un largo periodo a los cloroplastos que ingieren de las algas de las que se alimentan, proceso denominado cleptoplastía (Cruz *et al.* 2020). Estos moluscos han sido un modelo biológico enigmático porque pueden usar la energía de estos organelos (cleptoplastos) en su beneficio. Por ello, y en contra de la creencia general, son animales fotosintéticos y potencialmente mixotróficos (Middlebrooks *et al.* 2011, Cartaxana *et al.* 2017, 2021, Melo Clavijo *et al.* 2018). Aunque desde finales de la década de 1960 se reconoció a la cleptoplastía en las babosas marinas sacoglosas (Trench 1969), falta mucho por conocer sobre el funcionamiento de los cleptoplastos dentro de estos animales, en particular en lo que se refiere a su relación con la luz.

La luz es un recurso central para los individuos autótrofos fotosintéticos, ya que representa su principal fuente de energía. Además, la luz rige una variedad de aspectos conductuales y fisiológicos en los animales (Begon *et al.* 2006). Como cualquier organismo fotosintético, las babosas marinas con cleptoplastos necesitan luz para fotosíntesis. Sin embargo, al estar expuestos a intensidades altas de luz, los cleptoplastos pueden acumular especies reactivas de oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species), que son moléculas formadas por la adición de electrones al oxígeno y pueden causar daño a los tejidos, lo que compromete su funcionalidad (Dorrell y Howe 2012, Cruz y Cartaxana 2022).

Los organismos fotosimbiontes tienen vías endógenas metabólicas y celulares para disminuir el daño producido por las ROS y mantener a sus huéspedes, como los dinoflagelados simbiotes o los cleptoplastos (Dorrell y Howe 2012). Especies de retención longeva (mínimo una semana) de cleptoplastos, como *Elysia timida*, mantienen niveles menores de ROS, comparado con especies de retención corta (algunos días), como *Elysia cornigera*; de Vries *et al.* (2015) encontraron que *E. cornigera* acumuló una mayor cantidad de ROS, comparado con *E. timida*, durante un periodo de ayuno de 10 días. Existen mecanismos homeostáticos de retroalimentación negativa que contrarrestan la acumulación de ROS y si se presentan en este grupo, podrían indicar que las babosas marinas detectan cambios en la eficiencia fotosintética de los cleptoplastos.

Algunas especies de babosas marinas sacoglosas mantienen la capacidad de los cleptoplastos de tener respuestas fisiológicas de fotoprotección, como cambios en sus concentraciones de pigmentos, ante diferentes intensidades lumínicas (Cruz *et al.* 2015, Havurinne y Tyystjärvi 2020). Estos cambios ayudan a disipar el exceso de energía y evitar una saturación que inhiba la fotosíntesis y posiblemente, tienen un papel importante en la duración de la actividad fotosintética en los cleptoplastos (Cruz y Cartaxana 2022). El estado fisiológico en el que los cloroplastos están habituados a determinada intensidad de luz se denomina aclimatación a la luz. Esta aclimatación confiere el balance entre la obtención suficiente de energía para los procesos metabólicos y anabólicos y, la protección ante un exceso de energía. Debido a que los cloroplastos son los receptores más importantes de la luz para la fotosíntesis, en ellos ocurre la aclimatación, así como es donde la composición y funcionamiento se ajustan en respuesta a los cambios de las condiciones de la luz (Bielczynski *et al.* 2016).

Las babosas marinas que retienen los cleptoplastos funcionando y realizando fotosíntesis en sus tejidos (retención funcional), muestran una fototaxia positiva (movimientos dirigidos hacia la luz), al contrario de especies cuya retención no es funcional (Rahat y Monselise 1979, Miyamoto *et al.* 2015). Por ejemplo, Weaver y Clark (1981) encontraron que las especies sin cleptoplastía funcional evitan la luz de intensidades de 100-500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Adicionalmente, el comportamiento de especies de retención longeva está modulado por la aclimatación de sus cleptoplastos, como en *Elysia viridis*, que después de haber sido alimentada con alga aclimatada a luz alta (200  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), mostró una preferencia por esa intensidad de luz (Cartaxana *et al.* 2018). Dicha especie de babosa marina sacoglosa es la única en la que se ha indagado si la preferencia lumínica de estos animales puede ser afectada por los cleptoplastos.

El término preferencia (por ejemplo, por un alimento o un hábitat) implica una conducta del organismo en la que existe una elección por una alternativa entre varias disponibles, igualmente viables (Singer 2000, Underwood *et al.* 2004). Dicha elección se identifica en los estudios sobre preferencia, como selección activa y se diferencia de la elección pasiva porque la pasiva está determinada por elementos del entorno que son ajenos a la conducta de preferir (por ejemplo, la probabilidad de encontrar un alimento o la abundancia relativa de un tipo de hábitat). Por ello, los estudios de preferencia recomiendan el uso de diseños experimentales que permitan distinguir la selección activa de la pasiva (Olabarria *et al.* 2002, Mascaró *et al.* 2012). Dichos diseños incluyen un tratamiento control

en el que a los sujetos experimentales se les ofrecen situaciones “sin elección” (todas las alternativas son similares). La preferencia es demostrada cuando el organismo elige una alternativa en una mayor proporción cuando se le presentan varias opciones simultáneamente, comparado con la proporción que elige cuando no hay elección (Underwood *et al.* 2004, Jackson y Underwood 2007).

La babosa marina sacoglosa *Elysia crispata* puede mantener los cleptoplastos funcionales durante meses (Curtis *et al.* 2006), por lo que es una especie de retención longeva; es de talla grande comparada con otras especies de su grupo (máximo 15 cm) y es común en el Atlántico occidental (Krug *et al.* 2016). Estas características la convierten en un buen modelo para investigar el comportamiento asociado a la cleptoplastía, particularmente si la aclimatación de los cleptoplastos a la luz puede afectar su preferencia lumínica. Esta especie prefiere intensidades de luz de 200-300  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , al igual que espectros de luz amarillo y verde, de acuerdo con Weaver y Clark (1981); no obstante, la intensidad de luz óptima para que sus cleptoplastos realicen la fotosíntesis es 500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  según Taylor (1971).

Estos dos trabajos mencionados fueron de las primeras investigaciones en el tema de conducta y fisiología de babosas marinas fotosintéticas; sin embargo, se debe considerar que Taylor (1971) realizó los experimentos a 20 °C que es una temperatura poco común a lo largo del año en aguas tropicales donde habita *E. crispata* y seguramente afectó el metabolismo de la especie estudiada y los resultados que se obtuvieron. Por otro lado, en el experimento de Weaver y Clark (1981) se utilizaron organismos cultivados en el laboratorio que no tuvieron exposición al entorno natural de la especie y además, colocaron sus sujetos experimentales juntos y al mismo tiempo durante los ensayos, lo que pudo generar interferencia entre individuos (Martin y Bateson 2007).

Indagar las preferencias lumínicas de *E. crispata* de otras poblaciones y a través de un diseño experimental adecuado, complementará la información existente. La información derivada de este trabajo proporcionará el contexto para comprender mejor la distribución de las babosas marinas fotosintéticas en su hábitat, así como la influencia que tienen los organelos secuestrados en su conducta. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo incluyeron 1) determinar si existe una preferencia de *E. crispata* por cierta intensidad y espectro de la luz y 2) establecer si la preferencia a la intensidad lumínica de *E. crispata* se modifica como resultado de consumir algas aclimatadas a intensidades bajas (40  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y altas de luz (425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). La hipótesis de este estudio es

que si la conducta de *E. crispata* está mediada por mecanismos de retroalimentación asociados a la capacidad fotosintética de los cleptoplastos, se espera que preferirá la intensidad de luz a la cual los cleptoplastos fueron previamente aclimatados.

## Materiales y métodos

### Recolección y mantenimiento de organismos

Los organismos de *E. crispata* se recolectaron manualmente en el arrecife Verde del Sistema Arrecifal Veracruzano (19° 12' 8.80" N, 96° 4' 17.20" O), entre septiembre de 2020 y agosto 2021, a una profundidad de 3–5 m. La recolección se limitó al mínimo de organismos necesarios y se realizó bajo un permiso otorgado por la SAGARPA (PPF/DGOPA-061/21). Los individuos tenían las características del ecotipo “crispata” descrito por Krug et al. (2016) y medían alrededor de 50 mm. En noviembre de 2019, se recolectaron catorce organismos ( $\pm 30$  mm) de la misma especie provenientes de Mahahual, Quintana Roo (18° 41' 10.62" N, 87° 42' 59.30" O) para pruebas preliminares. Los animales se mantuvieron en ayuno, en contenedores con agua marina y aireación constante (26 °C,  $\sim 50 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante menos de 48 h previo a su traslado al laboratorio donde se realizaron los experimentos, siguiendo el protocolo sugerido por Dionísio et al. (2013).

En el laboratorio, todas las babosas marinas se mantuvieron en grupos de hasta 20 individuos en acuarios con 14 L de agua de mar filtrada (a 26 °C y salinidad de 35) en sistemas de recirculación (acuario de mantenimiento). El fotoperiodo se mantuvo en 12 h de luz y 12 h de oscuridad, reflejando el promedio de la zona de estudio a lo largo del año. Dos lámparas Radion XR15W G3 (EcoTech Marine®) se utilizaron para mantener la luz a una intensidad lumínica de  $\sim 100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Weaver y Clark 1981), medida en la superficie del agua y un espectro como el de la figura 3.1. Las lámparas se colocaron a una distancia de 22 cm sobre los acuarios, los cuales tenían una altura de 24 cm.

Se realizaron tres experimentos que se describen en la siguiente subsección. Después de llegar al laboratorio y antes de los experimentos 1 y 2, los animales estuvieron en ayuno durante 24 h y después se alimentaron por al menos una semana con *Bryopsis pennata* J.V.Lamouroux 1809 recolectada en septiembre de 2020 en Sisal, Yucatán, México y posteriormente cultivada a  $40 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con medio de cultivo F/2 Guillard

(Proline®) en el laboratorio (Andersen 2005; Fig. 3.2). Previo al tercer experimento, las babosas marinas pasaron por el mismo ayuno y alimentación descritos para los experimentos 1 y 2, después, se mantuvieron en ayuno durante una semana más y luego, se alimentaron durante el mismo periodo de tiempo (al menos una semana) con el alga *B. pennata* que había sido cultivada en el laboratorio durante tres semanas a una intensidad lumínica alta ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; Fig. 3.2). De esta forma, pasaron por un acondicionamiento similar antes del pretratamiento de alimentarse con algas aclimatadas a luz alta. El alga se cambiaba diariamente para asegurar que los animales consumieran el alga aclimatada a la luz de interés y no existiera un potencial cambio de aclimatación con la luz del acuario de mantenimiento.

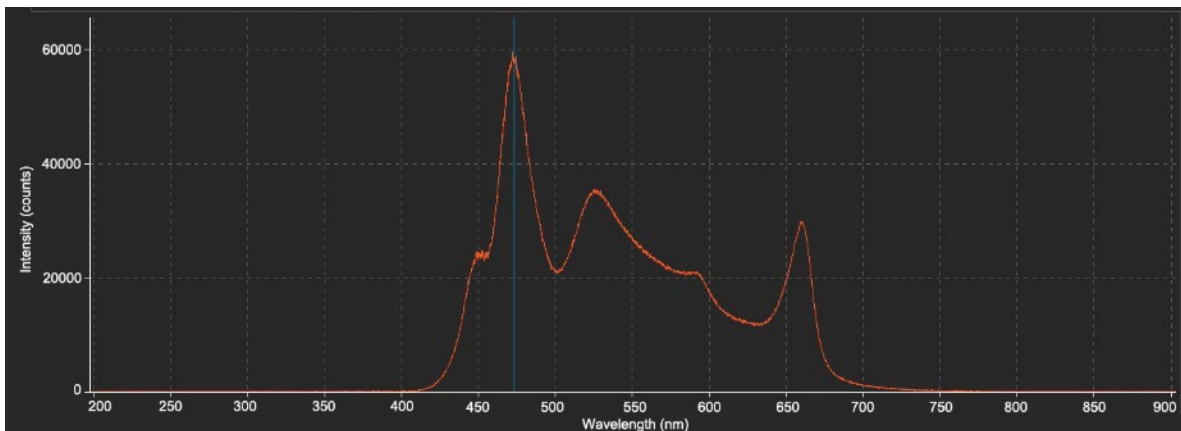


Figura 3.1. Espectro de luz de las lámparas Radion XR15W G3 usadas para iluminar los acuarios de mantenimiento de *Elysia crispata*. El diagrama se obtuvo con el programa Ocean View 2.0.7.

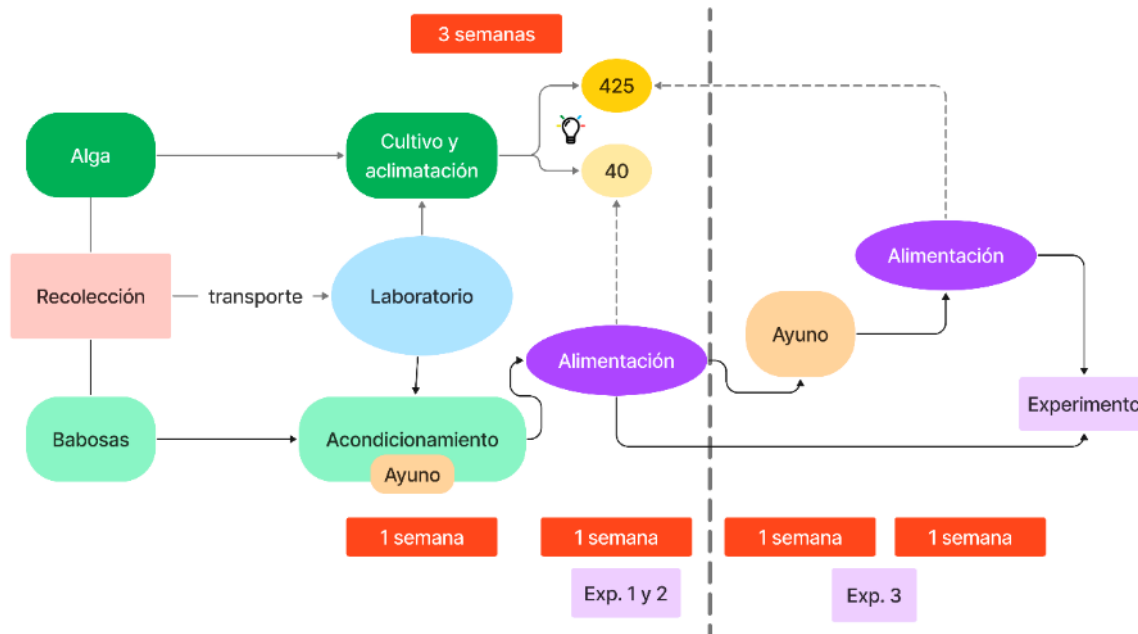


Figura 3.2. Diagrama que muestra los pasos relacionados con la alimentación de *Elysia crispata*, desde la recolección hasta los experimentos de preferencia lumínica. La línea punteada gruesa separa las condiciones de los experimentos 1 y 2, del experimento 3. La luz a la que se aclimataron las algas fue de  $40 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , las unidades fueron omitidas en el diagrama para reducir el texto.

### Diseño experimental

La preferencia lumínica de los organismos se determinó en un dispositivo de vidrio con forma de cruz, con una cámara central y cuatro extremos de  $10 \times 10 \times 10 \text{ cm}$  (Figura 3.3a). Las recámaras convergían en la recámara central que fungió como distribuidor común. En los experimentos 1 y 2, el acceso a las cuatro recámaras desde el centro del dispositivo se mantuvo abierto, mientras que en el experimento 3, este acceso sólo se mantuvo abierto para dos recámaras contrapuestas. El dispositivo contenía agua marina proveniente del acuario de mantenimiento, de tal forma que mantenía un nivel de 1 cm de profundidad (500 ml). Se estableció esta cantidad de agua a fin de que las babosas marinas permanecieran en el fondo del dispositivo y con la zona dorsal expuesta hacia las lámparas que estaban arriba, ya que con mayor volumen de agua, usaban la tensión superficial para moverse y frecuentemente quedaban con la zona ventral (pie) hacia arriba. Esto generaba un sesgo de la cantidad de luz que les daba en el dorso, que es donde tienen la mayor cantidad de cleptoplastos.

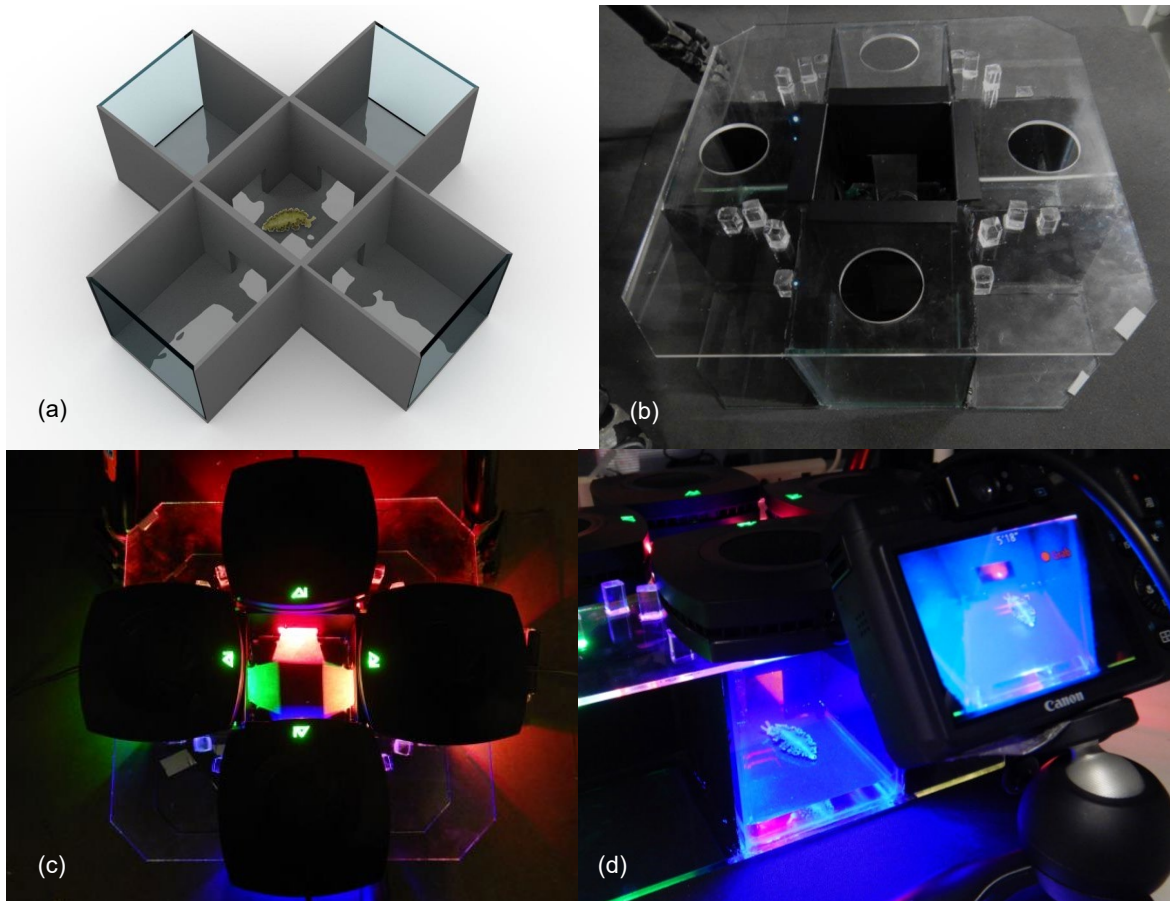


Figura 3.3. Dispositivo utilizado en los experimentos de preferencia lumínica de *Elysia crispata*. a) Modelos del contenedor de vidrio con paredes oscuras (excepto en los extremos) y de una babosa que se encuentra en la posición de inicio; b) contenedor con tapa de acrílico en la que se sostienen las lámparas; los espacios en el centro permiten la manipulación de los organismos y el paso de la luz directamente cuando las lámparas están encendidas; c) vista apical del prototipo con luces encendidas; d) ejemplo de una de las vistas laterales y de la posición de una de las cámaras durante el tratamiento con luces encendidas en el experimento 1. Modelo digital (a) realizado por Óscar Santillán Carvantes.

Para determinar la preferencia (selección activa) por el color e intensidad de la luz y distinguirla de una asociación pasiva, los experimentos se realizaron exponiendo a los organismos a dos tratamientos. Uno en el que se ofrecían a las babosas marinas opciones de luz de diferente color o intensidad mediante el encendido de las lámparas en cada una de las recámaras de un dispositivo experimental (con opción de escoger: CH). El otro, en el que las mismas recámaras no tenían las lámparas encendidas y por lo tanto, representaban una condición en la que las babosas no tenían opción de escoger (sin opción de escoger: NCH). Este último corresponde a un tratamiento control efectivo, ya que



cualquier diferencia entre la conducta de las babosas en el dispositivo con las condiciones CH y las de NCH sería exclusivamente atribuible a la conducta de selección activa (Liszka y Underwood 1990, Mascaró *et al.* 2012). Cabe señalar que, de confirmarse el comportamiento mencionado, este estaría caracterizado por una conducta de preferencia o selección a favor de alguna(s) de las condiciones de luz; o bien, por una conducta de rechazo o selección en contra de alguna(s) de esas condiciones; esta distinción es factible con el diseño experimental utilizado.

Se realizaron tres experimentos sobre la conducta de preferencia o selección activa de luz en *E. crispata* (Cuadro 3.1). Como se mencionó en la subsección anterior (3.4.1), en los experimentos 1 y 2, las babosas marinas fueron alimentadas con algas aclimatadas a luz baja ( $40 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El primer experimento examinó si las babosas marinas presentaban una conducta de preferencia por la luz de alguno(s) de los espectros (colores): azul ( $\sim 450 \text{ nm}$ ), verde ( $\sim 517 \text{ nm}$ ), amarillo ( $\sim 520\text{--}650 \text{ nm}$ ) o rojo ( $\sim 665 \text{ nm}$ ). El segundo puso a prueba si estos animales presentan una conducta de preferencia por alguna(s) de las cuatro intensidades de luz ofrecidas: 60, 180, 425 o  $1400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Por último, el tercer experimento consistió en evaluar la preferencia de *E. crispata* por luces de alta ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) o baja intensidad ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) después de haber sido alimentada con algas aclimatadas a luz alta ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ); esta información se comparó con las babosas marinas correspondientes a esas intensidades que participaron en el experimento 2 (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Condiciones lumínicas y de configuración de las lámparas en los experimentos (Exp.) de preferencia de luz en *Elysia crispata*, así como de la aclimatación del alga (*Bryopsis pennata*) que las babosas consumieron. CH representa las condiciones lumínicas de las recámaras, cuando las lámparas estaban encendidas; NCH representa a las mismas recámaras con las luces apagadas. A fin de asegurar independencia estadística y de conducta, los resultados de los tratamientos NCH de los experimentos 1 y 2 fueron usados como el control de los experimentos 2 y 1, respectivamente.  $\lambda$ : longitud de onda, B: Azul, G: Verde, Y: Amarillo, R: Rojo; LL: baja; ML: media baja, HL: alta, HH: muy alta intensidad de luz; I, II, III y IV representan condiciones uniformes de longitud de onda e intensidades.

Exp	Aclimatación de <i>B. pennata</i>		Condiciones experimentales de <i>E. crispata</i>			
	$\lambda$ (nm)	Intensidad ( $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	Opciones (CH) Luz encendida		Control (NCH) Luz apagada	
			$\lambda$ (nm)	Intensidad ( $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )	$\lambda$ (nm)	Intensidad ( $\mu\text{mol}$ quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
1	450–525	40	B: 450	~29	I	-
			G: 517	~29	II	
			Y: 520-650	~29	III	
			R: 665	~29	IV	
2	450–525	40	450-475	LL: 60	-	I
			450-475	ML: 180	-	II
			450-475	HL: 425	-	III
			450	HH: 1400	-	IV
3	450–475	40	450-475	LL: 60	-	I
	450–475	40	450-475	HL:425	-	II
	450–475	425	450-475	LL: 60	-	I
			450-475	HL: 425	-	II

El dispositivo experimental contaba con una tapa de acrílico transparente, con agujeros de 6 cm de diámetro sobre cada una de las cuatro recámaras para colocar las lámparas Ai PRIME 16HD (Fig. 3.3b,c). Durante los tratamientos con luz apagada (NCH), la intensidad lumínica fue similar en todo el dispositivo y en todos los experimentos ( $\sim 0\text{--}4$  lux  $\approx 0\text{--}0.05$   $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Dado que en el experimento 1 el espectro de la luz era la variable de interés, la intensidad se mantuvo a  $\sim 2200$  lux ( $\sim 29$   $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en todas las recámaras con las lámparas encendidas (CH). Debido a que la variable de interés en los experimentos 2 y 3 era la intensidad de la luz, el espectro de este factor fue similar en la condición CH (Cuadro 3.1). Tanto las distintas intensidades, como los espectros de la luz se definieron considerando lo reportado previamente por Taylor (1967) y Weaver y Clark (1981) y los valores reportados por Vital et al. (2023). Todas las intensidades de luz fueron medidas con un registrador de datos ambientales HOBO Pendant® Mx2202 ( $\pm 10\%$  lux) y el espectro con un espectrómetro de fibra óptica Ocean Optics® USB4000. Las intensidades fueron convertidas a  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  de acuerdo con Thimijan y Heins (1983) para facilitar la comparación con la literatura sobre el tema.

Cada prueba consistió en tomar un individuo al azar del acuario de mantenimiento (ver 3.4.1) y colocarlo en el centro del dispositivo experimental protegido con una tapa de PVC que impedía la percepción de las condiciones de luz. Después de un minuto, tiempo otorgado para habituarse al dispositivo, la tapa era levantada y la prueba se consideraba iniciada (Fig. 3.4). Durante los siguientes 30 minutos, se permitía que la babosa explorase cualquier recámara con las luces apagadas (tratamiento NCH). Inmediatamente después, se colocaba a la babosa de nuevo en el centro del dispositivo y se repetía el procedimiento, pero con las luces encendidas (tratamiento CH; Fig. 3.3c,d). Al terminar cada ensayo individual, el dispositivo se limpiaba cuidadosamente con agua dulce y se enjuagaba con agua marina filtrada para eliminar rastros de secreciones, luego se llenaba nuevamente de agua marina proveniente del sistema de mantenimiento y se rotaba, al igual que el orden de las lámparas.

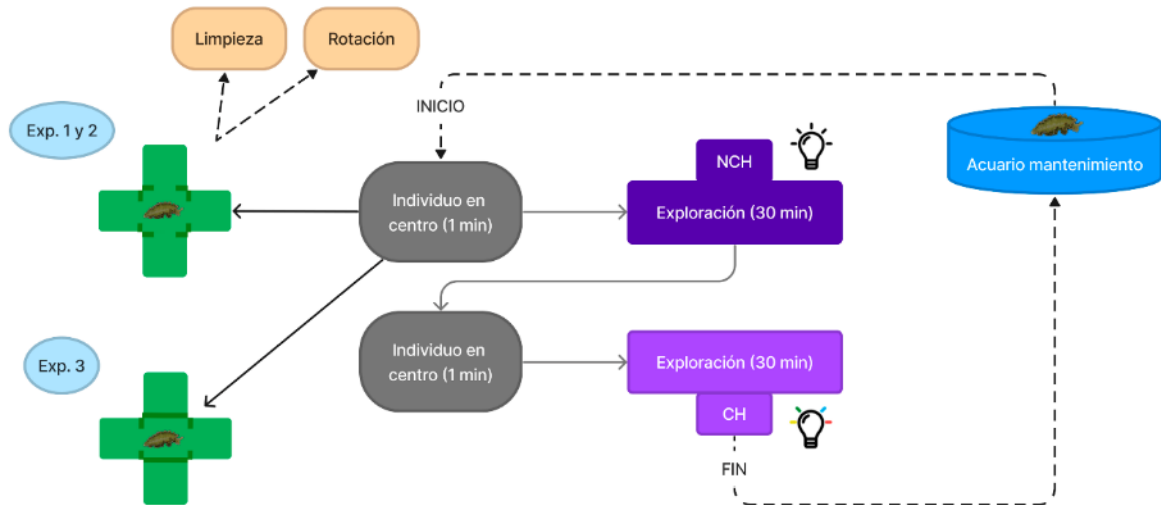


Figura 3.4. Diagrama de los ensayos experimentales para probar la preferencia lumínica de *Elysia crispata*. Del lado izquierdo se ejemplifican las recámaras abiertas en el dispositivo experimental durante cada experimento (Exp.). En cada prueba, un individuo del acuario de mantenimiento fue colocado en el centro del dispositivo con una tapa de PVC, después se removió la tapa y se observó su movimiento durante 30 min con la luz apagada (tratamiento NCH), posteriormente, se repitió este procedimiento con la luz encendida (tratamiento CH). Al finalizar cada ensayo, el dispositivo experimental fue limpiado y rotado, al igual que las lámparas.

El tiempo de los ensayos fue determinado con base en estudios previos sobre la conducta de babosas marinas fotosintéticas (Miyamoto *et al.* 2015, Cartaxana *et al.* 2018), así como en lo observado en pruebas preliminares. Para evitar el sesgo en los resultados del segundo tratamiento (CH) debido a la exploración y decisión del primer tratamiento (NCH), los resultados del tratamiento NCH del experimento 1 representaron el control del experimento 2, y viceversa; en el experimento 3, la mitad de los individuos fueron asignados aleatoriamente a cada tratamiento. Una persona fue la misma observadora en todos los ensayos. Durante ambos periodos (CH y NCH) las siguientes variables se registraron en una bitácora:

1) *Primera elección*: la primera recámara en la que la babosa entró. Se consideró que la babosa había entrado en una recámara toda vez que más de la mitad de su cuerpo se encontraba dentro del perímetro representado por las paredes de colindancia de cada recámara.

2) *Latencia de primera elección*: el tiempo transcurrido desde el inicio de la prueba y hasta que la babosa había entrado en la primera recámara y permanecido en ella por un tiempo mínimo de 5 segundos.

3) *Duración*: el tiempo total que una babosa permaneció en el interior de cada una de las recámaras.

4) *Secuencia*: el orden secuencial en el que una babosa entraba a las recámaras durante el periodo de 30 minutos.

5) *Elección final*: la recámara en la que se encontraba la babosa al cumplirse los 30 minutos de duración del ensayo. En los casos en los que la babosa no se encontrara dentro de alguna de las recámaras, el evento era catalogado como “no eligió” y no era contabilizado para los análisis posteriores de esta variable.

Todos los ensayos con luz encendida (CH) fueron grabados con cámaras GoPro Hero 4 y Canon PowerShot G16 a fin de registrar las variables conductuales con precisión, en los ensayos con luz apagada (NCH) sólo se grabó la vista apical de la recámara central con la cámara Canon. Para evitar la iluminación de las luces del laboratorio, una tela *black out* se colocó encima del montaje (trípode, cámaras y dispositivo) durante los ensayos NCH; con la poca luz que llegaba al dispositivo se podía distinguir con el ojo humano si las babosas entraban o salían de las recámaras. Al finalizar cada ensayo, todos los individuos se regresaron al acuario de mantenimiento (Fig. 3.4), con excepción de aquellos que se utilizaron para el análisis de pigmentos ( $n = 15$ ) del experimento 3. Cada ensayo tuvo una duración total de 1:00 h y todos los ensayos se realizaron entre las 9:00 y las 13:30 h.

#### Análisis de pigmentos

La composición de pigmentos de 10 organismos de *E. crispata* que se alimentaron de alga aclimatada a una intensidad lumínica alta ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), junto con dos muestras de dichas algas, se analizó para caracterizar la aclimatación a la luz de los cleptoplastos y corroborar que sus estados fisiológicos correspondían a esa condición lumínica (Cartaxana *et al.* 2018). Los individuos y muestras de alga se congelaron en nitrógeno líquido al finalizar el experimento 3. Adicionalmente, cinco babosas marinas alimentadas con alga aclimatada a luz baja ( $40 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), fueron congeladas en nitrógeno líquido junto con dos muestras de esa alga, para su posterior análisis. Todas las muestras fueron enviadas a la Universidad de Aveiro, Portugal, para el análisis de pigmentos descrito por Cruz *et al.* (2014). De esta forma, se corroboró una diferencia en el estado de aclimatación entre las algas cultivadas en luz alta (HL) y luz baja (LL), así como de las babosas marinas que se alimentaron de las algas mencionadas (Cuadro 3.1).

## Análisis estadísticos

A partir de las respuestas conductuales registradas durante los ensayos, se definieron y analizaron las siguientes variables de frecuencia, latencia y duración (Martin y Bateson 2007):

- a) *Frecuencia de primera elección*: número de individuos que eligieron una recámara como primera decisión. Valores altos de esta respuesta indicaban una preferencia inmediata por una recámara sin la interferencia de la experiencia previa dada por la exploración de las opciones del dispositivo experimental.
- b) *Frecuencia de muestreo*: proporción de las veces que una babosa salió de una recámara, entre el número de veces que entró en ella a lo largo de un periodo de 30 minutos. Valores altos de esta respuesta conductual indicaban una conducta de exploración y rechazo de la condición en esa recámara; mientras que valores bajos indicaban que la babosa había encontrado una condición preferida después de probar esa u otras opciones.
- c) *Frecuencia final*: número de individuos que se encontraban en una recámara al terminar un periodo lo suficientemente amplio como para permitir una exploración de las opciones del dispositivo experimental. Valores altos de esta respuesta indicaban una preferencia relativamente más definitiva por una recámara, ya que una babosa podía haber entrado en esa recámara y permanecido ahí; o bien, haber explorado varias opciones y elegido finalmente esa recámara.
- d) *Latencia*: tiempo que un organismo tardó para tomar su primera elección. Valores bajos de esta respuesta indicaban una detección rápida y preferencia por las condiciones de la recámara elegida en primera instancia.
- e) *Duración*: tiempo total que una babosa permaneció en el interior de cada una de las recámaras. Valores altos de esta respuesta indicaban una preferencia por las condiciones de esa recámara. Valores bajos de esta respuesta indicaban un rechazo por esas condiciones, o bien, una conducta donde prevaleció la exploración de las distintas opciones en el dispositivo.

Como se mencionó anteriormente, para asegurar el cumplimiento del requisito de independencia estadística, se utilizaron los resultados del tratamiento NCH del experimento 1 como el control del experimento 2, y viceversa. En el experimento 3, la mitad de los individuos fueron asignados aleatoriamente a cada tratamiento. El número total de babosas que intervinieron en cada uno de los experimentos se muestra en el cuadro 3.2.

Cuadro 3.2. Frecuencia absoluta de organismos de *Elysia crispata* utilizados para el análisis estadístico de las variables frecuencia de primera elección, frecuencia final y frecuencia de muestreo medidas durante los experimentos de preferencia de luz. CH representa el tratamiento en el que las lámparas de las recámaras estaban encendidas; NCH representa las condiciones en las que las recámaras tenían las luces apagadas (control). Se muestra la intensidad de luz en la que el alga *Bryopsis pennata* fue aclimatada y que las babosas consumieron en cada caso (LL: 40  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; HL: 425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Experimento	Aclimatación del alga	Frecuencia de Primera Elección		Frecuencia Final		Frecuencia de Muestreo	
		CH	NCH	CH	NCH	CH	NCH
1: espectro	LL	32	29	31	34	54	53
2: intensidad	LL	36	36	27	27	65	40
3: aclimatación	LL	21	16	15	14	15	22
	HL	13	14	13	13	35	21

Se revisaron los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianza para las variables continuas y se optó por instrumentos no-paramétricos ya que dichos requisitos no se cumplieron. En el caso de los experimentos 1 y 2, las respuestas que involucraron periodo de tiempo de *E. crispata* (latencia y duración) fueron analizadas mediante pruebas de Mann-Whitney para muestras independientes (M-W) para comparar los tratamientos NCH y CH de cada opción de espectro o de intensidad de luz. En el caso del tercer experimento, se aplicaron dos pruebas de M-W, una prueba por opción ofrecida.

Las respuestas de frecuencia de primera elección y de frecuencia final de los experimentos 1 y 2 fueron analizadas con pruebas de G en tablas de contingencia bidimensionales (razón de verosimilitud) (Liszka y Underwood 1990, Zar 2009) con los tratamientos NCH y CH como una vía de clasificación y las cuatro opciones de luz a elegir, ya fuera de color o de intensidad, como la segunda vía de clasificación. En el caso del experimento 3, estas variables conductuales también se analizaron con pruebas de G, pero en tablas de contingencia de tres dimensiones. En estos casos, los tratamientos NCH y CH y las dos opciones de intensidad de luz (alta: 425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; baja: 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fueron las primeras dos vías y la intensidad de luz a la que fueron aclimatadas las algas consumidas por las babosas (alta: 425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; baja: 40  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) constituyó la tercera vía.

Finalmente, la frecuencia de muestreo de los experimentos 1 y 2 se analizó con tablas de contingencia tridimensionales con los tratamientos NCH y CH y las cuatro

opciones de espectro e intensidad de luz como las primeras dos vías. En este caso, la tercera vía de clasificación fue la conducta de las babosas de salir o permanecer en una recámara una vez que habían entrado en ella. Como una babosa podía entrar más de una vez a cualquier recámara en un mismo ensayo, la frecuencia total no se correspondía con el número de babosas involucradas en cada experimento (Cuadro 3.2) (Zar 2009). En el experimento 3 esta variable (frecuencia de muestreo) no se analizó con alguna prueba de hipótesis debido a que la tabla de contingencia que correspondía era de cuatro dimensiones y el número de babosas fue insuficiente. Los gráficos y análisis se realizaron en Tableau 2021.1 y R v. 3.5.3 (R Core Team 2019), respectivamente, usando los paquetes *ggplot* 3.3.5 (Wickham *et al.* 2021) y *stats* 3.5.3 (R Core Team 2019) o en hojas de cálculo de acuerdo con las fórmulas en Zar (2009). La significancia estadística se consideró a partir de  $p < 0.05$ .

## Resultados

Se analizó la preferencia lumínica de 115 organismos de *Elysia crispata*. En general, se observó mucha variación en el comportamiento de estas babosas marinas durante los tres experimentos. Sin embargo, un análisis de las cinco variables en conjunto mostró ciertos patrones que se describirán a continuación.

### Preferencia del color de luz

En el primer experimento, la frecuencia de primera elección de las babosas fue mayor por el azul (13), seguido del amarillo (11) y el verde (8) y sólo cuatro individuos eligieron el rojo como primera decisión cuando las luces estaban encendidas. Sin embargo, las frecuencias en las cuatro recámaras correspondientes cuando las luces estuvieron apagadas fueron similares y la prueba de *G* no encontró diferencias significativas ( $G = 0.94$ ;  $g.l. = 3$ ;  $p = 0.82$ ; Fig. 3.5). Estos resultados indican que las babosas no presentaron una preferencia inicial por algún espectro inmediatamente después de recibir el estímulo de la luz.

Los valores de latencia se encontraron entre 0.46 y 18 min con la luz encendida (CH) y de 0.7 y 18.7 min con la luz apagada (NCH), los valores promedio del primer tratamiento fueron ligeramente menores a los del segundo tratamiento (Fig. 3.6a). Las pruebas de M-W, mostraron que la diferencia sólo fue estadísticamente significativa en el caso del color verde ( $U = 53$ ,  $p = 0.03$ ) mientras que para el resto de los colores la latencia fue similar con y sin luz encendida (azul:  $U = 104.5$ ,  $p = 0.317$ ; rojo:  $U = 5$ ,  $p = 0.164$ ; amarillo:  $U = 74$ ,  $p = 0.068$ ).



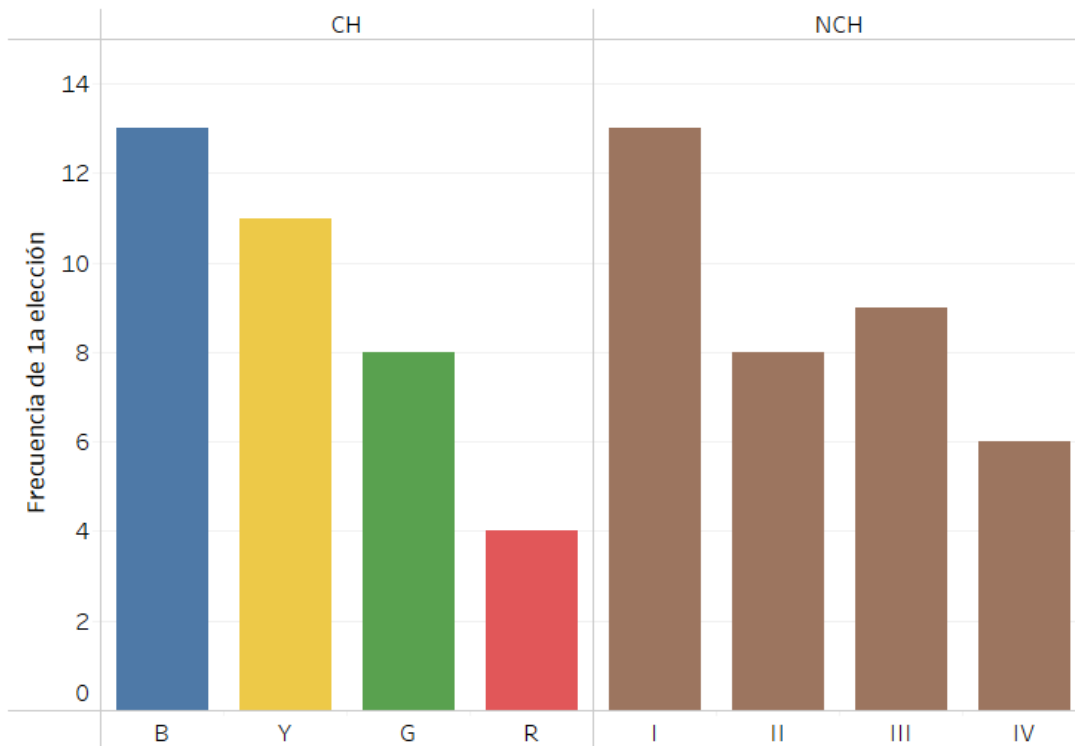


Figura 3.5. Frecuencia de la primera elección de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 1 sobre preferencia de color. Las iniciales en CH corresponden a B=Azul, G=Verde, R=Rojo y Y=Amarillo y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz.

En la condición de luz encendida (CH), *E. crispata* pasó más tiempo promedio (duración) en los colores amarillo, azul y verde comparado con el tiempo transcurrido en las mismas recámaras sin luz (NCH; Fig. 3.6b). A pesar de lo anterior, la duración fue muy variable y tuvo intervalos similares en estos colores, resultando en pruebas de M-W que no encontraron diferencias estadísticamente significativas (amarillo:  $U = 712$ ,  $p = 0.399$ ; azul:  $U = 579$ ,  $p = 0.412$ ; verde:  $U = 522.5$ ,  $p = 0.101$ ). En contraste, las babosas pasaron significativamente menos tiempo en el color rojo y este fue menos variable cuando existía la oportunidad de escoger otros colores (CH) comparado con cuando no existía dicha oportunidad (NCH;  $U = 803$ ,  $p = 0.024$ ; Fig. 3.6b).

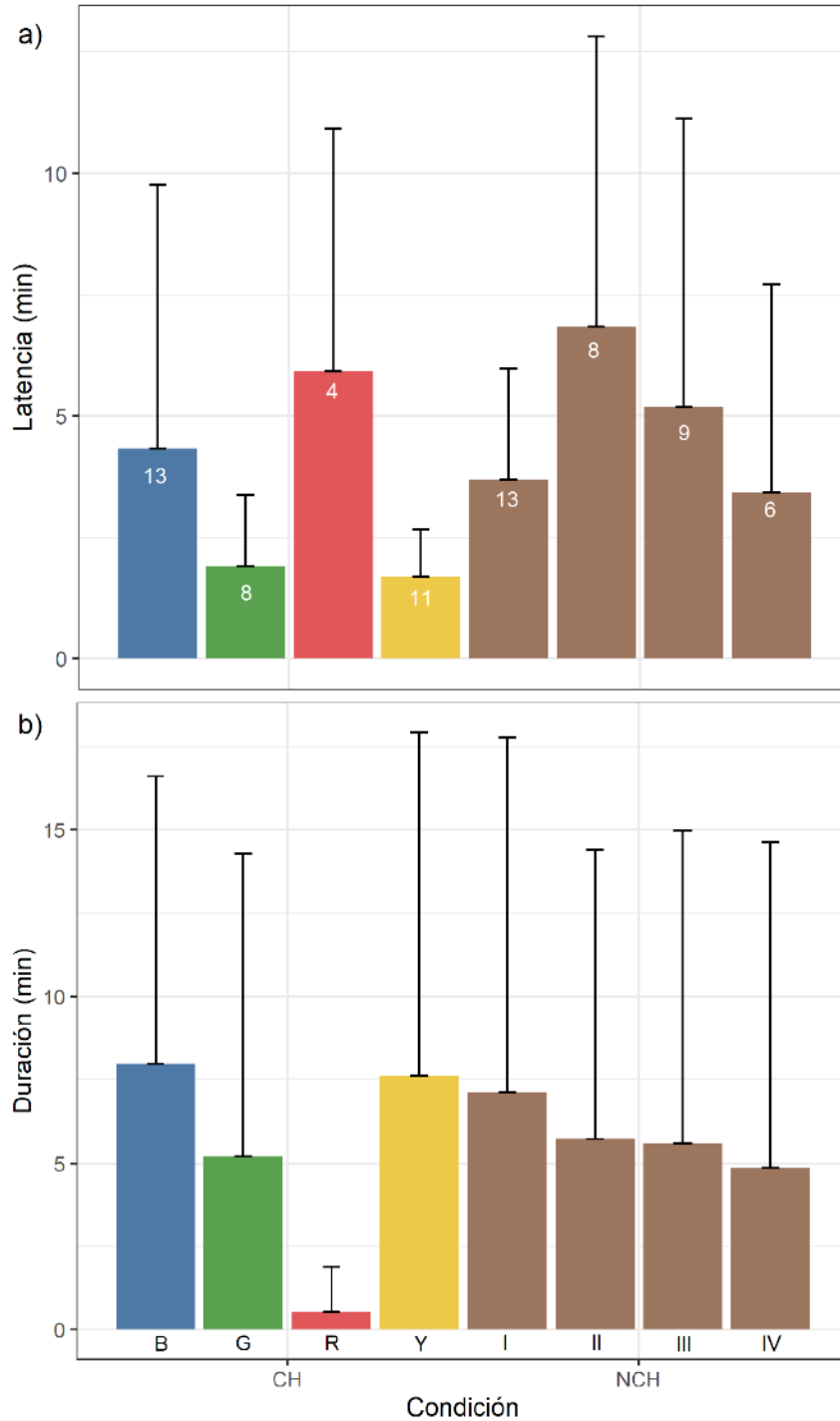


Figura 3.6. Promedio ( $\pm$  DE) de la latencia para entrar a la recámara elegida como primera opción (a) y la duración (b) de *Elysia crispata*, en condiciones de luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 1 sobre preferencia de color. Las iniciales en CH corresponden a B=Azul, G=Verde, R=Rojo y Y=Amarillo y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz. El número de babosas observada en cada recámara se muestra dentro de las barras en (a), y fue  $n = 36$  para todas las barras en (b).

En cuanto a la conducta exploratoria o de muestreo, la mayoría de las babosas marinas examinó únicamente una o dos opciones de colores en el tratamiento CH; y poco menos de la mitad (42%) no presentó un comportamiento exploratorio, eligió su primera opción como la final. El azul fue el color en el que las babosas entraron más veces, haciéndolo el color más explorado; en segundo lugar, estuvo el amarillo, seguido del verde y finalmente, el rojo. Adicionalmente, 5 del total de 6 babosas que entraron al color rojo, lo abandonaron antes de que terminara el periodo de 30 minutos de duración de los ensayos, volviéndolo el color más frecuentemente desocupado. El verde, por contraste, fue el color menos rechazado según este indicador, ya que sólo salieron de él 3 de las 10 babosas que habían entrado (Fig. 3.7). A pesar de esta tendencia, la prueba de G aplicada a la frecuencia de muestreo encontró que las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $G = 14.87$ ,  $g.l. = 10$ ,  $p = 0.14$ ) entre los dos tratamientos (NCH y CH), indicando que las babosas muestrearon las distintas recámaras con la misma frecuencia cuando estaban las luces de color prendidas comparado con cuando no lo estaban.

La frecuencia final de las babosas fue mayor en el color azul (11), seguido de amarillo (10), verde (9) y solo se encontró un organismo en rojo cuando las luces estuvieron encendidas (CH; Fig. 3.8). A pesar del contraste en estos últimos datos, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $G = 6.38$ ,  $g.l. = 3$ ,  $p = 0.094$ ) al comparar las frecuencias finales entre las condiciones control sin luces encendidas (NCH) y aquellas donde las babosas podían escoger los distintos colores (CH).

Las variables conductuales analizadas mostraron que las babosas no presentaron una preferencia o selección activa por el espectro azul, amarillo o verde. En cambio, el color rojo fue activamente rechazado por *E. crispata* durante estos ensayos.

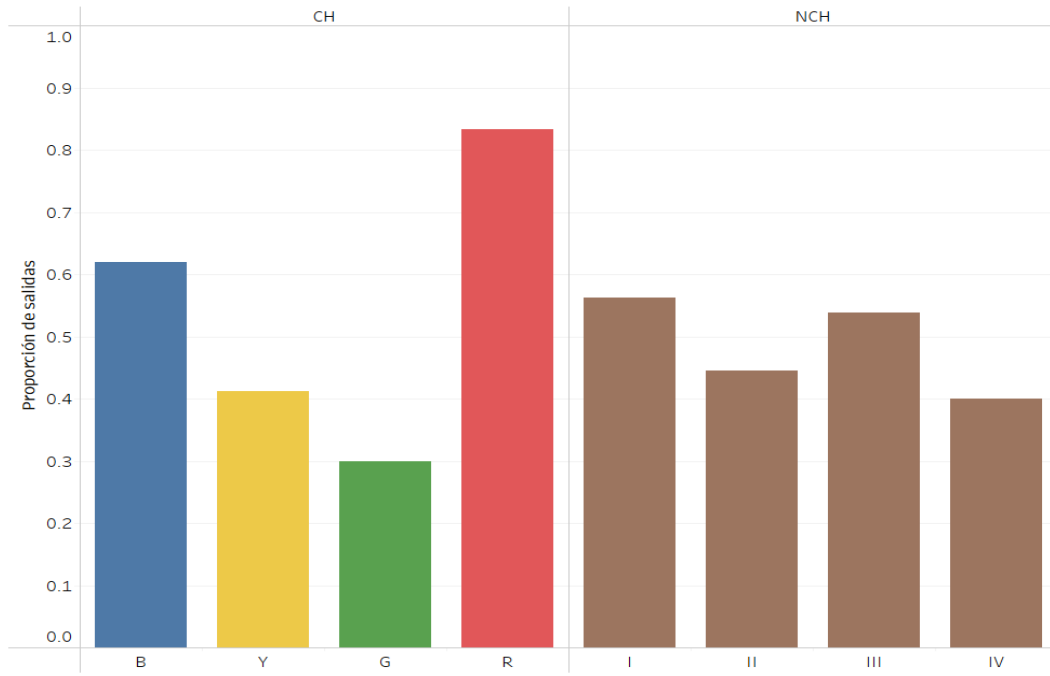


Figura 3.7. Frecuencia de muestreo (número de veces que salieron, entre el número de veces que entraron) de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 1 sobre preferencia de color. Las iniciales en CH corresponden a B=Azul, G=Verde, R=Rojo y Y=Amarillo y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz.

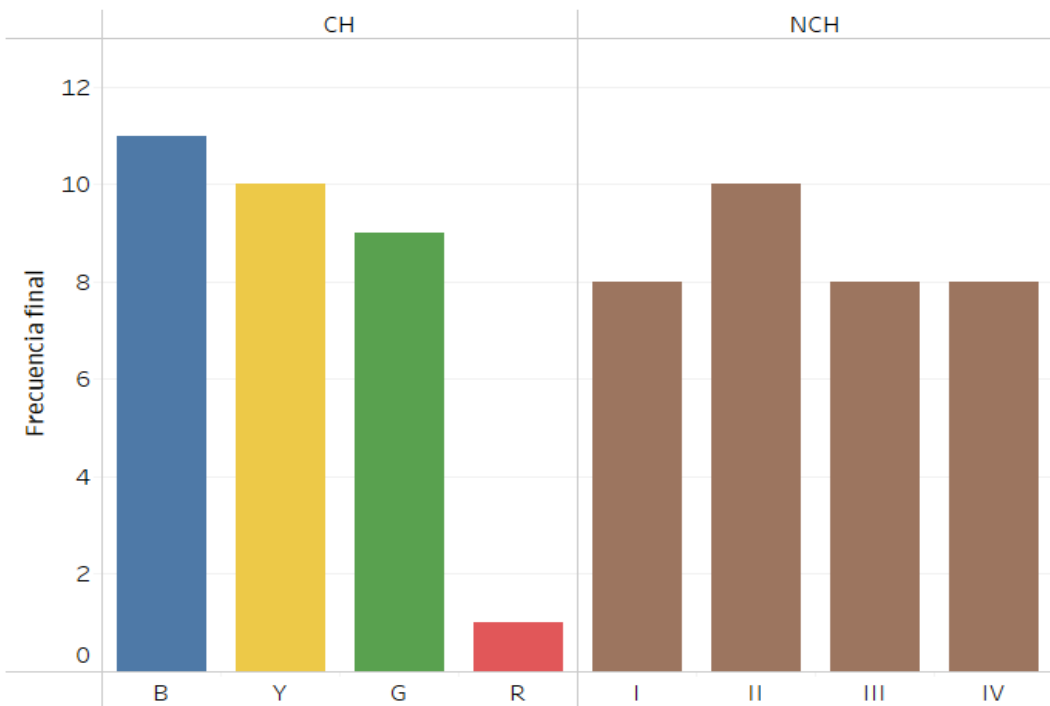


Figura 3.8. Frecuencia final de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 1 sobre preferencia de color. Las iniciales en CH corresponden a B=Azul, G=Verde, R=Rojo y Y=Amarillo y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz.

### Preferencia de la intensidad de luz

La frecuencia de primera elección en el segundo experimento mostró que 13 babosas marinas escogieron la menor intensidad como primera opción ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), seguido por ocho babosas en cada una de las intensidades de 180 y 425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y sólo tres individuos seleccionaron la intensidad de 1400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 3.9). Sin embargo, las diferencias en las frecuencias de *E. crispata* en las distintas intensidades con luces encendidas (CH) fueron estadísticamente similares a aquellas con las luces apagadas (NCH;  $G = 1.94$ ,  $g.l.= 3$ ,  $p = 0.584$ ), indicando que la primera elección no fue producto de una selección activa.

La latencia de *E. crispata* fue mayor en la intensidad lumínica más alta (1400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), pero los intervalos de esa variable en CH (0.75 a 11.41 min) y NCH (0.91 a 13.5 min), así como los promedios entre dichos tratamientos, fueron similares (Fig. 3.10a), por lo que la prueba de M-W no encontró diferencias estadísticamente significativas en esta variable entre CH y NCH de ninguna de las opciones (60:  $U = 38$ ,  $p = 0.578$ ; 180:  $U = 37$ ,  $p = 0.961$ ; 425:  $U = 40.5$ ,  $p = 0.7$ ; 1400:  $U = 3$ ,  $p = 0.4$ ).

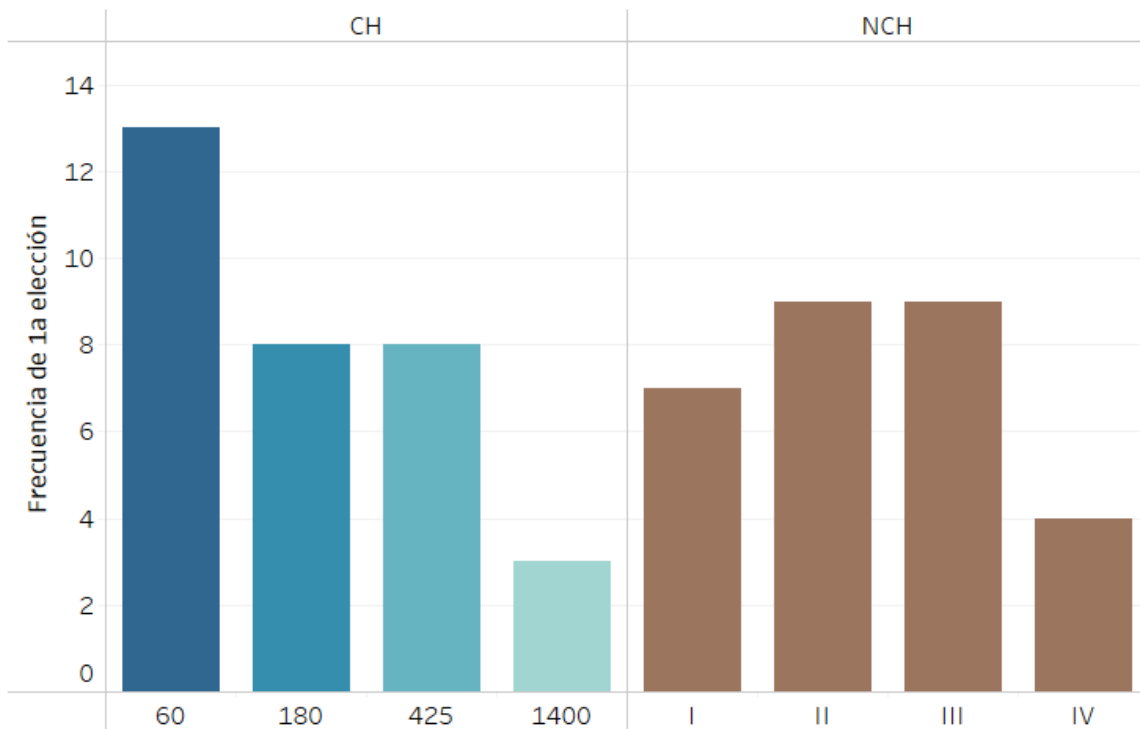


Figura 3.9. Frecuencia de la primera elección de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 2 sobre preferencia de intensidad. Las unidades de las intensidades lumínicas son  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz.

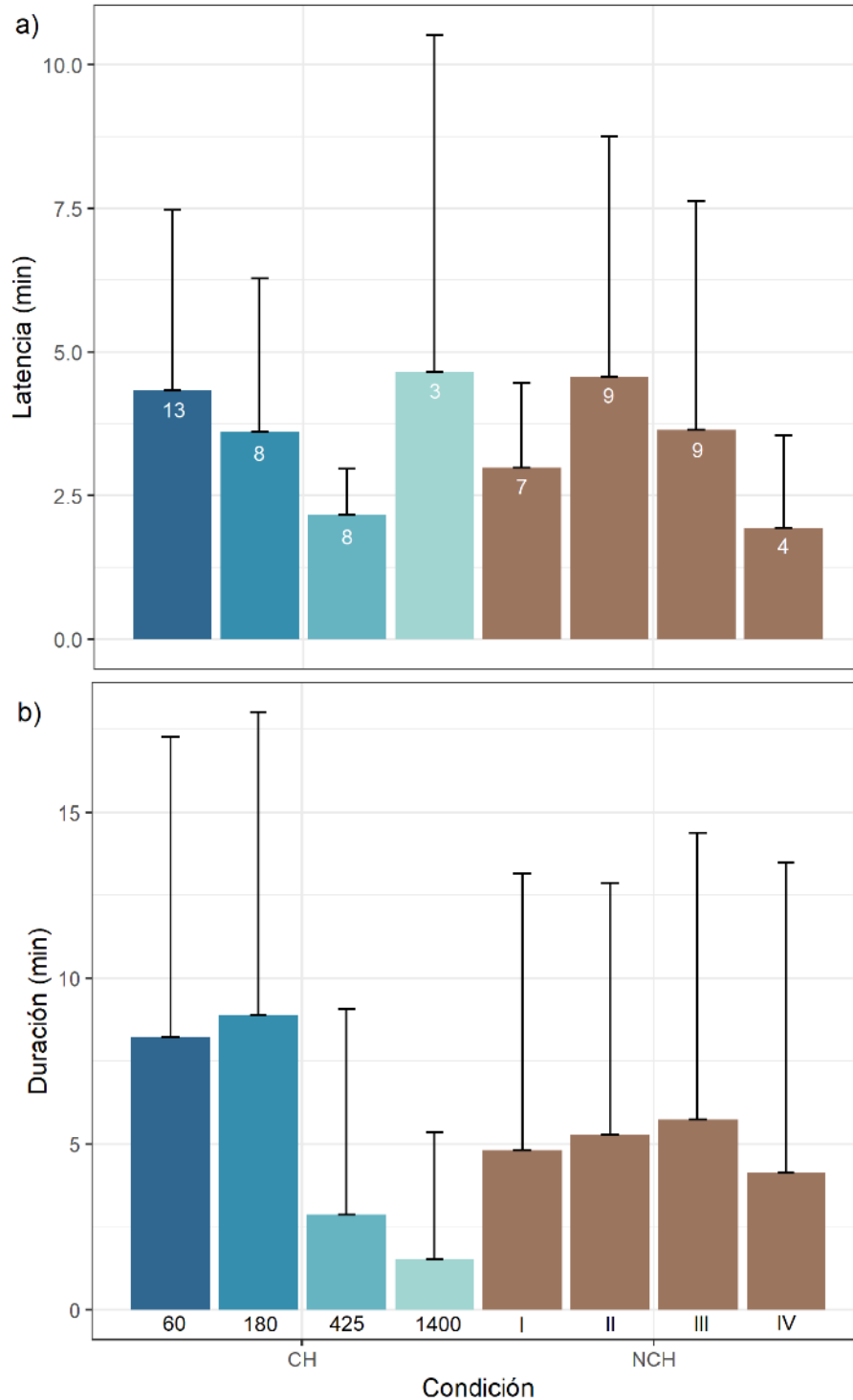


Figura 3.10. Promedio ( $\pm$  DE) de la latencia para entrar a la recámara elegida como primera opción (a) y la duración (b) de *Elysia crispata*, en condiciones de luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 2 sobre preferencia por la intensidad. Las unidades de las intensidades lumínicas son  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz. El número de babosas observada en cada recámara se muestra dentro de las barras en (a) y en (b) fue  $n = 32$  y  $n = 29$  para CH y NCH por cada recámara, respectivamente.

Por otro lado, cuando la luz estaba encendida (CH), las babosas marinas pasaron más tiempo (duración) en las dos primeras intensidades, 60 y 180  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , comparado con las intensidades 425 y 1400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , donde su tiempo promedio fue menor (Fig. 3.10b). La prueba de M-W señaló que diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que pasaron entre tratamientos (NCH y CH) existieron sólo para la menor intensidad de 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $U = 314$ ,  $p = 0.021$ ), pero no para las otras intensidades (180:  $U = 349$ ,  $p = 0.083$ ; 425:  $U = 508.5$ ,  $p = 0.475$ ; 1400:  $U = 449.5$ ,  $p = 0.789$ ).

En el experimento 2, casi el 60% de los organismos exploró más de dos opciones de intensidad lumínica en el tratamiento CH. De las babosas que entraron a las recámaras con luz de distinta intensidad (CH), una mayor proporción abandonó aquellas de alta y muy alta intensidad comparado con las recámaras de baja y media baja intensidad de luz (Fig. 3.11), y este comportamiento fue significativamente distinto del que presentaron cuando no tenían opción de escoger (NCH;  $G = 22.29$ ,  $g.l. = 10$ ,  $p < 0.05$ ).

Cuando las luces estaban encendidas (CH), la frecuencia final de babosas en la recámara de baja y media baja intensidad (60 y 180  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) fue casi seis y cinco veces mayor que en las intensidades alta y muy alta (Fig. 3.12). Sin embargo, cuando las luces estaban apagadas, la frecuencia final de las babosas fue muy similar en las recámaras correspondientes. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $G = 8.04$ ,  $g.l. = 3$ ,  $p = 0.045$ ) e indican que la preferencia final por intensidades bajas de luz (y el rechazo de las intensidades altas de luz) es el resultado de una selección activa.

En su conjunto, los resultados del experimento 2 sugieren que *E. crispata* tiene una preferencia por luz de intensidad baja de 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y que la intensidad muy alta de 1400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  es la menos preferida. Dicha preferencia es resultado de la recopilación de información sobre la cantidad de luz que las babosas obtuvieron a través del muestreo que realizaron mientras exploraban el dispositivo en los 30 minutos de duración de cada ensayo.

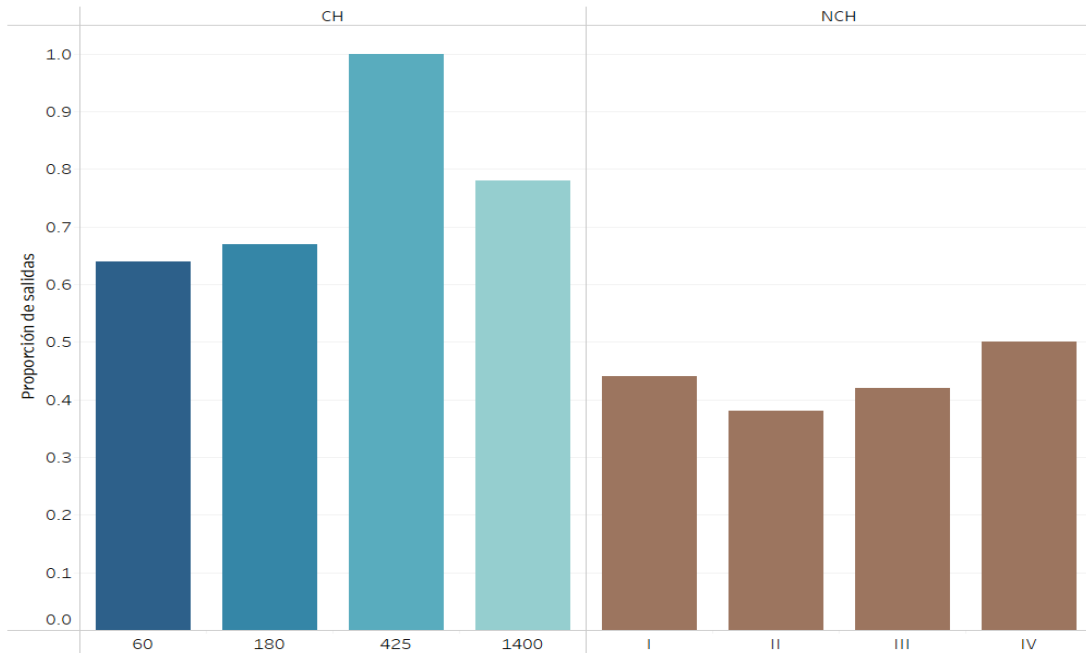


Figura 3.11. Frecuencia de muestreo (número de veces que salieron, entre el número de veces que entraron) de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 2 sobre preferencia de intensidad. Las unidades de las intensidades lumínicas son  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz.

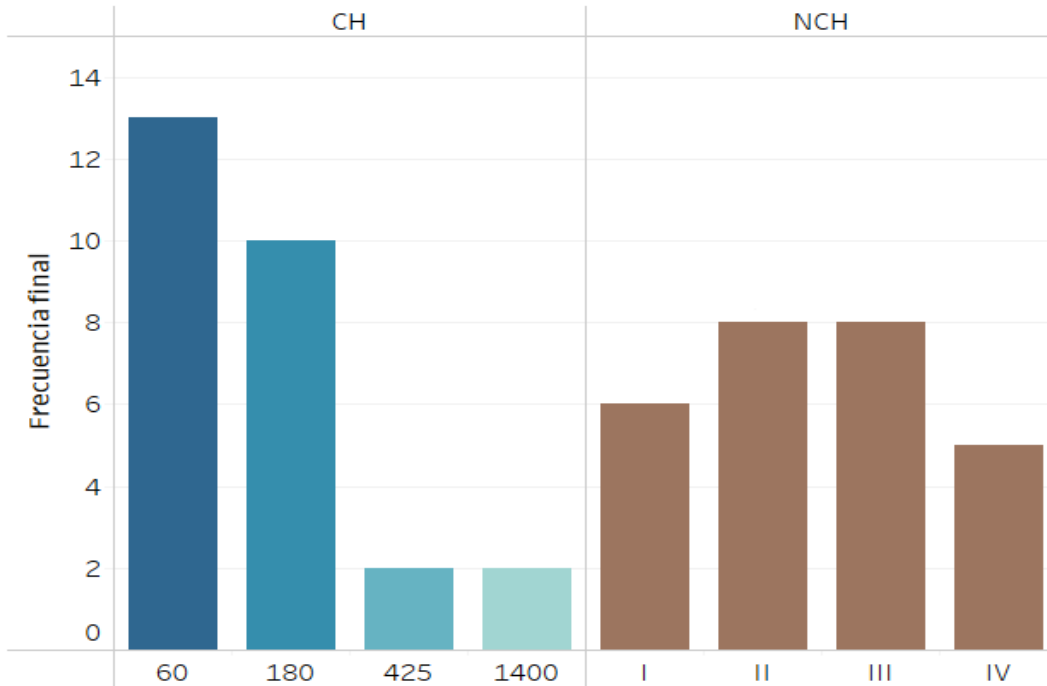


Figura 3.12. Frecuencia final de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 2 sobre preferencia de intensidad. Las unidades de las intensidades lumínicas son  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y los números I-IV corresponden a las recámaras sin luz.



## Preferencia dependiente de la aclimatación a la luz

El pretratamiento al que las babosas marinas del tercer y último experimento fueron sometidas consistió en alimentarlas con algas cultivadas a  $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que es una luz considerada de alta intensidad (HL). El análisis de la relación de los pigmentos trans-neoxantina/Clorofila *a* confirmó el estado de aclimatación a HL de *B. pennata* y *E. crispata*: los valores promedio de dicha relación en las algas cultivadas en HL fueron  $0.379 \pm 0.027$  ( $n = 2$ ), mientras que en las babosas que consumieron esas algas fueron  $0.462 \pm 0.192$  ( $n = 10$ ); al comparar estas cantidades con algas cultivadas en luz baja (LL) y babosas LL que las consumieron, los valores de dicha *ratio* fueron menores,  $0.041 \pm 0.004$  ( $n = 2$ ) y  $0.107 \pm 0.058$  ( $n = 5$ ), respectivamente (Cuadro 3.3).

Las babosas alimentadas con algas aclimatadas a HL eligieron más frecuentemente la luz HL en su primera elección cuando tenían una opción (CH) que cuando no la tenían (NCH; Fig. 3.13). Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $G = 4.18$ ;  $g.l. = 4$ ,  $p = 0.18$ ), por lo que no se puede concluir que el cambio en la primera elección de intensidad de luz haya sido producto de una selección activa.

Cuadro 3.3. Pigmentos fotosintéticos en las muestras analizadas de *Elysia crispata* después de consumir alga aclimatada a luz baja (LL) y luz alta (HL), y de *Bryopsis pennata* después de haber sido cultivada en el laboratorio en LL y HL durante al menos tres semanas. Los valores representan el promedio ( $\pm$  DE) de la relación (*ratio*) con la Chlorofila *a*. LL=  $40 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; HL =  $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . El asterisco (\*) indica el pigmento que respalda la aclimatación de los cloroplastos.

Pigmento	<i>Elysia</i> LL ( $n = 5$ )	<i>Elysia</i> HL ( $n = 10$ )	<i>Bryopsis</i> LL ( $n = 2$ )	<i>Bryopsis</i> HL ( $n = 2$ )
Sifonoxantina	$0.147 \pm 0.116$	$0.225 \pm 0.095$	$0.265 \pm 0.024$	$0.171 \pm 0.059$
all- <i>trans</i> -neoxantina*	$0.107 \pm 0.058$	$0.462 \pm 0.192$	$0.041 \pm 0.004$	$0.379 \pm 0.027$
<i>cis</i> -neoxantina	$0.278 \pm 0.067$	$0.397 \pm 0.102$	$0.213 \pm 0.018$	$0.219 \pm 0.056$
Violaxantina	$0.099 \pm 0.040$	$0.139 \pm 0.023$	$0.024 \pm 0.004$	$0.088 \pm 0.037$
Luteína	$0.272 \pm 0.217$	$0.173 \pm 0.190$	0.000	$0.049 \pm 0.017$
Zeaxantina	$0.089 \pm 0.056$	$0.075 \pm 0.050$	0.000	$0.049 \pm 0.009$
Sifonoxantina-dodecenoato	$0.102 \pm 0.074$	$0.165 \pm 0.054$	$0.149 \pm 0.004$	$0.095 \pm 0.025$
Clorofila <i>b</i>	$0.816 \pm 0.140$	$0.905 \pm 0.078$	$0.977 \pm 0.050$	$0.807 \pm 0.102$
$\beta\epsilon$ -Caroteno	$0.078 \pm 0.115$	$0.099 \pm 0.070$	$0.071 \pm 0.001$	$0.087 \pm 0.047$
$\beta\beta$ -Caroteno	$0.020 \pm 0.019$	$0.009 \pm 0.013$	0.000	$0.061 \pm 0.046$

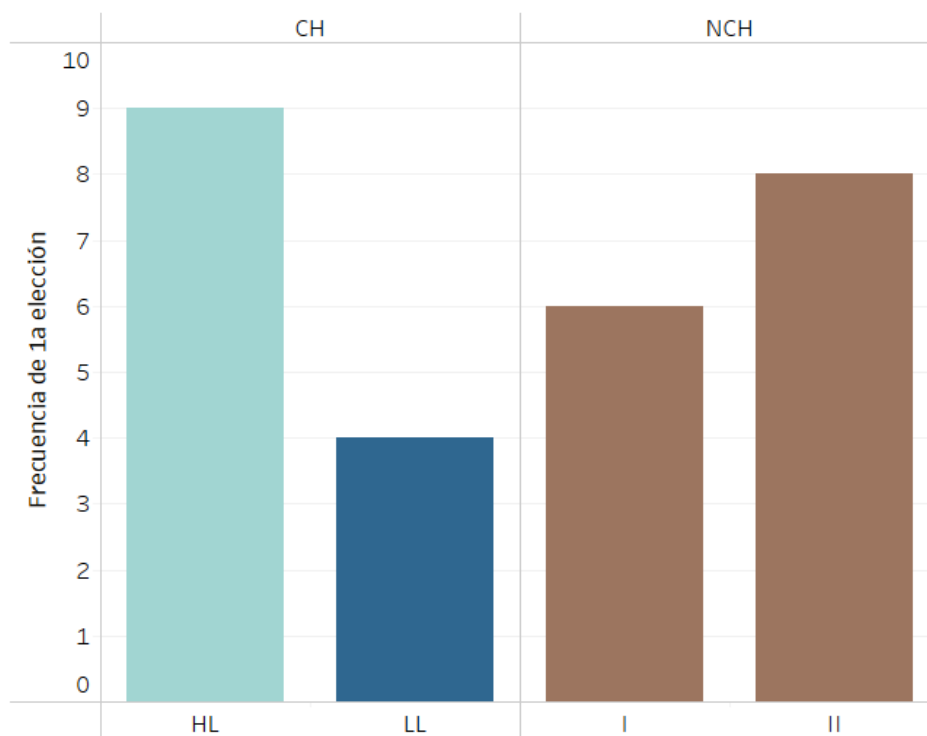


Figura 3.13. Frecuencia de la primera elección de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 3, con dos intensidades: alta (HL= 425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y baja (LL= 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los números I y II corresponden a las recámaras sin luz.

Respecto al promedio de la latencia de las babosas marinas, este fue ligeramente mayor en la condición sin luz, NCH, comparado con la condición con luz, CH (Fig. 3.14a). Los valores de CH estuvieron entre 0.95 a 13.21 min y los de NCH entre 1.5 y 26 min, lo que muestra que la variación que presentó, junto con la variable de duración, fue muy grande, como en los dos experimentos anteriores. De acuerdo con la prueba de M-W, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la latencia de HL ( $U = 31, p = 0.688$ ) ni la de LL ( $U = 19, p = 0.682$ ) entre los tratamientos (NCH y CH).

En contraste con los resultados del experimento 2, *E. crispata* pasó casi tres veces más tiempo (duración) en la intensidad alta (HL) que, en la intensidad baja (LL) durante el tratamiento CH. En el tratamiento control, NCH, la duración promedio fue muy parecida entre ambas zonas (Fig. 3.14b). Sin embargo, la prueba de M-W no detectó diferencias estadísticamente significativas en la duración de HL ( $U = 69, p = 0.295$ ) ni la de LL ( $U = 119, p = 0.167$ ) entre los tratamientos (NCH y CH).

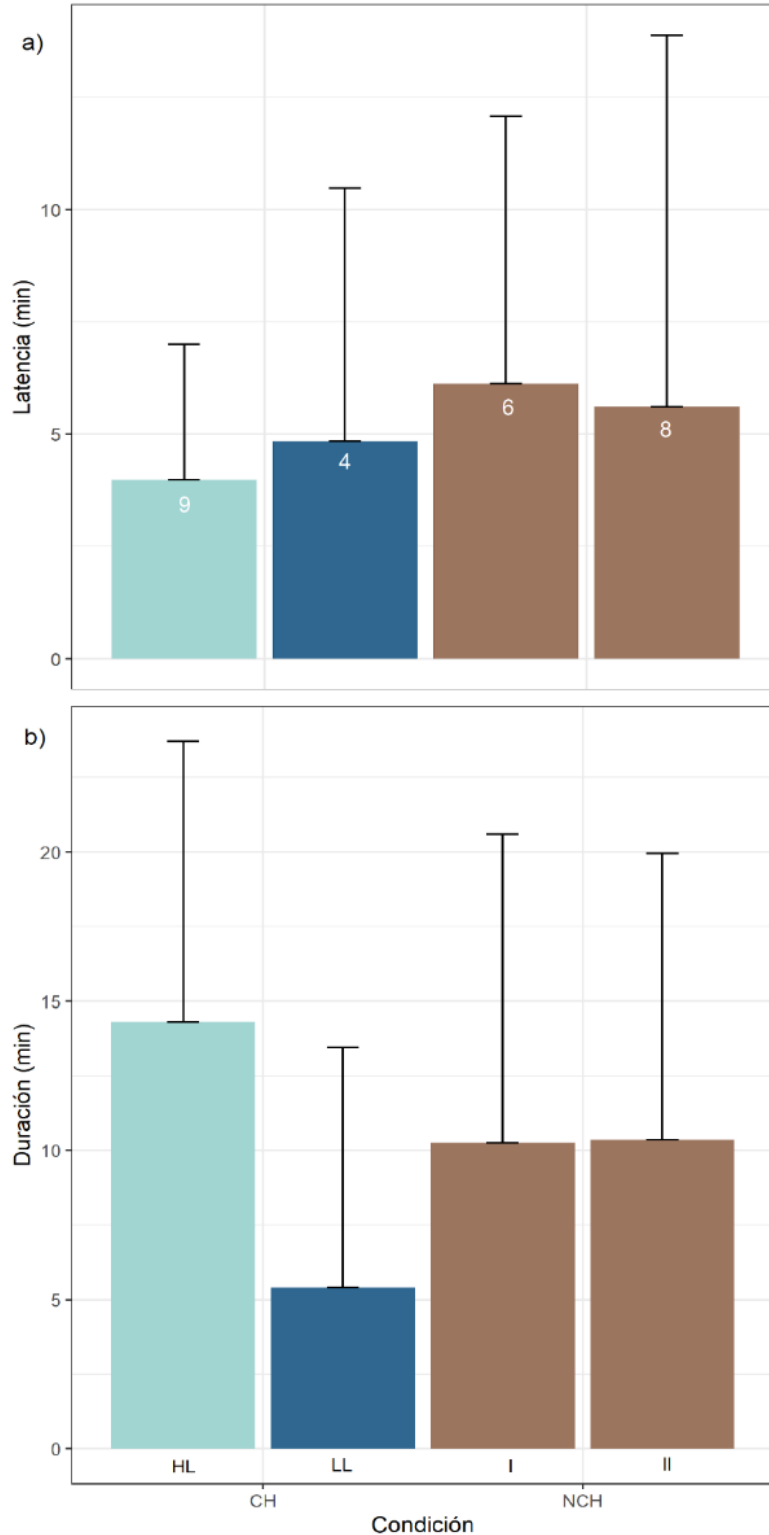


Figura 3.14. Promedio ( $\pm$  DE) de la latencia por recámara elegida como primera opción (a) y la duración (b) de *Elysia crispata*, en condiciones de luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 3, con dos intensidades: alta (HL=  $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y baja (LL=  $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los números I y II corresponden a las recámaras sin luz. El número en cada barra en (a) representa la  $n$  por recámara y, en (b) la  $n$  fue de 13 y 14 para CH y NCH por cada recámara, respectivamente.

Al igual que las babosas marinas en los otros dos experimentos, las babosas del tercer experimento también exploraron las opciones disponibles en el tratamiento CH y en este caso, el 47% de ellas regresó a la que había sido su primera elección (Fig. 3.15). Al comparar la frecuencia de muestreo en babosas alimentadas con algas aclimatadas a luz de baja (experimento 2, Fig. 3.11) y alta intensidad (experimento 3, Fig 3.15), se observó que, en las primeras, la proporción que abandonó las recámaras con alta intensidad fue mayor que las de baja intensidad en una condición de opción (CH) comparado con una condición sin opción (NCH). En contraste, cuando las babosas se habían alimentado de algas aclimatadas a luz de alta intensidad (HL), la proporción de salidas de cualquiera de los dos tipos de luz fue similar. Aunque estas diferencias no fueron confirmadas estadísticamente, se identificó una tendencia de las babosas del experimento 3 a permanecer en recámaras con alta intensidad de luz, comparado con las babosas del experimento 2.

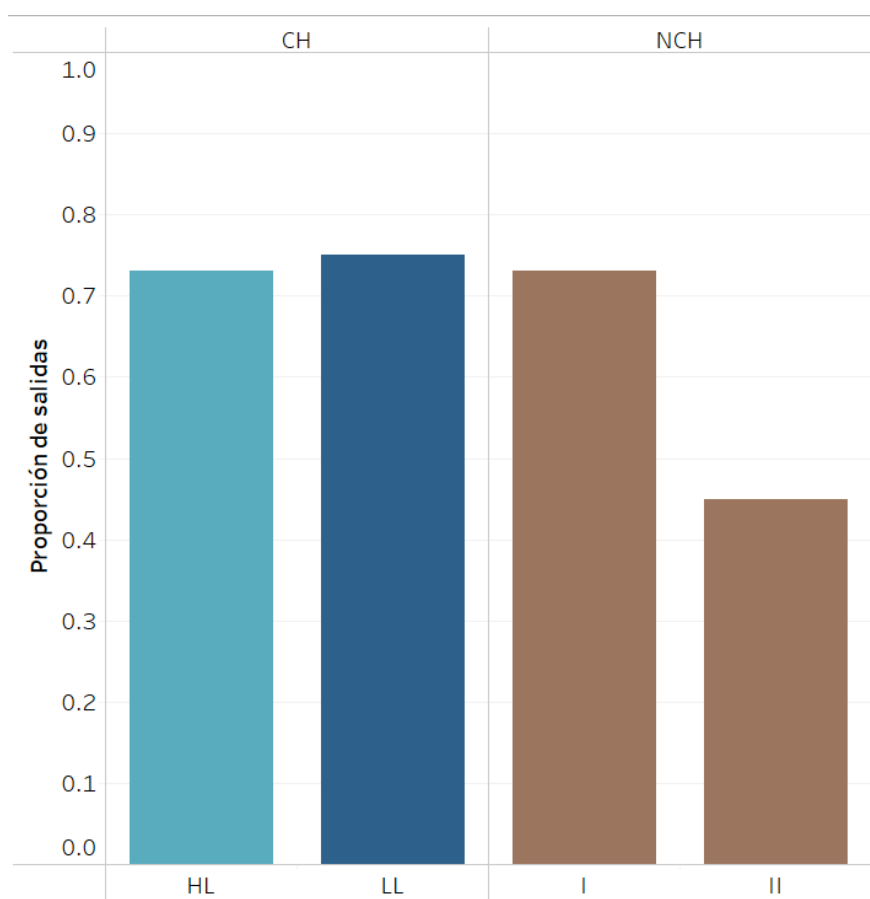


Figura 3.15. Frecuencia de muestreo (número de veces que salieron, entre el número de veces que entraron) de *Elysia crispata*, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 3, con dos intensidades: alta (HL= 425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y baja (LL= 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los números I y II corresponden a las recámaras sin luz

En la frecuencia final, las babosas alimentadas con algas aclimatadas a HL eligieron más veces la luz HL cuando podían elegir (CH) que cuando no podían hacerlo (NCH; Fig. 3.16). En cambio, las babosas que se alimentaron de algas aclimatadas a LL eligieron más frecuentemente la luz LL (Fig. 3.12); estas diferencias, mostradas en la figura 3.17, fueron estadísticamente significativas ( $G = 11.97$ ,  $g.l. = 4$ ;  $p < 0.05$ ). Las diferencias en el comportamiento entre ambos grupos de babosas sugieren una relación con la calidad de las algas que fueron consumidas.

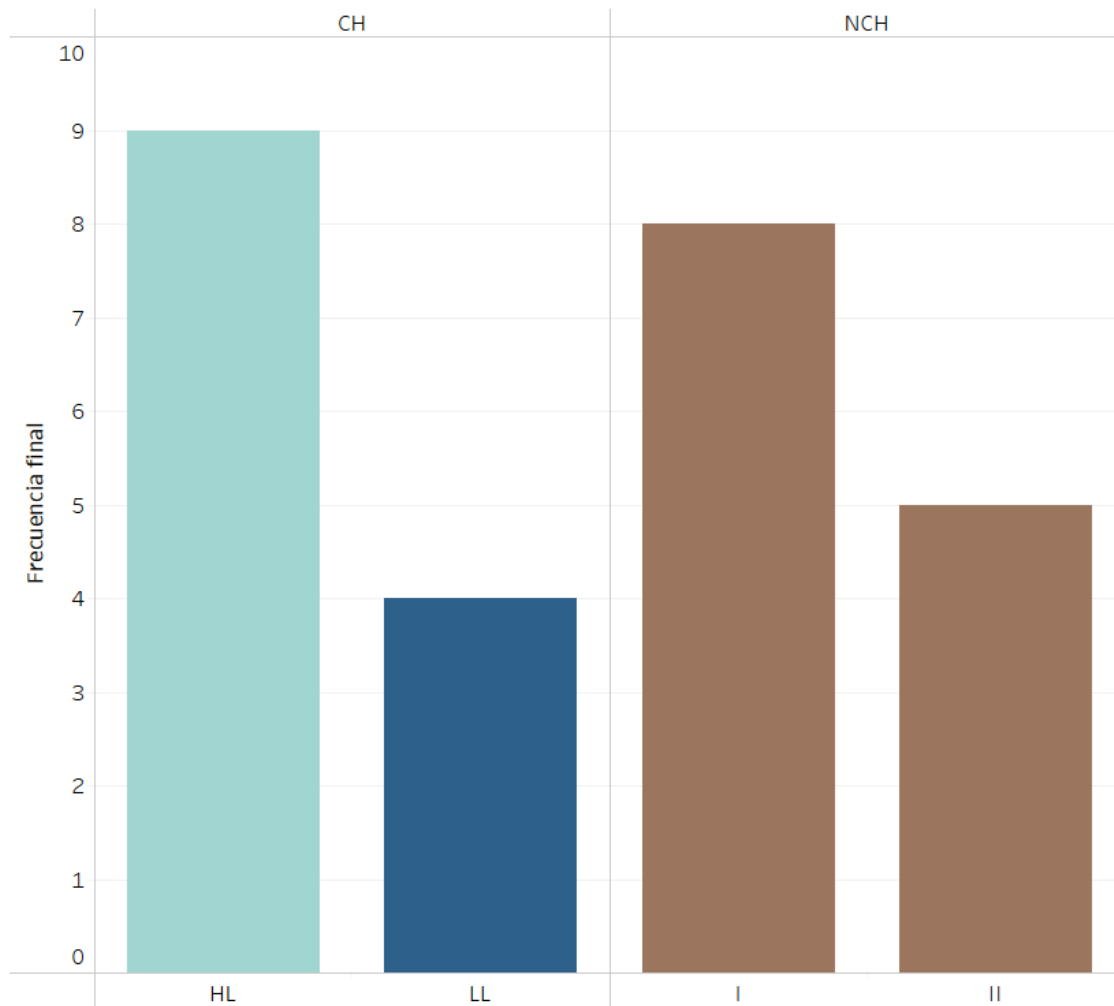


Figura 3.16. Frecuencia de *Elysia crispata* en cada zona del prototipo al finalizar los 30 min, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 3, con dos intensidades: alta (HL= 425 quanta  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y baja (LL= 60 quanta  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los números I y II corresponden a las recámaras sin luz

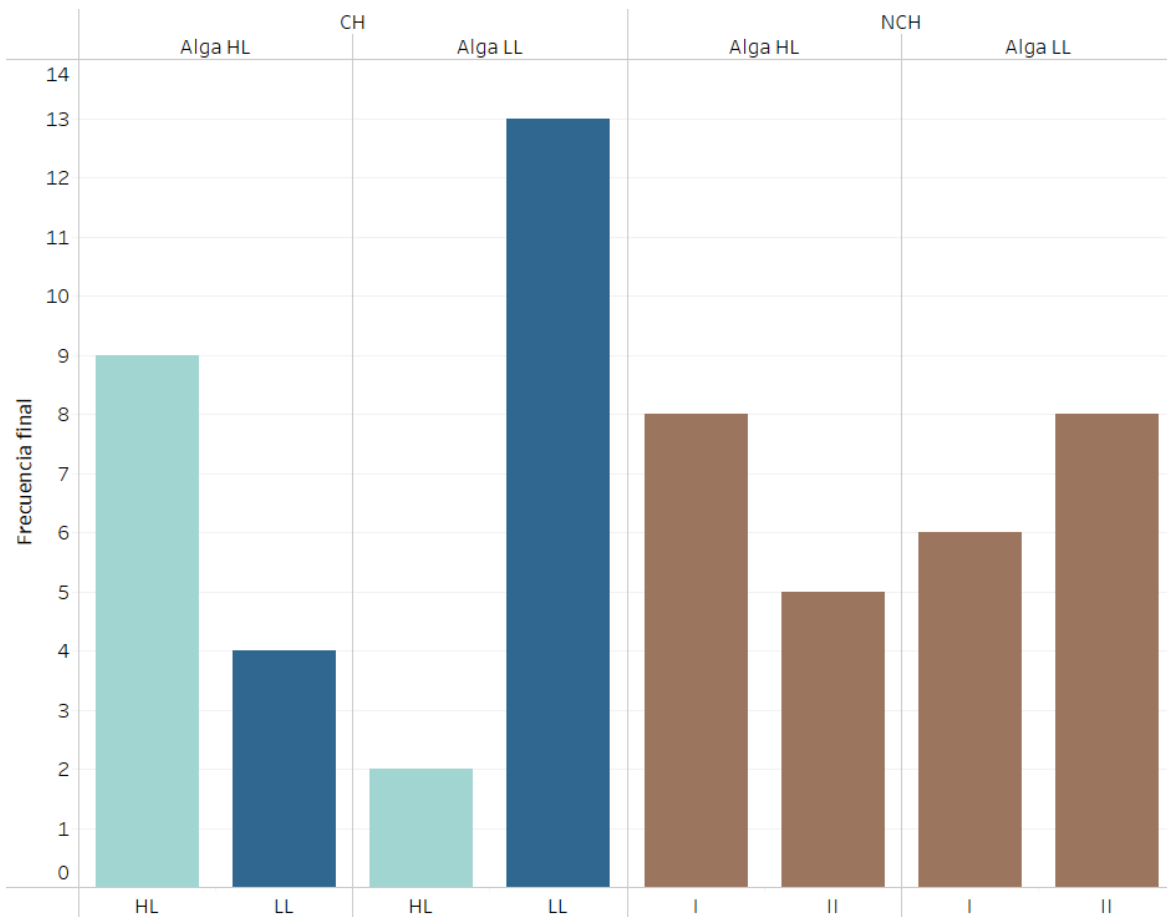


Figura 3.17. Frecuencia de *Elysia crispata* en cada zona del prototipo al finalizar los 30 min, con la luz encendida (CH) y apagada (NCH) durante el experimento 3, donde las babosas consumieron alga aclimatada a luz alta (Alga HL) y el experimento 2, donde las babosas consumieron alga aclimatada a luz baja (Alga LL), con dos intensidades: alta (HL= 425  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y baja (LL= 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Los números I y II corresponden a las recámaras sin luz

En este último experimento, todas las variables analizadas mostraron que *E. crispata* modifica su elección por la intensidad lumínica después de haber consumido alga aclimatada a luz alta HL. No obstante, sólo fue posible asociar la elección final por luz de alta intensidad a una conducta de selección activa. Los resultados en conjunto de los tres experimentos se pueden consultar en el Cuadro 3.4.

Cuadro 3.4. Resultados generales de los tres experimentos de preferencia de luz en *Elysia crispata*. En el cuadro 3.1 se puede consultar las condiciones lumínicas en los experimentos, así como de la aclimatación del alga (*Bryopsis pennata*) que las babosas consumieron. En el cuadro 3.2 se puede consultar el número total de organismos utilizados para los análisis estadísticos. Se muestran las opciones que tuvieron los valores mayores y menores en las cinco variables de respuesta en cada experimento. Se indica si la prueba estadística (PE) fue no significativa (ns) o significativa (\*) en alguno de los análisis para cada variable. Las unidades de las intensidades de luz ( $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) del Experimento 2 no fueron incluidas para disminuir el texto. HL: alta intensidad ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), LL: baja intensidad ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Variable de respuesta	Experimento 1: Espectro			Experimento 2: Intensidad			Experimento 3: Aclimatación de algas		
	Mayor	Menor	PE	Mayor	Menor	PE	Mayor	Menor	PE
Frecuencia 1ª elección	azul	rojo	ns	60	1400	ns	HL	LL	ns
Frecuencia muestreo	rojo	verde	ns	425	60	*	LL	HL	
Frecuencia final	azul	rojo	ns	60	425/1400	*	HL	LL	*
Latencia	rojo	verde	*	1400	425	ns	LL	HL	ns
Duración	amarillo	rojo	*	60	1400	*	HL	LL	ns

## Discusión

Los resultados de este trabajo indicaron que la cantidad y calidad de la luz es relevante para el comportamiento de *E. crispata*. Los cambios de luz a los que estas babosas marinas fueron expuestas en el laboratorio simulan de cierta forma lo que ocurre en su hábitat; sin embargo, debe tenerse en consideración que las condiciones fueron estables en los experimentos en comparación con el ambiente cambiante en el que viven. Distintos espectros e intensidades de luz están disponibles en el ambiente debido a las modificaciones que ocurren a lo largo del día, pero también por las distintas profundidades en el medio acuático (Kirk 2011).

En el océano, las longitudes de onda larga, que corresponden al color rojo (~650 nm), se absorben en las profundidades menores y sólo casi el 1% llega a los 10 m en aguas translúcidas, mientras que las longitudes de onda corta son las últimas en absorberse y, por ello, el color azul (~450 nm) es el último en desaparecer a profundidades mayores (Lalli y Parsons 1997). El rojo (~665 nm) fue el espectro menos preferido por esta especie, aun cuando los organismos de los experimentos provenían de una zona donde las longitudes de onda larga probablemente estaban disponibles, ya que fueron recolectados a < 3 m de profundidad. No obstante, en el artículo II de este estudio se sugirió que estos animales tienen cierta movilidad en el arrecife, por lo que las longitudes de onda largas podrían

representar una señal para moverse debido a los cambios durante el día; para detectar ese tipo de señales requerirían tener fotorreceptores de distintas longitudes de onda.

Los animales pueden percibir distintas longitudes de onda de la luz debido a las propiedades de absorción del espectro de los pigmentos que se encuentran en sus fotorreceptores (Stavenga 2010). Estas propiedades definen la sensibilidad espectral máxima o máxima absorbancia del espectro ( $\lambda$  máx), que es el pico o intervalo en el que un fotorreceptor extrae la información de las longitudes de onda sin depender de la intensidad de la luz y con ello, delimita las longitudes de onda que los organismos podrán detectar (Menzel 1979). En la mayoría de los moluscos en los que se ha estudiado, esta sensibilidad se encuentra entre los 470 y 510 nm (Hughes 1970, Menzel 1979). Los gasterópodos, el grupo de moluscos al que pertenece *E. crispata*, pueden tener de dos a cuatro tipos de fotorreceptores, pero sólo se ha encontrado un fotopigmento asociado a ellos, la rodopsina (Menzel 1979). Esto explicaría su sensibilidad y los resultados del primer experimento, ya que este pigmento tiene su absorción máxima en el verde-azul (450-550 nm), aunque puede variar dependiendo del invertebrado porque existen distintos tipos de rodopsinas (Stavenga 2010). Anteriormente, Weaver y Clark (1981) encontraron que *E. crispata* tiene preferencia por el color amarillo y que el rojo es el menos preferido, lo que parcialmente coincide con los resultados de este trabajo. Además, las observaciones en su hábitat (ver artículo II), que respaldaron la existencia de ritmos circadianos en esta especie, coinciden con los resultados de los experimentos. Posiblemente, ciertos fotorreceptores existen en esta especie de babosa marina para detectar los diferentes tipos y cantidades de luz.

Es común que los invertebrados marinos posean fotorreceptores extraoculares y en babosas marinas como *Melibe leonina* y *Aplysia californica* se han encontrado en el manto, distintos ganglios y los tentáculos orales (Lickey *et al.* 1976, Menzel 1979, Newcomb *et al.* 2014); en *A. californica* dichos fotorreceptores tienen valores de  $\lambda$  máx 500-550 nm (verde-azul) (Menzel 1979), y posiblemente son sensibles al rojo (Lickey *et al.* 1976). La única babosa marina sacoglósica donde estos elementos se han estudiado es *E. timida* y posiblemente tiene tres fotorreceptores: 1) los ojos, que distinguen las intensidades de luz adecuadas o excesivas, 2) un fotorreceptor extraocular que diferencia entre la luz y oscuridad y por último 3) otro fotorreceptor extraocular que, así como los ojos, distingue intensidades de luz adecuadas pero sólo en luz “blanca” (Rahat y Monselise 1979). Los autores de ese trabajo encontraron que los ojos perciben luz sólo a 540 nm (verde) en esa especie, por lo que sugirieron que deben tener pigmentos carotenoides fotoreactivos;



también, reportaron que no detectaron una reacción a la luz en longitudes de onda de 445 y 650 nm (azul y rojo, respectivamente). Lo anterior indica que otra especie del mismo género no tiene la capacidad de detectar la luz roja y, de suceder lo mismo en *E. crispata*, durante los experimentos pudo haber percibido ausencia de luz en lugar del rojo, lo que generó un rechazo a esa recámara.

En el experimento 2, *E. crispata* consumió alga aclimatada a intensidades de 40  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y prefirió la intensidad baja, 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La elección de esta especie por intensidades bajas podría estar relacionada a que un exceso de luz le genera un daño a los cloroplastos que retiene (Vieira *et al.* 2009, Jesus *et al.* 2010), o al mismo animal. Los arrecifes coralinos del Caribe pueden tener intensidades lumínicas de hasta 2,500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en la superficie, dependiendo de la temporada del año (Vermeij y Bak 2002). Durante el experimento 2 se ofrecieron valores que pueden existir en el hábitat de *E. crispata*; por ejemplo, en el arrecife del sur del Golfo de México donde esta especie fue recolectada, la máxima intensidad que se registró fue casi  $\sim 1,260 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y el promedio fue de  $\sim 245 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (datos del artículo II de este trabajo). Este es el primer estudio que ofrece una intensidad de luz tan alta (1,400  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) en un experimento de preferencia lumínica (Weaver y Clark 1981, Miyamoto *et al.* 2015, Cartaxana *et al.* 2018), por lo que se sugiere que al realizar trabajos experimentales de este tipo en un futuro se considere el intervalo más amplio posible que presenta el ambiente donde se encuentran los sujetos de estudio.

En este trabajo se encontró que la intensidad que prefiere *E. crispata* (60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) es menor a lo encontrado por Weaver y Clark (1981), 200-300  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Los acuarios de mantenimiento se mantuvieron en  $\sim 100 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en ambos estudios, pero la aclimatación del alga que consumieron fue distinta; además, los resultados diferentes podrían atribuirse a que usaron un diseño experimental distinto y una población cultivada en el laboratorio. No obstante, ambos resultados reflejan que esta especie prefiere intensidades menores a la intensidad de luz adecuada para que sus cloroplastos realicen la fotosíntesis, que es de 500  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Taylor 1971). Esta diferencia entre la intensidad preferida y la óptima para la fotosíntesis podría relacionarse a que los cloroplastos de los organismos de *E. crispata* que analizó Taylor (1971) tenían pigmentos con fotoprotección, ya que las babosas fueron recolectadas en una planicie arrecifal de Jamaica. Posiblemente, los cloroplastos provenían de distintos grupos de algas, como se ha mostrado en poblaciones de otros arrecifes y ambientes (Middlebrooks *et al.*

2019, Vital *et al.* 2021), e incluso los organismos de cada estudio tenían aclimataciones a la luz y condiciones de mantenimiento distintas (por ej. temperatura), lo que seguramente influyó en los resultados.

Los valores de la intensidad preferida y la óptima para la fotosíntesis dependerán de cada especie, ya que por ejemplo, *Elysia hamatanni*, *Elysia trisinuata* y *Plakobranthus ocellatus* han mostrado preferencia por estar expuestas a intensidades lumínicas de 200-300  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que son las mismas intensidades en las que maximizan su fotosíntesis (Weaver y Clark 1981, Miyamoto *et al.* 2015). *Elysia viridis* prefiere intensidades de 40  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Cartaxana *et al.* 2018) y su retención de cloroplastos es severamente afectada en intensidades 3.5 veces mayores (Vieira *et al.* 2009), mientras que *E. crispata* también puede elegir intensidades de 180  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Figs. 3.10 y 3.12), que es tres veces mayor a 60  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Esta respuesta a la luz y su relación con la fotosíntesis dependerá de los tipos de alga que consuman, los pigmentos que esas algas contengan y con la presencia de mecanismos de fotoprotección. Es posible que *E. crispata* elige intensidades lumínicas menores para disminuir el estrés lumínico. En futuras investigaciones sería importante tener más mediciones de la intensidad de luz que es óptima para que los cleptoplastos de esta babosa marina realicen la fotosíntesis.

Para sobrellevar los excesos de luz en su ambiente, las babosas marinas sacoglosas tienen conductas en las que cubren su dorso para disminuir la cantidad de luz que reciben; estas son consideradas un elemento de fotoprotección. Las prolongaciones del dorso que tiene el género *Elysia*, denominados parapodios, proveen una sombra a los cleptoplastos del exceso de la luz de acuerdo con lo estudiado en *E. timida* y *E. viridis* (Schmitt y Wägele 2011, Cartaxana *et al.* 2018, 2019). En las especies mencionadas, la aclimatación de los cleptoplastos, es decir, el estado fisiológico que tienen estos organelos con respecto a la luz, definió la apertura y cierre de parapodios; en *E. viridis*, también influyó en su preferencia a la luz (Cartaxana *et al.* 2018, 2019). En estudios preliminares de este proyecto, donde inicialmente se probaría esta conducta también, la reacción de cierre de parapodios en *E. crispata* con respecto a altas intensidades lumínicas también se observó, por lo que es un tema que podría indagarse a futuro. Los resultados del tercer experimento, donde existió un cambio en la conducta de *E. crispata* después de consumir algas con distintas aclimataciones, señalan que otro comportamiento que podría implicar fotoprotección es el moverse a un lugar con menor intensidad lumínica.

Un componente fundamental para la fotosíntesis que, además representa un fotoreceptor en organismos autótrofos, es el conjunto de pigmentos fotosintéticos (Croce y Van Amerongen 2014). Los pigmentos de las algas sifonales (la principal fuente de alimento de *Sacoglossa*) y, por ende, de los cleptoplastos que secuestran las babosas marinas sacoglosas, se componen principalmente por sifonoxantina y sifoneína, que son carotenoides (Wang *et al.* 2013, Marques *et al.* 2021). Estos pigmentos, particularmente eficientes en absorber la luz verde (510-550 nm) y azul-verde (470-510 nm), están en el género de algas *Bryopsis* (Wang *et al.* 2013). La aparente falta de decisión en la preferencia por el verde, azul y amarillo que se encontró en este estudio podría explicarse porque *E. crispata* consumió *Bryopsis* durante los experimentos, pero también porque la sifonoxantina y la sifoneína se han encontrado en los cleptoplastos de estas babosas marinas en su hábitat, incluso a profundidades de hasta 12 m (Vital *et al.* 2021).

Los pigmentos fotosintéticos mencionados podrían ser un tipo de fotoreceptor para esta especie de babosa marina. La absorbancia máxima ( $\lambda$  máx) en azul y verde les permitiría explotar un mayor intervalo dentro de todas las longitudes de onda que tienen disponibles en su ambiente y con ello, otros microhábitats. Sin embargo, en aquellos organismos que poseen este grupo de pigmentos, no es claro cómo es que enfrentan los daños por la luz excesiva en los ambientes que habita, ya que no tienen un ciclo de fotoprotección como el de las xantófilas, que se presenta en otras algas verdes y las plantas (Marques *et al.* 2021). Por ello, *E. crispata* podría estar evitando las intensidades lumínicas más altas (resultados del segundo experimento) y cambiar su conducta dependiendo de la aclimatación de las algas que consume.

Existió una gran variación en el comportamiento de *E. crispata* en todos los experimentos, como lo muestran las desviaciones estándar de la latencia y duración (Figs. 3.6, 3.10, 3.14). La conducta exploratoria de *E. crispata* podría atribuirse a la movilidad que tiene en su ambiente (Vital *et al.* 2023) y a la fototaxia positiva (movimiento hacia la luz) que posee y que ha sido reportada en otras babosas marinas sacoglosas; las especies con cleptoplastía de retención longeva suelen explorar más comparado con las de retención corta o nula (Schmitt y Wägele 2011, Miyamoto *et al.* 2015, Cartaxana *et al.* 2018). La biología particular de las especies es un factor que debe tomarse en cuenta para este tipo de estudios en un futuro, ya que la fototaxia también se ha reportado en otras babosas marinas sin cleptoplastía (Hughes 1970) y las diferencias entre especies no necesariamente podrían estar relacionadas con la diferencia en los tiempos de retención de cleptoplastos.

También sería interesante evaluar el comportamiento de organismos “albinos” que no retienen estos organelos, como algunos que se han registrado de *E. crispata* (Cartaxana *et al.* 2022).

La variación de cada especie debe corresponder a la naturaleza de cada una, ya que en *E. crispata* también se ha reportado mucha variabilidad en su composición de pigmentos y ácidos grasos (Vital *et al.* 2021). La plasticidad que tienen en sus hábitos alimentarios y distribución en distintos ambientes y profundidades (Middlebrooks *et al.* 2014, 2019), podría ocurrir también en su conducta. Es importante que en experimentos de esta índole, las comparaciones entre especies tomen esto en consideración y, también usen controles en los que analizan el comportamiento u otro aspecto de la misma especie con la señal que se quiere probar y sin ella (Weaver y Clark 1981, Miyamoto *et al.* 2015, Cartaxana *et al.* 2018).

Algo a considerar en trabajos futuros es que la frecuencia final, la frecuencia de primera elección y la latencia no resultaron tan buenos indicadores de conducta de selección activa en estas babosas marinas debido a que, en general, tuvieron un comportamiento donde exploraron mucho durante los tres experimentos y las variables mencionadas representan un solo momento del ensayo; el tiempo ofrecido (30 min) tal vez no fue suficiente para que definieran su elección. La duración y la frecuencia de muestreo, que reflejan su actividad durante el desarrollo de todo el ensayo, pueden evaluar mejor su comportamiento, ya que con la primera variable podemos notar en qué condición elige pasar más tiempo y con la segunda se observa de todas las veces que probó cada opción, la proporción en la que eligió quedarse en ella u optar por otra (Figs. 3.7, 3.11, 3.15).

A pesar de notar ciertos contrastes en las frecuencias, duraciones y latencias entre opciones de luces ofrecidas en los tres experimentos, no todas las variables tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (NCH y CH; Cuadro 3.4); sólo la latencia y la duración del experimento 1 (espectro), la duración, la frecuencia de muestreo y la frecuencia final del experimento 2 (intensidades) y, la frecuencia final del experimento 3 (aclimatación). Lo anterior indica que, a excepción del experimento 2, la selección de las babosas marinas muy probablemente no fue activa, es decir, la existencia de otras opciones no influyó en su elección y eligen de forma oportunista, aprovechando las alternativas lumínicas disponibles. Lo anterior se podría explicar con lo mencionado por Vital *et al.* (2021, 2023), donde se encontró que la composición de sus biomoléculas no varía con la profundidad y se mueven en su hábitat arrecifal.

Los resultados de este trabajo indicaron que el rojo (~665 nm) es el espectro menos preferido por *E. crispata* y que prefiere intensidades lumínicas bajas ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), por lo que la cantidad y tipo de luz es relevante para su comportamiento. Las babosas marinas aumentaron su frecuencia y duración en las intensidades altas después de ser alimentadas con algas que fueron aclimatadas a esa intensidad de la luz, indicando un cambio en su elección dependiendo de la condición de aclimatación de las algas. No obstante, los análisis estadísticos sólo respaldaron que su selección fue activa en una variable, la frecuencia final. A pesar de que, por lo anterior, la hipótesis de este trabajo fue respaldada parcialmente, se notó un patrón claro en el que las babosas marinas cambiaron su elección de intensidades bajas ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a altas ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). El uso de distintas variables es importante para evaluar la conducta, siempre que sea posible (Martin y Bateson 2007), pero la duración se propone como la variable más adecuada para analizar la preferencia de *E. crispata*, que presenta una alta variación y conducta exploratoria. El dispositivo, al igual que el diseño experimental usado considerando las limitaciones descritas arriba, se sugieren como una buena opción para estudiar la preferencia de babosas marinas. Posiblemente, *E. crispata* posee distintos tipos de fotorreceptores además de los ojos, para detectar los cambios de luz y, los pigmentos fotosintéticos de sus cleptoplastos podrían representar uno de ellos.

## Literatura citada

- Andersen, R.A. 2005. Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press.
- Begon, M., C. Townsend y J.L. Harper. 2006. Ecology: From individuals to ecosystems. Blackwell Publishing.
- Bielczynski, L.W., G. Schansker y R. Croce. 2016. Effect of light acclimation on the organization of photosystem II super- and sub-complexes in *Arabidopsis thaliana*. Front. Plant Sci. 7: 1–12.
- Cartaxana, P., D. Lopes, B. Martinez, P. Martins y S. Cruz. 2022. Aposymbiotic specimen of the photosynthetic sea slug *Elysia crispata*. Diversity 14: 0–2.
- Cartaxana, P., L. Morelli, B. Jesus, G. Calado, R. Calado y S. Cruz. 2019. The photon menace: Kleptoplast protection in the photosynthetic sea slug *Elysia timida*. J. Exp. Biol. 222: 3–6.
- Cartaxana, P., L. Morelli, C. Quintaneiro, G. Calado, R. Calado y S. Cruz. 2018. Kleptoplasts photoacclimation state modulates the photobehaviour of the solar-powered sea slug *Elysia viridis*. J. Exp. Biol. 221: 1–23. DOI:10.1242/jeb.180463
- Cartaxana, P., F. Rey, C. LeKieffre, D. Lopes, C. Hubas, J.E. Spangenberg, S. Escrig, B. Jesus, G. Calado, R. Domingues, M. Kühl, R. Calado, A. Meibom y S. Cruz. 2021. Photosynthesis from stolen chloroplasts can support sea slug reproductive fitness. Proc. R. Soc. B 288: 20211779.
- Cartaxana, P., E. Trampe, M. Kühl y S. Cruz. 2017. Kleptoplast photosynthesis is nutritionally relevant in the sea slug *Elysia viridis*. Sci. Rep. 7: 7714.
- Croce, R. y H. Van Amerongen. 2014. Natural strategies for photosynthetic light harvesting. Nat. Chem. Biol. 10: 492–501.
- Cruz, S. y P. Cartaxana. 2022. Kleptoplasty: Getting away with stolen chloroplasts. PLoS Biol. 20: 1–14.
- Cruz, S., P. Cartaxana, R. Newcomer, G. Dionísio, R. Calado, J. Serôdio, K.N. Pelletreau y M.E. Rumpho. 2015. Photoprotection in sequestered plastids of sea slugs and respective algal sources. Sci. Rep. 5: 1–8.
- Cruz, S., C. LeKieffre, P. Cartaxana, C. Hubas, N. Thiney, S. Jakobsen, S. Escrig, B. Jesus, M. Kühl, R. Calado y A. Meibom. 2020. Functional kleptoplasts intermediate incorporation of carbon and nitrogen in cells of the Sacoglossa sea slug *Elysia viridis*. Sci. Rep. 10: 1–12.
- Curtis, N.E., S.E. Massey y S.K. Pierce. 2006. The symbiotic chloroplasts in the sacoglossan *Elysia clarki* are from several algal species. Invertebr. Biol. 125: 336–345.

- Dionísio, G., R. Rosa, M.C. Leal, S. Cruz, C. Brandão, G. Calado, J. Serôdio y R. Calado. 2013. Beauties and beasts: A portrait of sea slugs aquaculture. *Aquaculture* 408–409: 1–14.
- Dorrell, R.G. y C.J. Howe. 2012. What makes a chloroplast? Reconstructing the establishment of photosynthetic symbioses. *J. Cell Sci.* 125: 1865–1875.
- Havurinne, V. y E. Tyystjärvi. 2020. Photosynthetic sea slugs induce protective changes to the light reactions of the chloroplasts they steal from algae. *Elife* 9: 1–40.
- Hughes, H.P.I. 1970. The spectral sensitivity and absolute threshold of *Onchidoris fusca* (Müller). *J. Exp. Biol.* 52: 609–618.
- Jackson, A.C. y A.J. Underwood. 2007. Application of new techniques for the accurate analysis of choice of prey. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 341: 1–9.
- Jesus, B., P. Ventura y G. Calado. 2010. Behaviour and a functional xanthophyll cycle enhance photo-regulation mechanisms in the solar-powered sea slug *Elysia timida* (Risso, 1818). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 395: 98–105.
- Kirk, J.T.O. 2011. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press, New York.
- Krug, P.J., J.E. Vendetti y Á. Valdés. 2016. Molecular and morphological systematics of *Elysia* Risso, 1818 (Heterobranchia: Sacoglossa) from the Caribbean region. *Zootaxa* 4148: 1–137.
- Lalli, C.M. y T.R. Parsons. 1997. Biological oceanography, an introduction. The Open University, Burlington, USA.
- Lickey, M.E., G.D. Block, D.J. Hudson y J.T. Smith. 1976. Circadian oscillators and photoreceptors in the gastropod, *Aplysia*. *Photochem. Photobiol.* 23: 253–273.
- Liszka, D. y A.J. Underwood. 1990. An experimental design to determine preferences for gastropod shells by a hermit-crab. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 137: 47–62.
- Marques, R., S. Cruz, R. Calado, A. Lillebø, H. Abreu, R. Pereira, B. Pitarma, J.M. da Silva y P. Cartaxana. 2021. Effects of photoperiod and light spectra on growth and pigment composition of the green macroalga *Codium tomentosum*. *J. Appl. Phycol.* 33: 471–480.
- Martin, P. y P. Bateson. 2007. Measuring behaviour: An introductory guide. Cambridge University Press, New York.
- Mascaró, M., L. Rodríguez-Pestaña, X. Chiappa-Carrara y N. Simões. 2012. Host selection by the cleaner shrimp *Ancylomenes pedersoni*: Do anemone host species, prior experience or the presence of conspecific shrimp matter? *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 413: 87–93.
- Melo Clavijo, J., A. Donath, J. Serôdio y G. Christa. 2018. Polymorphic adaptations in metazoans to establish and maintain photosymbioses. *Biol. Rev.* 93: 2006–2020.

Menzel, R. 1979. Spectral sensitivity and color vision in invertebrates, p. 503–580. In H. Autrum (ed.). Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates. Springer-Verlag, Berlin.

Middlebrooks, M.L., S.S. Bell, N.E. Curtis y S.K. Pierce. 2014. Atypical plant-herbivore association of algal food and a kleptoplastic sea slug (*Elysia clarki*) revealed by DNA barcoding and field surveys. *Mar. Biol.* 161: 1429–1440.

Middlebrooks, M.L., N.E. Curtis y S.K. Pierce. 2019. Algal sources of sequestered chloroplasts in the sacoglossan sea slug *Elysia crispata* vary by location and ecotype. *Biol. Bull.* 236: 88–96.

Middlebrooks, M.L., S.K. Pierce y S.S. Bell. 2011. Foraging behavior under starvation conditions is altered via photosynthesis by the marine gastropod, *Elysia clarki*. *PLoS One* 6: e22162.

Miyamoto, A., A. Sakai, R. Nakano y Y. Yusa. 2015. Phototaxis of sacoglossan sea slugs with different photosynthetic abilities: a test of the ‘crawling leaves’ hypothesis. *Mar. Biol.* 162: 1343–1349.

Newcomb, J.M., L.E. Kirouac, A.A. Naimie, K.A. Bixby, C. Lee, S. Malanga, M. Raubach y W.H.I. Watson. 2014. Circadian rhythms of crawling and swimming in the nudibranch mollusc *Melibe leonina*. *Biol. Bull.* 227: 263–273.

Olabarria, C., A.J. Underwood y M.G. Chapman. 2002. Appropriate experimental design to evaluate preferences for microhabitat: An example of preferences by species of microgastropods. *Oecologia* 132: 159–166.

R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing.

Rahat, P.M. y E.B.I. Monselise. 1979. Photobiology of the chloroplast hosting mollusc *Elysia timida*- (Opisthobranchia). *J. Exp. Biol.* 79: 225–233.

Schmitt, V. y H. Wägele. 2011. Behavioral adaptations in relation to long-term retention of endosymbiotic chloroplasts in the sea slug *Elysia timida* (Opisthobranchia, Sacoglossa). *Thalassas* 27: 225–238.

Singer, M.C. 2000. Reducing ambiguity in describing plant-insect interactions: “Preference”, “acceptability” and “electivity.” *Ecol. Lett.* 3: 159–162.

Stavenga, D.G. 2010. On visual pigment templates and the spectral shape of invertebrate rhodopsins and metarhodopsins. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* 196: 869–878.

Taylor, D.L. 1967. The occurrence and significance of endosymbiotic chloroplasts in the digestive glands of herbivorous opisthobranchs. *J. Phycol.* 3: 234–235.



- Taylor, D.L. 1971. Photosynthesis of symbiotic chloroplasts in *Tridachia crispata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 38: 233–236.
- Thimijan, R.W. y R.D. Heins. 1983. Photometric, radiometric, and quantum light units of measure: A review of procedures for interconversion. *HortScience* 18: 818–822.
- Trench, R.K. 1969. Chloroplasts as functional endosymbionts in the mollusc *Tridachia crispata* (Bérgh), (Opisthobranchia, Sacoglossa). *Nature* 222: 1071–1072.
- Underwood, A.J., M.G. Chapman y T.P. Crowe. 2004. Identifying and understanding ecological preferences for habitat or prey. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 300: 161–187.
- Vermeij, M.J.A. y R.P.M. Bak. 2002. How are coral populations structured by light? Marine light regimes and the distribution of *Madracis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 233: 105–116.
- Vieira, S., R. Calado, H. Coelho y J. Serôdio. 2009. Effects of light exposure on the retention of kleptoplastic photosynthetic activity in the sacoglossan mollusc *Elysia viridis*. *Mar. Biol.* 156: 1007–1020.
- Vital, X.G., F. Rey, P. Cartaxana, S. Cruz, M.R. Domingues, R. Calado y N. Simões. 2021. Pigment and fatty acid heterogeneity in the sea slug *Elysia crispata* is not shaped by habitat depth. *Animals* 11: 1–17.
- de Vries, J., C. Woehle, G. Christa, H. Wägele, A.G.M. Tielens, P. Jahns y S.B. Gould. 2015. Comparison of sister species identifies factors underpinning plastid compatibility in green sea slugs. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 282: 20142519–20142519.
- Wang, W., X. Qin, M. Sang, D. Chen, K. Wang, R. Lin, C. Lu, J.R. Shen y T. Kuang. 2013. Spectral and functional studies on siphonaxanthin-type light-harvesting complex of photosystem II from *Bryopsis corticulans*. *Photosynth. Res.* 117: 267–279.
- Weaver, S. y K.B. Clark. 1981. Light intensity and color preferences of five Ascoglossan (=Sacoglossan) Molluscs (Gastropoda: Opisthobranchia): a comparison of chloroplast-symbiotic and aposymbiotic species. *Mar. Behav. Physiol.* 7: 297–306.
- Wickham, H., W. Chang, L. Henry, T.L. Pedersen, K. Takahashi, C. Wilke, K. Woo, H. Yutani y D. Dunnington. 2021. *ggplot2*.
- Zar, J.H. 2009. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, NJ, USA.

## Discusión general y conclusiones

En este trabajo se relacionaron aspectos biológicos, poblacionales y conductuales de *Elysia crispata* con respecto a la luz, un factor determinante. Particularmente en los dos últimos capítulos se enfatizó que la cantidad y calidad de la luz es relevante en su comportamiento y distribución en el ambiente. Elegir hábitats y momentos del día con menos intensidad de luz probablemente les da alguna ventaja, por ejemplo, ahorro o inversión de energía, para encontrar alimento, por alguna cuestión reproductiva o para evadir la depredación. Es posible que alguno(s) o varios de estos aspectos sean la base del amplio éxito de la especie en el Caribe (Krug *et al.* 2016, Jiménez *et al.* 2021).

En los arrecifes coralinos donde se estudió a *E. crispata*, la composición de algas cambia de acuerdo con los microhábitats dados por la profundidad (Horta-Puga *et al.* 2020). Con base en los resultados del primer capítulo de este trabajo (ver 1.5), donde se encontró una amplia variedad de pigmentos fotosintéticos cuyo origen es de diferentes tipos de algas, se confirma la versatilidad alimentaria y naturaleza generalista de esta babosa marina (Middlebrooks *et al.* 2014, 2019). Su preferencia (selección activa) por alguna especie de alga en particular aún es desconocida, por lo que este es un buen tema para indagar en el futuro. Su elección de alimento podría deberse al tipo de cloroplastos del alga que consumen, ya que se relaciona con la rapidez en su degradación y con el tiempo de retención en las babosas marinas (Evertsen y Johnsen 2009, Curtis *et al.* 2010), así como a la eficacia fotosintética y los mecanismos de fotoprotección de los pigmentos que tiene cada tipo de alga; éstos afectan directamente a las babosas marinas que las consumen (Jesus *et al.* 2010, Ventura *et al.* 2013, Cruz *et al.* 2015). Por lo tanto, la movilidad de *E. crispata* en su hábitat observada en este trabajo, podría ser posible debido a la amplia variedad de pigmentos que posee (Vital *et al.* 2021), lo que se podría extrapolar a babosas marinas sacoglosas generalistas con cleptoplastía funcional en ambientes con variación drástica de intensidades y espectros de luz.

Para las babosas marinas sacoglosas, las algas representan su alimento, un refugio y/o una fuente de metabolitos secundarios (Jensen 1994, Trowbridge 1994, Gavagnin *et al.* 2000, Baumgartner *et al.* 2009). Los metabolitos secundarios, como los polipropionados, pueden provenir del contenido digerido de las algas, así como de los cleptoplastos (Gavagnin *et al.* 2000); para que *E. crispata* pueda aprovechar estas moléculas, posiblemente debe mantener a estos organelos en las condiciones lumínicas adecuadas.

Los polipropionados podrían, junto con los pigmentos fotosintéticos, ser usados como control fisiológico para mitigar el daño que causa el exceso de luz (Cutignano *et al.* 2009, Torres *et al.* 2020). Estas moléculas podrían jugar un papel importante en la retención funcional de *E. crispata*, ya que en este trabajo esta babosa marina estuvo más tiempo en intensidades de luz alta ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) después de consumir *Bryopsis* aclimatada a dicha intensidad, lo que indica que posee mecanismos que le permiten tolerar esa intensidad lumínica. El mencionado género de algas no tiene ciclo de fotoprotección, pero probablemente reduce los daños por exceso de luz cambiando la composición de sus pigmentos (Giossi *et al.* 2021).

La alta abundancia de *E. crispata* en algunos ambientes, como en los arrecifes Verde y Arcas, se podría relacionar a una reproducción exitosa debido a un excedente de energía derivado de la cleptoplastía. Los mecanismos del traspaso de productos derivados de la fotosíntesis del cleptoplasto a las babosas aún no son claros (Cruz *et al.* 2020), pero en *Elysia viridis* y *Elysia timida* se ha registrado carbono y nitrógeno producido en los cleptoplastos, en órganos reproductivos que no poseen estos organelos (Cruz *et al.* 2020, Cartaxana *et al.* 2021). Lo anterior resalta la relevancia de la cleptoplastía funcional en el éxito reproductivo de algunas babosas marinas. Por lo tanto, las condiciones de luz adecuadas para que el animal realice sus actividades (i.e. reproducción, alimentación, etc.) también dependerá de aquellas que le permitan simultáneamente obtener el mayor beneficio de la cleptoplastía (Cartaxana *et al.* 2021); por ejemplo, se ha comprobado que la cantidad de luz en la que consumen las algas está relacionada con su crecimiento (Akimoto *et al.* 2014, LaBuda 2019). La menor abundancia de *E. crispata* en Puerto Morelos podría deberse a que tiene un mayor número de zonas con una condición lumínica desfavorable para la especie.

Al sumar las abundancias de los periodos del día analizados en este trabajo, se encontró un mayor número de organismos de *E. crispata* en los periodos con poca luz (noche, atardecer y amanecer); además, le atraen intensidades de luz bajas, lo que indica que posiblemente tiene una mayor actividad en esos periodos del día. Una mayor actividad de babosas marinas fotosintéticas en periodos con poca luz se podría relacionar con una mayor disponibilidad de energía, si durante el día tuviesen picos de fotosíntesis, como en algunas algas (Vanden Driessche 1966, Okada *et al.* 1978). En *Plakobranthus ocellatus*, una babosa marina sacoglosa con retención longeva de cloroplastos, se ha mencionado que probablemente se alimenta por la noche (Tanamura y Hirose 2016, Donohoo *et al.*

2020); mientras que *E. viridis*, una especie con retención corta de cleptoplastos, posiblemente tiene poca actividad durante ese periodo (Neusser *et al.* 2019). Así mismo, otras babosas marinas sin retención de cleptoplastos realizan frecuentemente actividades de alimentación y reproducción durante este tiempo, principalmente para evitar depredadores (Newcomb *et al.* 2014).

Diferentes grupos de animales usan los cambios de la luz del día para evitar la depredación (Endler 1987, Bezerra-Neto y Pinto-Coelho 2007). En este grupo de moluscos, esta estrategia podría usarse ante depredadores visuales. Sin embargo, existen pocos registros de peces alimentándose de babosas marinas sacoglosas. Los depredadores de las babosas marinas fotosintéticas también incluyen crustáceos, otras babosas marinas y corales (Trowbridge 1994, Mehrotra *et al.* 2019). Probablemente, *E. crispata* enfrenta dichos depredadores con los metabolitos secundarios que posee y que son una defensa química; estas sustancias son muy costosas energéticamente y están directamente relacionadas con su alimentación (Gavagnin *et al.* 1997, 2000). Las defensas conductuales para evadir la depredación en esta especie podrían incluir la cripsis, la excreción de moco y la movilidad en su hábitat, que fue corroborada con este trabajo (ver Capítulo II).

La composición del moco depende de su alimentación e incluso de la cleptoplastía (Trench *et al.* 1972, Gavagnin *et al.* 1997, Lopes *et al.* 2022) y sus compuestos representan las defensas químicas ante algunos depredadores (Paul y Van Alstyne 1988, Gavagnin *et al.* 2000). Además de la movilidad en su hábitat, en los experimentos de preferencia de este estudio se encontró que *E. crispata* percibe los tipos y cantidades de luz. Dado que se corroboró una menor preferencia por el rojo y una selección por las intensidades bajas y medias bajas ( $60\text{--}180 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), los movimientos de las babosas marinas que inician con señales lumínicas causadas por el transcurso del día, como cambios en los radios de las longitudes de onda o disminuciones de intensidades lumínicas (Kirk 2011), igualmente podrían representar una defensa conductual.

La información derivada de este estudio sugiere que *E. crispata* conserva los cleptoplastos de una forma óptima, posiblemente reduciendo el estrés lumínico de distintas maneras. El comportamiento y distribución aquí registrados podrían ser una respuesta a un reloj circadiano y/o una defensa ante la depredación. La diferencia entre la composición del espectro que tiene la luz directa y la luz reflejada podría ser la señal que permite a los animales distinguir entre hábitats, como espacios abiertos, áreas con sombras o zonas con mucho alimento (Menzel 1979). Por lo tanto, conocer más sobre sus fotoreceptores y qué

longitudes de onda pueden detectar estas babosas marinas ayudará a dilucidar cómo es que logran moverse en su ambiente. Al ser una especie con amplio tiempo de retención de cleptoplastos, los resultados de este estudio en distintos niveles (biomolecular, individual y poblacional) ayudan al entendimiento del sistema animal-cloroplasto, en conjunto con su entorno natural.

Este trabajo confirmó que la cantidad y calidad de la luz es relevante para *Elysia crispata* y determinó los siguientes aspectos ecológicos importantes:

- 1) la heterogeneidad de sus biomoléculas (pigmentos fotosintéticos, lípidos y ácidos grasos) no está relacionada con la profundidad de su hábitat;
- 2) los cloroplastos que retiene esta babosa marina después de 30 días provienen de distintos grupos de algas y tienen una buena condición fisiológica y bioquímica;
- 3) su abundancia y talla cambian entre localidades, profundidades y periodos del día; este estudio es el primero en documentar que tiene cierta movilidad dentro de los arrecifes donde habita;
- 4) presenta una alta variación en sus biomoléculas y en su comportamiento y tiene una conducta exploratoria;
- 5) prefiere intensidades lumínicas bajas ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y su espectro menos preferido es el rojo ( $\sim 665 \text{ nm}$ ); la aclimatación a la luz de los cleptoplastos está relacionada con su conducta de preferencia, ya que se notó un patrón en el que las babosas marinas cambiaron su elección de intensidades bajas ( $60 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a altas ( $425 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), después de alimentarse con algas aclimatadas a luz alta.

El principal aporte de este trabajo fue dar a conocer que esta babosa marina fotosintética se mueve en su ambiente, que activamente selecciona intensidades de luz bajas y rechaza el rojo y, que su elección de intensidad de luz depende parcialmente de la aclimatación de sus cleptoplastos.

## Referencias bibliográficas

- Akimoto, A., Y.M. Hirano, A. Sakai y Y. Yusa. 2014. Relative importance and interactive effects of photosynthesis and food in two solar-powered sea slugs. *Mar. Biol.* 161: 1095–1102.
- Alcock, J. 2009. *Animal behavior*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Baumgartner, F.A., C.A. Motti, R. De Nys y N.A. Paul. 2009. Feeding preferences and host associations of specialist marine herbivores align with quantitative variation in seaweed secondary metabolites. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 396: 1–12.
- Baumgartner, F.A., H. Pavia y G.B. Toth. 2015. Acquired phototrophy through retention of functional chloroplasts increases growth efficiency of the sea slug *Elysia viridis*. *PLoS One* 10: 1–14.
- Begon, M., C. Townsend y J.L. Harper. 2006. *Ecology: From individuals to ecosystems*. Blackwell Publishing.
- Bezerra-Neto, J.F. y R.M. Pinto-Coelho. 2007. Diel vertical migration of the copepod *Thermocyclops inversus* (Kiefer, 1936) in a tropical reservoir: The role of oxygen and the spatial overlap with Chaoborus. *Aquat. Ecol.* 41: 535–545.
- Cartaxana, P., L. Morelli, B. Jesus, G. Calado, R. Calado y S. Cruz. 2019. The photon menace: Kleptoplast protection in the photosynthetic sea slug *Elysia timida*. *J. Exp. Biol.* 222: 3–6.
- Cartaxana, P., L. Morelli, C. Quintaneiro, G. Calado, R. Calado y S. Cruz. 2018. Kleptoplasts photoacclimation state modulates the photobehaviour of the solar-powered sea slug *Elysia viridis*. *J. Exp. Biol.* 221: doi:10.1242/jeb.180463.
- Cartaxana, P., F. Rey, C. LeKieffre, D. Lopes, C. Hubas, J.E. Spangenberg, S. Escrig, B. Jesus, G. Calado, R. Domingues, M. Kühn, R. Calado, A. Meibom y S. Cruz. 2021. Photosynthesis from stolen chloroplasts can support sea slug reproductive fitness. *Proc. R. Soc. B* 288: 20211779.
- Cartaxana, P., E. Trampe, M. Kühn y S. Cruz. 2017. Kleptoplast photosynthesis is nutritionally relevant in the sea slug *Elysia viridis*. *Sci. Rep.* 7: 7714.
- Cruz, S., R. Calado, J. Serôdio y P. Cartaxana. 2013. Crawling leaves: Photosynthesis in sacoglossan sea slugs. *J. Exp. Bot.* 64: 3999–4009.
- Cruz, S., R. Calado, J. Serôdio, B. Jesus y P. Cartaxana. 2014. Pigment profile in the photosynthetic sea slug *Elysia viridis* (Montagu, 1804). *J. Molluscan Stud.* 80: 475–481.
- Cruz, S., P. Cartaxana, R. Newcomer, G. Dionísio, R. Calado, J. Serôdio, K.N. Pelletreau y M.E. Rumpho. 2015. Photoprotection in sequestered plastids of sea slugs and respective algal sources. *Sci. Rep.* 5: 1–8.
- Cruz, S., C. LeKieffre, P. Cartaxana, C. Hubas, N. Thiney, S. Jakobsen, S. Escrig, B. Jesus, M. Kühn, R. Calado y A. Meibom. 2020. Functional kleptoplasts intermediate incorporation of carbon and nitrogen in cells of the Sacoglossa sea slug *Elysia viridis*.

Sci. Rep. 10: 1–12.

- Curtis, N.E., M.L. Middlebrooks, J.A. Schwartz y S.K. Pierce. 2015. Kleptoplastic sacoglossan species have very different capacities for plastid maintenance despite utilizing the same algal donors. *Symbiosis* 65: 23–31.
- Curtis, N.E., J.A. Schwartz y S.K. Pierce. 2010. Ultrastructure of sequestered chloroplasts in sacoglossan gastropods with differing abilities for plastid uptake and maintenance. *Invertebr. Biol.* 129: 297–308.
- Cutignano, A., G. Cimino, G. Villani y A. Fontana. 2009. Shaping the polypropionate biosynthesis in the solar-powered mollusc *Elysia viridis*. *ChemBioChem* 10: 315–322.
- Dionísio, G., F. Faleiro, M. Bilan, I.C. Rosa, M. Pimentel, J. Serôdio, R. Calado y R. Rosa. 2017. Impact of climate change on the ontogenetic development of “solar-powered” sea slugs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 578: 87–97.
- Donohoo, S.A., R.M. Wade y A.R. Sherwood. 2020. Finding the sweet spot: Sub-ambient light increases fitness and kleptoplast survival in the sea slug *Plakobranthus* cf. *ianthobaptus* Gould, 1852. *Biol. Bull.* 238: 154–166.
- Vanden Driessche, T. 1966. Circadian rhythms in *Acetabularia*: Photosynthetic capacity and chloroplast shape. *Exp. Cell Res.* 42: 18–30.
- Endler, J.A. 1987. Predation, light intensity and courtship behaviour in *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Anim. Behav.* 35: 1376–1385.
- Evertsen, J. y G. Johnsen. 2009. In vivo and in vitro differences in chloroplast functionality in the two north Atlantic sacoglossans (Gastropoda, Opisthobranchia) *Placida dendritica* and *Elysia viridis*. *Mar. Biol.* 156: 847–859.
- Gavagnin, M., E. Mollo, F. Castelluccio, D. Montanaro, J. Ortea y G. Cimino. 1997. A novel dietary sesquiterpene from the marine sacoglossan *Tridachia crispata*. *Nat. Prod. Lett.* 10: 151–156.
- Gavagnin, M., E. Mollo, D. Montanaro, J. Ortea y G. Cimino. 2000. Chemical studies of Caribbean sacoglossans: Dietary relationships with green algae and ecological implications. *J. Chem. Ecol.* 26: 1563–1578.
- Giménez-Casaldueiro, F. y C. Muniain. 2008. The role of kleptoplasts in the survival rates of *Elysia timida* (Risso, 1818): (Sacoglossa: Opisthobranchia) during periods of food shortage. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 357: 181–187.
- Giossi, C.E., S. Cruz, F. Rey, R. Marques, T. Melo, M. do R. Domingues y P. Cartaxana. 2021. Light induced changes in pigment and lipid profiles of Bryopsidales algae. *Front. Mar. Sci.* 8: 745083.
- Greene, R.W. 1970. Symbiosis in sacoglossan opisthobranchs: translocation of photosynthetic products from chloroplast to host tissue. *Malacologia* 10: 369–380.
- Händeler, K., Y.P. Grzybowski, P.J. Krug y H. Wägele. 2009. Functional chloroplasts in metazoan cells - A unique evolutionary strategy in animal life. *Front. Zool.* 6: 1–18.
- Horta-Puga, G., J.L. Tello-Musi, A. Córdova, A. Gutiérrez-Carrillo, J. Gutiérrez-Martínez y

- A.A. Morales-Aranda. 2020. Spatio-temporal variability of benthic macroalgae in a coral reef system highly influenced by fluvial discharge: Veracruz, Gulf of Mexico. *Mar. Ecol.* 41: 1–18.
- Jensen, K.R. 1993. Morphological adaptations and plasticity of radular teeth of the *Sacoglossa* (= *Ascoglossa*) (Mollusca: Opisthobranchia) in relation to their food plants. *Biol. J. Linn. Soc.* 48: 135–155.
- Jensen, K.R. 1994. Behavioural adaptations and diet specificity of sacoglossan opisthobranchs. *Ethol. Ecol. Evol.* 6: 87–101.
- Jesus, B., P. Ventura y G. Calado. 2010. Behaviour and a functional xanthophyll cycle enhance photo-regulation mechanisms in the solar-powered sea slug *Elysia timida* (Risso, 1818). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 395: 98–105.
- Jiménez, L.M., N. Simões y C. Yáñez-Arenas. 2021. Where is the genus *Elysia* in the western Atlantic? Potential distribution, species richness and representation in marine protected areas. *J. Molluscan Stud.* 87: eyab003.
- Joseph, J.D. 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Prog. Lipid Res.* 21: 109–153.
- Kirk, J.T.O. 2011. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press, New York.
- Krug, P.J., J.E. Vendetti y Á. Valdés. 2016. Molecular and morphological systematics of *Elysia* Risso, 1818 (Heterobranchia: Sacoglossa) from the Caribbean region. *Zootaxa* 4148: 1–137.
- LaBuda, A. 2019. When your gut is a garden: A comparative study of sea slug species and chloroplast sources to determine the benefits of kleptoplasty. California State University, Los Angeles.
- Laetz, E.M.J., V.C. Moris, L. Moritz, A.N. Haubrich y H. Wägele. 2017. Photosynthate accumulation in solar-powered sea slugs - starving slugs survive due to accumulated starch reserves. *Front. Zool.* 14: 1–9.
- Lopes, D., S. Cruz, P. Martins, S. Ferreira, C. Nunes, P. Domingues y P. Cartaxana. 2022. Sea slug mucus production is supported by photosynthesis of stolen chloroplasts. *Biology.* 11: 1207
- Mehrotra, R., C. Monchanin, C.M. Scott, N. Phongsuwan, M.C. Gutierrez, S. Chavanich y B.W. Hoeksema. 2019. Selective consumption of sacoglossan sea slugs (Mollusca: Gastropoda) by scleractinian corals (Cnidaria: Anthozoa). *PLoS One* 14: 1–22.
- Menzel, R. 1979. Spectral sensitivity and color vision in invertebrates, p. 503–580. In H. Autrum (ed.). *Comparative physiology and evolution of vision in invertebrates.* Springer-Verlag, Berlin.
- Middlebrooks, M.L., S.S. Bell, N.E. Curtis y S.K. Pierce. 2014. Atypical plant-herbivore association of algal food and a kleptoplastic sea slug (*Elysia clarki*) revealed by DNA barcoding and field surveys. *Mar. Biol.* 161: 1429–1440.
- Middlebrooks, M.L., N.E. Curtis y S.K. Pierce. 2019. Algal sources of sequestered



- chloroplasts in the sacoglossan sea slug *Elysia crispata* vary by location and ecotype. Biol. Bull. 236: 88–96.
- Miyamoto, A., A. Sakai, R. Nakano y Y. Yusa. 2015. Phototaxis of sacoglossan sea slugs with different photosynthetic abilities: a test of the ‘crawling leaves’ hypothesis. Mar. Biol. 162: 1343–1349.
- Neusser, T.P., F. Hanke, G. Haszprunar y K.M. Jörger. 2019. “Dorsal vessels”? 3D-reconstruction and ultrastructure of the renopericardial system of *Elysia viridis* (Montagu, 1804) (Gastropoda: Sacoglossa), with a discussion of function and homology. J. Molluscan Stud. 85: 166–171.
- Newcomb, J.M., L.E. Kirouac, A.A. Naimie, K.A. Bixby, C. Lee, S. Malanga, M. Raubach y W.H.I. Watson. 2014. Circadian rhythms of crawling and swimming in the nudibranch mollusc *Melibe leonina*. Biol. Bull. 227: 263–273.
- Okada, M., M. Inoue y T. Ikeda. 1978. Circadian rhythm in photosynthesis of the green alga *Bryopsis maxima*. Plant Cell Physiol. 19: 197–202.
- Parrish, C.C. 2013. Lipids in marine ecosystems. ISRN Oceanogr. 1–16.
- Paul, V.J. y K.L. Van Alstyne. 1988. Use of ingested algal diterpenoids by *Elysia halimeda* Macnae (Opisthobranchia : Ascoglossa) as antipredator defenses. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 119: 15–29.
- Pelletreau, K.N., D. Bhattacharya, D.C. Price, J.M. Worful, A. Moustafa y M.E. Rumpho. 2011. Sea slug kleptoplasty and plastid maintenance in a metazoan. Plant Physiol. 155: 1561–1565.
- Pelletreau, K.N., A.P.M. Weber, K.L. Weber y M.E. Rumpho. 2014. Lipid accumulation during the establishment of kleptoplasty in *Elysia chlorotica*. PLoS One 9: 1–16.
- Rey, F., E. Da Costa, A.M. Campos, P. Cartaxana, E. Maciel, P. Domingues, M.R.M. Domingues, R. Calado y S. Cruz. 2017. Kleptoplasty does not promote major shifts in the lipidome of macroalgal chloroplasts sequestered by the sacoglossan sea slug *Elysia viridis*. Sci. Rep. 7: 1–10.
- Rumpho, M.E., K.N. Pelletreau, A. Moustafa y D. Bhattacharya. 2011. The making of a photosynthetic animal. J. Exp. Biol. 214: 303–311.
- Rumpho, M.E., E.J. Summer, B.J. Green, T.C. Fox y J.R. Manhart. 2001. Mollusc/algal chloroplast symbiosis: how can isolated chloroplasts continue to function for months in the cytosol of a sea slug in the absence of an algal nucleus? Zoology 104: 303–312.
- Serôdio, J., S. Cruz, P. Cartaxana y R. Calado. 2014. Photophysiology of kleptoplasts: photosynthetic use of light by chloroplasts living in animal cells. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 369: 20130242.
- Van Steenkiste, N.W.L., I. Stephenson, M. Herranz, F. Husnik, P.J. Keeling y B.S. Leander. 2019. A new case of kleptoplasty in animals: Marine flatworms steal functional plastids from diatoms. Sci. Adv. 5: 1–9.
- Tanamura, D. y E. Hirose. 2016. Population dynamics of the sea slug *Plakobranthus ocellatus* (Opisthobranch: Sacoglossa: Elysioidea) on a subtropical coral reef off

- Okinawa-Jima Island, Ryukyu Archipelago, Japan. Zool. Stud. 55: 1–8.
- Terashima, I., T. Fujita, T. Inoue, W.S. Chow y R. Oguchi. 2009. Green light drives leaf photosynthesis more efficiently than red light in strong white light: Revisiting the enigmatic question of why leaves are green. *Plant Cell Physiol.* 50: 684–697.
- Torres, J.P., Z. Lin, J.M. Winter, P.J. Krug y E.W. Schmidt. 2020. Animal biosynthesis of complex polyketides in a photosynthetic partnership. *Nat. Commun.* 11: 1–12.
- Trench, R.K., J.E. Boyle y D.C. Smith. 1973. The association between chloroplasts of *Codium fragile* and the mollusc *Elysia viridis*. I. Characteristics of isolated *Codium* chloroplasts. *Proc. R. Soc. London B* 184: 51–61.
- Trench, R.K., M.E. Trench y L. Muscatine. 1972. Symbiotic chloroplasts; their photosynthetic products and contribution to mucus synthesis in two marine slugs. *Biol. Bull.* 142: 335–349.
- Trowbridge, C.D. 1994. Defensive responses and palatability of specialist herbivores - Predation on NE Pacific ascoglossan gastropods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 105: 61–70.
- Ventura, P., G. Calado y B. Jesus. 2013. Photosynthetic efficiency and kleptoplast pigment diversity in the sea slug *Thuridilla hopei* (Vérany, 1853). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 441: 105–109.
- Vieira, S., R. Calado, H. Coelho y J. Serôdio. 2009. Effects of light exposure on the retention of kleptoplastic photosynthetic activity in the sacoglossan mollusc *Elysia viridis*. *Mar. Biol.* 156: 1007–1020.
- Vital, X.G., F. Rey, P. Cartaxana, S. Cruz, M.R. Domingues, R. Calado y N. Simões. 2021. Pigment and fatty acid heterogeneity in the sea slug *Elysia crispata* is not shaped by habitat depth. *Animals* 11: 1–17.
- Voogt, P.A. 1983. Lipids: Their Distribution and Metabolism, p. 329–370. In P.W. Hochachka (ed.). *The Mollusca. Metabolic biochemistry and molecular biomechanics.* Academic Press, Inc., New York, USA.
- de Vries, J., C. Rauch, G. Christa y S.B. Gould. 2014. A sea slug's guide to plastid symbiosis. *Acta Soc. Bot. Pol.* 83: 415–421.
- Wägele, H. y W.F. Martin. 2014. Endosymbioses in sacoglossan sea slugs: Plastid-bearing animals that keep photosynthetic organelles without borrowing genes, p. 291–324. In W. Löffelhardt (ed.). *Endosymbiosis.* Springer-Verlag Wien.
- Weaver, S. y K.B. Clark. 1981. Light intensity and color preferences of five Ascoglossan (=Sacoglossan) Molluscs (Gastropoda: Opisthobranchia): a comparison of chloroplast-symbiotic and aposymbiotic species. *Mar. Behav. Physiol.* 7: 297–306.
- Wilhelm, C., A. Jungandreas, T. Jakob y R. Goss. 2014. Light acclimation in diatoms: From phenomenology to mechanisms. *Mar. Genomics* 16: 5–15.

## Apéndices

Apéndice I. Datos complementarios del artículo II

Cuadro 1. Detalle de los sitios muestreados en el artículo II, profundidades mínimas y máximas donde se buscó a *Elysia crispata* y el número total de cuadrantes por sitio.

Fecha	Arrecife	Sitio	Coordenadas	Prof mín (m)	Prof máx (m)	# cuad
abr-18	Arcas	TEX 1	20°12'18.44"N 91°57'47"O	1.5	3	16
abr-18	Arcas	TEX 2	20°12'22.14"N 91°57'38.71"O	0.4	1.5	8
abr-18	Arcas	T-III	20°12'43.5"N 91°57'39"O	5.3	5.9	2
abr-18	Arcas	T-IX	20°12'33.7"N 91°57'51.2"O	2.4	3.3	3
abr-18	Arcas	T-VI	20°12'4.4"N 91°57'34.8"O	5.5	5.5	1
abr-18	Arcas	T-VII	20°11'56.7"N 91°57'49.7"O	9	9.5	2
abr-18	Arcas	T-VIII	20°11'58.7"N 91°58'0.5"O	5.7	6	2
abr-18	Arcas	T-X	20°12'43.3"N 91°57'49.8"O	5	5	2
abr-18	Arcas	T-XII	20°12'58.9"N 91°58'38.9"O	7.1	7.7	3
abr-18	Arcas	T-XIV	20°11'41.7"N 91°57'26.7"O	2.6	4.3	3
abr-18	Arcas	T-XVI	20°11'44.4"N 91°57'35.9"O	10	11	2
mar-19	Puerto Morelos	PM01	20°51'00.2"N 86°52'19.6"O	3	3	4
mar-19	Puerto Morelos	PM02	20°48'0.09"N 86°52'0.21"O			4
mar-19	Puerto Morelos	PM03	20°48'20"N 86°52'27"O	9.9	10	8
mar-19	Puerto Morelos	PM04	20°49'0.25"N 86°52'0.13"O	6	8.5	16
jul/ago-19	Puerto Morelos	BONANZA	20°57'53.54"N 86°48'52.194"O	1.4	2.5	7
jul/ago-19	Puerto Morelos	PM_01	20°49'32.7"N 86°52'35.3"O	3.5	8.5	3
jul/ago-19	Puerto Morelos	PM_02	20°48'7.6"N 86°53'7.8"O	10.5	10.5	4
jul/ago-19	Puerto Morelos	PM_03	20°49'51.9"N 86°52'27.7"O	4.7	6	3
jul/ago-19	Puerto Morelos	PM_04	20°50'58.7"N 86°52'17.8"O	3.6	4.5	7
ago-18	Verde	IV01	19°12'6.00"N 96°4'15.40"O	3.6	6	16
ago-18	Verde	IV02	19°11'54.43"N 96°4'7.12"O	4	9	10
ago-18	Verde	IV04	19°12'25.38"N 96°4'7.10"O	6.3	10.8	20

ago-18	Verde	IV05	19°12'24.02"N 96° 4'24.69"O	9.8	12	28
ago-18	Verde	IV06	19°12'24.10"N 96° 4'27.10"O	6.5	10.1	22
ago-18	Verde	IV07	19°12'21.20"N 96° 4'23.00"O	9	12	21
ago-18	Verde	IV08	19°12'22.21"N 96°4'19.22"O	5.1	7.8	5
ago-18	Verde	IV09	19°12'8.70"N 96° 4'0.10"O	1	1	6
ago-18	Verde	IV10	19°12'3.40"N 96° 4'13.60"O	1.9	4.1	14
ago-18	Verde	IV11	19°12'10.70"N 96° 4'18.00"O	2.5	4.1	14
ago-18	Verde	IV12	19°12'12.50"N 96° 4'20.10"O	2.1	4.3	15
jun-19	Verde	ISVER01	19°12'8.80"N 96° 4'17.20"O	7	9.3	7
jun-19	Verde	ISVER02	19°12'8.20"N 96° 4'17.10"O	7.5	10	8
jun-19	Verde	ISVER03	19°12'11.90"N 96° 4'19.90"O	8.4	13	8
jun-19	Verde	ISVER04	19°12'12.60"N 96° 4'19.60"O	1.3	3.4	11
jun-19	Verde	ISVER05	19°12'15.60"N 96° 4'21.20"O	2	10	14
jun-19	Verde	ISVER06	19°12'17.24"N 96° 4'21.73"O	7.3	10.2	8

Cuadro 2. Observaciones preliminares en arrecifes del Golfo de México (GMx) y Mar Caribe (Car) donde se registró a *Elysia crispata*. Se muestra el número de organismos, cantidad de sitios muestreados, profundidades mínimas y máximas donde se buscó a la especie y área total explorada por arrecife.

Arrecife	Región	Núm. sitios	Prof. mín. (m)	Prof. máx. (m)	Área explorada (m <sup>2</sup> )	Total de organismos
<i>Alacranes</i>	GMx	7	5	15.5	509	95
<i>Bajos del Norte</i>	GMx	4	10.5	16.5	375	26
<i>Blanquilla</i>	GMx	2	3.5	7.5	50	26
<i>Cabezo</i>	GMx	3	4	11.5	16	21
<i>En medio</i>	GMx	2	5	9	125	39
<i>Hornos</i>	GMx	2	2	8.5	130	0
<i>Madagascar</i>	GMx	4	2	12	80	0
<i>Mahahual</i>	Car	4	1	8.5	790	22

Cuadro 3. Fechas y coordenadas de los sitios de muestreo donde se buscó a *Elysia crispata* en las observaciones preliminares.

Fecha	Arrecife	Sitio	Latitud	Longitud
jul-19	Alacranes	ALA01	22°23'7.73"N	89°42'34.7"O
jul-19	Alacranes	ALA02	22°23'45.3"N	89°42'20"O
jul-19	Alacranes	ALA03	22°32'7.5"N	89°39'60.7"O
jul-19	Alacranes	ALA04	22°30'41.2"N	89°47'51.3"O
jul-19	Alacranes	ALA05	22°35'13.8"N	89°45'9.1"O
jul-19	Alacranes	ALA06	22°30'32.9"N	89°37'40.4"O
jul-19	Alacranes	ALA07	22°33'33.3"N	89°40'22.5"O
jul-19	Bajos del Norte	BN01	23°14'50.1"N	88°42'31.3"O
jul-19	Bajos del Norte	BN02	23°14'31.7"N	88°42'53.2"O
jul-19	Bajos del Norte	BN03	23°14'49.5"N	88°42'29.6"O
jul-19	Bajos del Norte	BN04	23°14'39"N	88°42'55.6"O
ago-18	Blanquilla	BL01	19°13'26.6"N	96°5'42.5"O
ago-18	Blanquilla	BL02	19°13'22.2"N	96°5'49.7"O
ago-18	Cabezo	CA01	19°5'51.1"N	95°51'22.2"O
ago-18	Cabezo	CA02	19°5'15.5"N	95°50'33.2"O
ago-18	Cabezo	CA03	19°3'3.1"N	95°49'26"O
jun-19	En medio	ENMED01	19°5'56.9"N	95°56'30.6"O
jul-19	En medio	ENMED02	19°5'54.4"N	95°56'12.5"O
ago-18	Hornos	HOR	19°11'27"N	96°7'4"O
jul-19	Hornos	HORN	19°11'24.9"N	96°6'57.6"O
jun-19	Madagascar	MAD01	21°26'17.7"N	90°16'39.9"O
jun-19	Madagascar	MAD02	21°26'20.9"N	90°17'5.2"O
jun-19	Madagascar	MAD03	21°26'21.6"N	90°16'41.3"O
jun-19	Madagascar	MAD04	21°26'20"N	90°16'54.4"O
feb-19	Mahahual	MAHA01	18°37'31.79"N	87°43'37.44"O
mar-19	Mahahual	MAHA02	18°37'29.74"N	87°43'25.96"O
may-19	Mahahual	MAHAHUAL02	18°42'7.2"N	87°42'28.4"O
may-19	Mahahual	MAHAHUAL03	18°42'19.8"N	87°42'20.1"O

Cuadro 4. Cuadrantes colocados en cada sitio de muestreo en los diferentes periodos del día en los tres arrecifes (Arcas, Puerto Morelos y Verde) donde se buscó a *Elysia crispata* en el desarrollo del artículo II. Las coordenadas de los sitios se pueden consultar en el Cuadro 2.1.

Fecha	Arrecife	Sitio	Periodo día	Prof (m)	No. Cuadrante
20/04/2018	Arcas	T-X	Atardecer	5.0	1
20/04/2018	Arcas	T-X	Atardecer	5.0	2
20/04/2018	Arcas	TEX 1	Atardecer	3.0	1
20/04/2018	Arcas	TEX 1	Atardecer	3.0	2
21/04/2018	Arcas	T-XIV	Mañana	4.3	1
21/04/2018	Arcas	T-XIV	Mañana	3.1	2
21/04/2018	Arcas	T-XIV	Mañana	2.6	3
21/04/2018	Arcas	TEX 1	Atardecer	3.0	3
21/04/2018	Arcas	TEX 1	Atardecer	2.5	4
22/04/2018	Arcas	T-XII	Mañana	7.7	1
22/04/2018	Arcas	T-XII	Mañana	7.2	2
22/04/2018	Arcas	T-XII	Mañana	7.5	3
22/04/2018	Arcas	TEX 1	Cenit	2.6	1
22/04/2018	Arcas	TEX 1	Cenit	2.8	2
22/04/2018	Arcas	TEX 1	Cenit	2.9	3
22/04/2018	Arcas	TEX 1	Cenit	3.0	4
22/04/2018	Arcas	T-VI	Atardecer	5.6	1
22/04/2018	Arcas	TEX 1	Noche	2.0	1
22/04/2018	Arcas	TEX 1	Noche	2.0	2
22/04/2018	Arcas	TEX 1	Noche	2.0	3
23/04/2018	Arcas	T-III	Cenit	5.3	1
23/04/2018	Arcas	T-III	Cenit	6.0	2
23/04/2018	Arcas	TEX 1	Noche	2.3	4
24/04/2018	Arcas	TEX 2	Cenit	1.5	1
24/04/2018	Arcas	TEX 2	Cenit	1.5	2
24/04/2018	Arcas	T-IX	Atardecer	2.4	1
24/04/2018	Arcas	T-IX	Atardecer	3.2	2
24/04/2018	Arcas	T-IX	Atardecer	3.3	3
24/04/2018	Arcas	TEX 2	Noche	1.5	1
24/04/2018	Arcas	TEX 2	Noche	1.5	2
25/04/2018	Arcas	TEX 1	Amanecer	1.5	1
25/04/2018	Arcas	TEX 1	Amanecer	1.5	2
25/04/2018	Arcas	TEX 1	Amanecer	1.5	3
25/04/2018	Arcas	TEX 1	Amanecer	1.5	4
25/04/2018	Arcas	T-VII	Mañana	9.5	1
25/04/2018	Arcas	T-VII	Mañana	9.1	2
25/04/2018	Arcas	T-VIII	Cenit	6.0	1

25/04/2018	Arcas	T-VIII	Cenit	5.7	2
25/04/2018	Arcas	TEX 2	Atardecer	1.5	1
25/04/2018	Arcas	TEX 2	Atardecer	1.5	2
26/04/2018	Arcas	TEX 2	Amanecer	0.7	1
26/04/2018	Arcas	TEX 2	Amanecer	0.4	2
26/04/2018	Arcas	T-XVI	Mañana	11.0	1
26/04/2018	Arcas	T-XVI	Mañana	10.0	2
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	3.6	1
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	3.7	2
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	3.8	3
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	3.9	4
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.4	5
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.7	1
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.4	2
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.8	3
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.6	4
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	3.8	5
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	3.6	6
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	3.9	7
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.7	8
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.0	9
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	4.1	10
28/08/2018	Verde	IV01	Amanecer	6.0	11
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	9.0	1
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	8.5	2
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	8.0	3
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	9.0	4
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	6.4	5
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	5.8	6
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	5.8	7
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	7.0	8
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	6.0	9
28/08/2018	Verde	IV02	Mañana	4.0	10
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.2	1
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.7	2
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.6	3
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.8	4
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.5	5
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.8	6
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	7.3	7
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	7.8	8



28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	7.8	9
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	7.9	10
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	6.3	11
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	6.4	12
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	9.0	1
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.3	2
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.8	3
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	10.8	4
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	10.4	5
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	10.6	6
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.4	7
28/08/2018	Verde	IV04	Cenit	8.0	8
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	12.0	1
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.8	2
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.0	3
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.6	4
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.1	5
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.4	6
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.0	7
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.6	8
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	9.8	9
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.0	1
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.6	2
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.6	3
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.0	4
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.2	5
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.1	6
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.5	7
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.0	8
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.6	9
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.4	10
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.5	11
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.9	12
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.7	13
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	11.4	14
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.7	15
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.4	16
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.1	17
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.9	18
28/08/2018	Verde	IV05	Atardecer	10.0	19
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	10.1	1

28/08/2018	Verde	IV06	Noche	9.0	2
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	8.0	3
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	8.0	4
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.9	5
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.0	6
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	8.0	7
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.0	8
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.0	9
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	9.7	1
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	10.0	2
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	8.6	3
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	8.5	4
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.8	5
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.7	6
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.4	7
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.1	8
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.3	9
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.6	10
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	7.2	12
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	6.5	13
28/08/2018	Verde	IV06	Noche	6.5	14
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	12.0	1
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	11.6	2
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	11.3	3
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.5	4
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.7	5
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.7	6
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.7	7
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.5	8
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.5	9
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.8	10
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.8	11
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	11.1	12
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.0	1
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.0	2
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.8	3
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.9	4
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.4	5
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.3	6
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.0	7
31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	9.7	8

31/08/2018	Verde	IV07	Amanecer	10.5	9
31/08/2018	Verde	IV08	Mañana	7.4	1
31/08/2018	Verde	IV08	Mañana	7.3	2
31/08/2018	Verde	IV08	Mañana	7.1	3
31/08/2018	Verde	IV08	Mañana	7.8	4
31/08/2018	Verde	IV08	Mañana	5.1	5
31/08/2018	Verde	IV09	Cenit	1.0	1
31/08/2018	Verde	IV09	Cenit	1.0	2
31/08/2018	Verde	IV09	Cenit	1.0	3
31/08/2018	Verde	IV09	Cenit	1.0	4
31/08/2018	Verde	IV09	Cenit	1.0	5
31/08/2018	Verde	IV09	Cenit	1.0	6
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	4.0	1
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	3.8	2
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	4.0	3
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	3.8	4
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	1.9	5
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	4.0	1
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	3.9	2
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	3.9	3
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	3.1	4
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	3.2	5
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	3.9	6
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	4.1	7
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	2.6	8
31/08/2018	Verde	IV10	Cenit	2.6	9
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.6	1
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.7	2
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.4	3
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	2.6	4
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.1	5
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	2.7	6
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.8	1
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	4.1	2
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.8	3
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.3	4
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.2	5
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	2.5	6
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.3	7
31/08/2018	Verde	IV11	Atardecer	3.4	8
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	4.0	1

31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.6	2
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.3	3
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	4.3	4
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.5	5
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.9	6
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.5	7
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	2.1	1
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	2.2	2
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.3	3
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	2.8	4
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.6	5
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.7	6
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.3	7
31/08/2018	Verde	IV12	Noche	3.5	8
25/03/2019	Puerto Morelos	PM01	Atardecer	3.0	1
25/03/2019	Puerto Morelos	PM01	Atardecer	3.0	2
25/03/2019	Puerto Morelos	PM01	Atardecer	3.0	3
25/03/2019	Puerto Morelos	PM01	Atardecer	3.0	4
27/03/2019	Puerto Morelos	PM02	Mañana	9.9	1
27/03/2019	Puerto Morelos	PM02	Mañana	9.9	2
27/03/2019	Puerto Morelos	PM02	Mañana	9.9	3
27/03/2019	Puerto Morelos	PM02	Mañana	9.9	4
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	9.9	1
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	9.9	2
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	9.9	3
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	9.9	4
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	10.0	1
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	10.0	2
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	10.0	3
28/03/2019	Puerto Morelos	PM03	Mañana	10.0	4

28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.0	1
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.0	2
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.0	3
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.0	4
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	6.0	1
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	6.0	2
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	6.0	3
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	6.0	4
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	7.5	1
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	7.5	2
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	7.5	3
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	7.5	4
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.5	1
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.5	2
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.5	3
28/03/2019	Puerto Morelos	PM04	Atardecer	8.5	4
08/06/2019	Verde	ISVER01	Noche	8.2	1
08/06/2019	Verde	ISVER01	Noche	8.5	2
08/06/2019	Verde	ISVER01	Noche	8.4	1
08/06/2019	Verde	ISVER01	Noche	9.3	2
08/06/2019	Verde	ISVER01	Noche	8.0	1
08/06/2019	Verde	ISVER01	Noche	7.0	2
08/06/2019	Verde	ISVER01	Noche	8.0	3
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	7.5	1
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	8.0	2
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	9.5	1
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	10.0	2
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	9.2	1
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	8.5	2
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	9.5	3
09/06/2019	Verde	ISVER02	Amanecer	8.1	4

09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	8.4	1
09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	13.0	2
09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	11.0	1
09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	9.0	2
09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	11.3	1
09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	11.6	2
09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	10.0	3
09/06/2019	Verde	ISVER03	Cenit	9.1	4
09/06/2019	Verde	ISVER04	Atardecer	2.5	1
09/06/2019	Verde	ISVER04	Atardecer	1.3	2
09/06/2019	Verde	ISVER04	Atardecer	2.9	1
09/06/2019	Verde	ISVER04	Atardecer	3.4	2
09/06/2019	Verde	ISVER04	Atardecer	2.5	1
09/06/2019	Verde	ISVER04	Atardecer	2.9	2
09/06/2019	Verde	ISVER04	Noche	2.0	1
09/06/2019	Verde	ISVER04	Noche	2.0	2
09/06/2019	Verde	ISVER04	Noche	1.6	1
09/06/2019	Verde	ISVER04	Noche	1.8	2
09/06/2019	Verde	ISVER04	Noche	3.2	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Amanecer	2.4	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Amanecer	2.0	2
10/06/2019	Verde	ISVER05	Amanecer	2.4	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Amanecer	3.3	2
10/06/2019	Verde	ISVER05	Amanecer	2.6	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Amanecer	2.8	2
10/06/2019	Verde	ISVER05	Mañana	10.0	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Mañana	4.1	2
10/06/2019	Verde	ISVER05	Cenit	3.0	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Cenit	2.2	2
10/06/2019	Verde	ISVER05	Cenit	2.6	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Cenit	2.7	2
10/06/2019	Verde	ISVER05	Cenit	3.3	1
10/06/2019	Verde	ISVER05	Cenit	2.3	2
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	7.8	1
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	7.3	2
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	9.3	1
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	10.2	2
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	9.2	1
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	8.5	2
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	9.0	3
10/06/2019	Verde	ISVER06	Atardecer	10.0	4

31/07/2019	Puerto Morelos	PM_01	Mañana	8.5	1
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_01	Mañana	8.0	2
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_01	Mañana	3.5	3
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_02	Cenit	10.5	1
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_02	Cenit	10.5	2
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_02	Cenit	10.5	3
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_02	Cenit	10.5	4
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_03	Cenit	5.3	1
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_03	Cenit	4.7	2
31/07/2019	Puerto Morelos	PM_03	Cenit	6.0	3
01/08/2019	Puerto Morelos	PM_04	Mañana	3.6	1
01/08/2019	Puerto Morelos	PM_04	Mañana	4.4	2
01/08/2019	Puerto Morelos	PM_04	Mañana	4.5	3
01/08/2019	Puerto Morelos	PM_04	Mañana	4.5	1
01/08/2019	Puerto Morelos	PM_04	Mañana	4.5	2
01/08/2019	Puerto Morelos	PM_04	Mañana	4.5	1
01/08/2019	Puerto Morelos	PM_04	Mañana	4.5	2
01/08/2019	Puerto Morelos	BONANZA	Cenit	2.3	1
01/08/2019	Puerto Morelos	BONANZA	Cenit	1.4	2
01/08/2019	Puerto Morelos	BONANZA	Cenit	2.0	3
01/08/2019	Puerto Morelos	BONANZA	Cenit	2.0	1
01/08/2019	Puerto Morelos	BONANZA	Cenit	2.0	2
01/08/2019	Puerto Morelos	BONANZA	Cenit	2.4	1
01/08/2019	Puerto Morelos	BONANZA	Cenit	2.5	2

Cuadro 5. Talla promedio ( $\pm$  DE) y número de organismos de *Elysia crispata* durante cada periodo del día en los arrecifes del artículo II.

Arrecife	Arcas		Verde		Puerto Morelos		
	Periodo	Talla (mm)	Núm. org.	Talla (mm)	Núm. org.	Talla (mm)	Núm. org.
Amanecer		28.3 $\pm$ 11.4	10	34.3 $\pm$ 10.3	68		
Mañana		29.4 $\pm$ 9.0	28	44.5 $\pm$ 12.9	30		
Cenit		26.4 $\pm$ 12.6	53	39.9 $\pm$ 10.9	124	18.4 $\pm$ 4.6	7
Atardecer		21.7 $\pm$ 6.7	27	39.9 $\pm$ 11.2	130		
Noche		32.8 $\pm$ 12.2	34	33.8 $\pm$ 11.1	169		



Apéndice II. Artículos publicados adicionalmente durante el desarrollo de este proyecto

## Article

# Evaluation of the Use of Autonomous Reef Monitoring Structures (ARMS) for Describing the Species Diversity of Two Coral Reefs in the Yucatan Peninsula, Mexico

Liliana A. Palomino-Alvarez <sup>1,2</sup>, Xochitl G. Vital <sup>2,3</sup>, Raúl E. Castillo-Cupul <sup>4</sup>, Nancy Y. Suárez-Mozo <sup>1,2</sup>, Diana Ugalde <sup>1,2</sup>, Gabriel Cervantes-Campero <sup>2</sup>, María R. Muciño-Reyes <sup>2,3</sup>, Pedro Homá-Canché <sup>4</sup>, Yoalli Quetzalli Hernández-Díaz <sup>2</sup>, Rosa Sotelo-Casas <sup>2</sup>, Maryjose García-González <sup>1,2</sup>, Yhutsin A. Avedaño-Peláez <sup>5</sup>, Alejandro Hernández-González <sup>1,2</sup>, Carlos E. Paz-Ríos <sup>6</sup>, Jose M. Lizaola-Guillermo <sup>7</sup>, Magdalena García-Venegas <sup>7</sup>, Yasmin Dávila-Jiménez <sup>2</sup>, Deneb Ortigosa <sup>8</sup>, Gema Hidalgo <sup>9,10</sup>, José L. Tello-Musi <sup>11</sup>, Mariana Rivera-Higuera <sup>12</sup>, Rigoberto Moreno Mendoza <sup>13</sup>, Mary K. Wicksten <sup>14</sup>, Rosana M. Rocha <sup>15</sup>, Leandro Vieira <sup>16</sup>, María Berenit Mendoza-Garfias <sup>17</sup>, Nuno Simões <sup>2,9,18</sup> and Edlin J. Guerra-Castro <sup>9,19,\*</sup>



**Citation:** Palomino-Alvarez, L.A.; Vital, X.G.; Castillo-Cupul, R.E.; Suárez-Mozo, N.Y.; Ugalde, D.; Cervantes-Campero, G.; Muciño-Reyes, M.R.; Homá-Canché, P.; Hernández-Díaz, Y.Q.; Sotelo-Casas, R., et al. Evaluation of the Use of Autonomous Reef Monitoring Structures (ARMS) for Describing the Species Diversity of Two Coral Reefs in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Diversity* **2021**, *13*, 579. <https://doi.org/10.3390/d13110579>

Academic Editors: Ku'ulei Rodgers and Michael Wink

Received: 8 October 2021  
Accepted: 5 November 2021  
Published: 12 November 2021

Received: 8 October 2021  
Accepted: 5 November 2021  
Published: 12 November 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; lily.drgalvar91@gmail.com (L.A.P.-A.); nancyyolimarbio@gmail.com (N.Y.S.-M.); diana.ugalde@ciencias.unam.mx (D.U.); maryjosegarcia@ciencias.unam.mx (M.G.-G.); arka-9999@hotmail.com (A.H.-G.); gabriel.cervantes.c@gmail.com (G.C.-C.); biolmucino@gmail.com (M.R.M.-R.); quetzalli.hernandez@ciencias.unam.mx (Y.Q.H.-D.); rosacarmensotelocasas@gmail.com (R.S.-C.); yaseg@ciencias.unam.mx (Y.D.-J.); ns@ciencias.unam.mx (N.S.)
- <sup>2</sup> Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación Sisal (UMDI-Sisal), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (FC, UNAM), Sisal 97356, Mexico; vital@ciencias.unam.mx (X.G.V.); gabriel.cervantes.c@gmail.com (G.C.-C.); biolmucino@gmail.com (M.R.M.-R.); quetzalli.hernandez@ciencias.unam.mx (Y.Q.H.-D.); rosacarmensotelocasas@gmail.com (R.S.-C.); yaseg@ciencias.unam.mx (Y.D.-J.); ns@ciencias.unam.mx (N.S.)
- <sup>3</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, Mexico
- <sup>4</sup> KALANBIO A. C., Research for Conservation. Calle 27 #76 int.4, Mérida 97125, Mexico; rulocastillo33@gmail.com (R.E.C.-C.); pedrohoma28@gmail.com (P.H.-C.)
- <sup>5</sup> Laboratorio de Sistemática de Invertebrados Marinos, Universidad del Mar, Campus Puerto Ángel, Oaxaca 70902, Mexico; yaap1005@gmail.com
- <sup>6</sup> Instituto de Ecología, Pesquerías y Oceanografía del Golfo de México, Campus VI, Universidad Autónoma de Campeche (EPOMEX-UAC), Campeche 24029, Mexico; carlepaz@uacam.mx
- <sup>7</sup> Departamento de Biología Marina, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km. 15.5 Carretera a Xmatkuil, Apartado Postal 116, Mérida 97315, Mexico; joselizaola.bm@gmail.com (J.M.L.-G.); venegas.mag98@gmail.com (M.G.-V.)
- <sup>8</sup> Colección Nacional de Moluscos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70-153, Ciudad de México 04510, Mexico; deneb.ortigosa@ciencias.unam.mx
- <sup>9</sup> Laboratorio Nacional de Resiliencia Costera (LANRESC), Laboratorios Nacionales, CONACYT, Sisal 97356, Mexico; gema.hidalgo@ccgs.mx
- <sup>10</sup> Centro del Cambio Global y la Sustentabilidad A.C., Villahermosa 86080, Mexico
- <sup>11</sup> Laboratorio de Zoología UNAM, FES Iztacala, Avenida de los Barrios No. 1, Colonia Los Reyes Ixtacala, Tlalnepantla 54090, Mexico; jltm@unam.mx
- <sup>12</sup> Marine Science Institute, The University of Texas, 750 Channel View Drive, Port Aransas, TX 78373, USA; m.rivera-higuera@utexas.edu
- <sup>13</sup> Programa de Doctorado en Ciencias con Mención en Biodiversidad y Biorecursos, Facultad de Ciencias, Universidad Católica de la Santísima Concepción, Alonso de Ribera, Concepción 2850, Chile; rmoreno@doctorado.ucsc.cl
- <sup>14</sup> Department of Biology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA; m-wicksten@tamu.edu
- <sup>15</sup> Zoology Department, Universidade Federal do Paraná, UFPR, CP 19020, Curitiba 81531-980, Brazil; rmrocha@ufpr.br
- <sup>16</sup> Centro de Biociências, Laboratório de Estudos de Bryozoa (LAEbry), Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50670-901, Brazil; leandromanzoni@gmail.com
- <sup>17</sup> Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad 1 LaNaBio, IBUNAM, Ciudad de México 04510, Mexico; berenit@ib.unam.mx
- <sup>18</sup> International Chair for Coastal and Marine Studies, Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies, Texas A and M University-Corpus Christi, Corpus Christi, TX 78412, USA
- <sup>19</sup> Departamento de Sistemas y Procesos Naturales, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Mérida, Universidad Nacional Autónoma de México, Mérida 97357, Mexico

## Marine Record

**Cite this article:** Vital XG, Palomino-Alvarez LA, Ortigosa D, Guerra-Castro EJ, Simões N (2023). Sea slugs (Gastropoda: Heterobranchia) associated with Autonomous Reef Monitoring Structures (ARMS) in southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 103, e50, 1–14. <https://doi.org/10.1017/S0025315423000334>

Received: 27 October 2022  
Revised: 11 March 2023  
Accepted: 13 May 2023

**Keywords:**  
coral reefs; cryptic species; diversity; Mollusca; western Atlantic

**Corresponding author:**  
Nuno Simões;  
Email: [ns@ciencias.unam.mx](mailto:ns@ciencias.unam.mx)

© The Author(s), 2023. Published by Cambridge University Press on behalf of Marine Biological Association of the United Kingdom. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution and reproduction, provided the original article is properly cited.



# Sea slugs (Gastropoda: Heterobranchia) associated with Autonomous Reef Monitoring Structures (ARMS) in southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean Sea

Xochitl G. Vital<sup>1,2</sup>, Lilian A. Palomino-Alvarez<sup>2,3</sup>, Deneb Ortigosa<sup>4,5</sup>, Edlin J. Guerra-Castro<sup>5,6</sup> and Nuno Simões<sup>2,5,7</sup>

<sup>1</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Posgrado, Edificio D, 1<sup>o</sup> Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Alcaldía Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico; <sup>2</sup>Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación Sisal (UMDI-SISAL), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Sisal, Yucatán, Mexico; <sup>3</sup>Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Ciudad Universitaria 3000, C.P. 04510, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico; <sup>4</sup>Colección Nacional de Moluscos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico; <sup>5</sup>Laboratorio Nacional de Resiliencia Costera, CONACYT, Ciudad de México, Mexico; <sup>6</sup>Departamento de Sistemas y Procesos Naturales, Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad Mérida, Universidad Nacional Autónoma de México, Mérida, Yucatán, Mexico and <sup>7</sup>Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studies, Texas A&M University–Corpus Christi, Corpus Christi, TX, USA

## Abstract

Cryptic species in coral reefs, such as sea slugs, represent an important portion of their biodiversity, which is usually underestimated. Autonomous Reef Monitoring Structures (ARMS) have been implemented to estimate cryptic diversity in coral reefs. Therefore, this research aimed to contribute to the southern Gulf of Mexico (GM) and the Caribbean Sea (CAR) coral reefs' sea slugs' diversity and distribution using ARMS as a collection method. Fifty-eight ARMS were placed at three coral reefs in the GM and CAR, recovered after 1–2 years and then, disassembled at the laboratory. Plates were individually placed in trays with seawater, where we searched for sea slugs. A total of 242 organisms were found belonging to 31 species; 20 of them were identified to the species level, while 11 were determined up to genus or family. More than half of the species (19) were found in Bajo de 10 (GM), while 15 species were found in the CAR localities. Unlike previous studies, we assessed sea slugs' diversity exclusively by an indirect sampling method. In this work, we found 9.4% of the sea slug diversity recorded in the Caribbean, and we report four determined species for the first time in the country. New records of species, and even one family for the GM stress the gap of information that we still need to fulfil in the area. We recognize ARMS as a useful tool to find juvenile, cryptic and rare species of sea slugs, as well as to standardize their quantification and record their diversity.

## Introduction

Invertebrates in coral reefs represent a critical ecological role in biodiversity because they can be engaged in intricate relationships, impacting the reef integrity and structure (Glynn and Enochs, 2011). To know these complex interactions and how they can affect the coral reefs, we need more information regarding invertebrates, including describing their diversity. Diversity in these ecosystems has been measured mostly with well-studied (e.g. corals) or visible macrofauna, but few studies address small invertebrates, which are harder to find, and whose taxonomy is less known (Plaisance *et al.*, 2011). The biodiversity associated with coral reefs is usually miscalculated because numerous areas are poorly studied or sampled, and most of the reef species are cryptic, small-sized organisms living in holes or cracks, sometimes being nocturnal and/or well camouflaged in their habitat, then unnoticed (Glynn and Enochs, 2011).

Cryptic species in coral reefs, such as sea slugs, represent an important portion of reef biodiversity (Plaisance *et al.*, 2011; Jensen, 2013). Describing the diversity of sea slugs is difficult since their recording and identification require experience in collecting techniques, and a trained eye to locate them, as they are very small and well-camouflaged (Jensen, 2013; Goodheart *et al.*, 2016). Worldwide, most of the recorded species of sea slugs are located in coral reefs of the Indo-Pacific Ocean, where it is estimated that 15–40% of the species are still undescribed (Gosliner *et al.*, 2018). In the Gulf of Mexico (GM) and the Caribbean Sea (CAR), circa 350 species are present (Valdés *et al.*, 2006; García and Bertsch, 2009; Rosenberg *et al.*, 2009; Redfern, 2013); the Caribbean is considered one of the richest regions regarding sea slugs (García and Bertsch, 2009). Many species complex have been described recently in the region and divided into new species for different groups of sea slugs (e.g. Ornelas-Gatdula *et al.*, 2012; Krug *et al.*, 2016; Ghanimi *et al.*, 2020; García-Méndez *et al.*, 2022). Records in the Mexican Atlantic coast are mostly from the southern GM (Campeche

## Marine Record

**Cite this article:** Puente-Tapia FA, Ortigosa D, Vital XG, Palomino-Alvarez LA (2023). First record of a benthic ctenophore in the Mexican Atlantic: *Vallicula multiformis* (Platyctenida, Coeloplanidae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **103**, e47, 1–5. <https://doi.org/10.1017/S0025315423000401>

Received: 14 January 2023

Revised: 25 May 2023

Accepted: 14 June 2023

### Keywords:

ARMS; Caribbean Sea; comb jellies; Gulf of Mexico; platyctenids

### Corresponding author:

Lilian A. Palomino-Alvarez;  
Email: [lily.drgalvar91@gmail.com](mailto:lily.drgalvar91@gmail.com)

© The Author(s), 2023. Published by Cambridge University Press on behalf of Marine Biological Association of the United Kingdom. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution and reproduction, provided the original article is properly cited.



# First record of a benthic ctenophore in the Mexican Atlantic: *Vallicula multiformis* (Platyctenida, Coeloplanidae)

Francisco Alejandro Puente-Tapia<sup>1</sup>, Deneb Ortigosa<sup>2,3</sup>, Xochitl G. Vital<sup>4,5</sup> and Lilian Abigail Palomino-Alvarez<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup>Gabinete de Zooplancton, Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INIDEP-COMICET), Mar del Plata, Argentina; <sup>2</sup>Colección Nacional de Moluscos, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (IB, UNAM), Ciudad de México, México; <sup>3</sup>Laboratorio Nacional de Resiliencia Costera (LANRESC), sin domicilio físico, México; <sup>4</sup>Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación Sisal (UMDI-Sisal), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (FC, UNAM), Yucatán, México; <sup>5</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México and <sup>6</sup>Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México (PCML, UNAM), Ciudad de México, México

## Abstract

Ctenophores are one of the least known invertebrate phyla in Mexico, especially the benthic forms in which studies are incomplete and infrequent, lacking information about their ecology and diversity. As part of the environmental monitoring project 'Biodiversidad Marina de Yucatán' conducted in the southern Gulf of Mexico and Mexican Caribbean Sea, the benthic ctenophore *Vallicula multiformis* (Coeloplanidae) was identified in association with green algae in the southern Gulf of Mexico, and on an autonomous reef monitoring structure in the Mexican Caribbean Sea. This finding represents the first record of the occurrence of a benthic ctenophore species in Mexican waters. We provide morphological characteristics of *V. multiformis* in both reef areas. Recording this species increases the known number of Mexican ctenophore fauna from 33 to 34 taxa and represents baseline information for the continuous study of the ecology and diversity of benthic ctenophores in Mexico.

## Introduction

Ctenophora are a small and well-defined group of planktonic and benthic predators, they can be found exclusively in most marine habitats, from polar to tropical, inshore and offshore and from near the surface to the deep sea and benthic environments (Mianzan *et al.*, 2009; Mills, 2010). They are sometimes called 'comb jellies' because they have a jelly-like appearance and distinctive comb rows or cilia plates (ctenes) used for locomotion (Tamm, 2014). Comb jellies, except those in the family Beroidae (Carré and Carré, 1989), have two opposed and fast ductile tentacles for catching and delivering prey to their digestive tract (von Byern *et al.*, 2010). Nevertheless, some of this and other morphological characteristics are absent in benthic ctenophores; most have lost the ctene rows as adults (as an adaptation to bottom condition) and, thus, the ability to swim in the adult phase (Mianzan, 1999; Oliveira and Migotto, 2007). These ctenophores are planktonic organisms and have ctene rows only as larvae. After their planktonic larvae settle down, the often brightly coloured benthic adults resemble nudibranchs or flatworms instead of ctenophores (Mills and Haddock, 2007; Mills, 2010). Benthic ctenophores have branched tentacles similar to those of cydippid species. This feature often allows observers to recognize these organisms as ctenophores (Mills, 2010). The highly flattened and modified body are some of the features that differentiate benthic ctenophores from 'typical' planktonic forms (Mills and Haddock, 2007; Oliveira and Migotto, 2007).

According to Mills (1998–present), there are approximately 200 species of Ctenophora, of which 50 species are benthic forms. Benthic ctenophores belong to the order Platyctenida, also known as platyctenes, and live on the bottom or as epibionts on other organisms such as algae or animals (Mills, 1998–present). This order has five families, of which Coeloplanidae is the largest with two genera: *Coeloplana* with 33 species and *Vallicula* that only includes the conspicuous species of *V. multiformis* Rankin, 1956 (Mills, 1998–present). Morphological identification of coeloplanid species is challenging because of their flexible shapes (Alamaru *et al.*, 2017). However, *V. multiformis* can be easily distinguished by the following characters: the anchor-shaped tentacle sheath, the blind ends of the canals near to the body margins and the presence of an oral groove connecting the base of the tentacle sheaths with the mount (Rankin, 1956). Its spatial distribution includes the Atlantic, Northeastern Pacific and Northern Indian waters where it has been observed on different substrates, including biotic and abiotic (Mills and Haddock, 2007; Miyake *et al.*, 2019), predominantly in a sessile state, however, the species has also shown floating and crawling behaviour (Rankin, 1956).

A total of 33 ctenophore taxa have been identified in Mexican waters, of which seven have been recorded recently in the Mexican Caribbean Sea, and 12 taxa in jurisdictional waters of the Gulf of Mexico (see Puente-Tapia *et al.*, 2021). This ctenophore diversity is represented