



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

**Implicaciones funcionales de la variación de la pigmentación de  
corales simbióticos**

Fotoaclimatación vs blanqueamiento de coral

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

(Biología Marina)

PRESENTA:

**M. en C. Tim Scheufen**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**DRA. SUSANA ENRÍQUEZ DOMÍNGUEZ**

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR  
Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS)

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. ROBERTO IGLESIAS-PRIETO**

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR  
Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS)

**DR. MARTÍN MERINO IBARRA**

(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)

**DR. JUAN PABLO CARRICART GANIVET**

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR  
Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS)

**DR. HÉCTOR REYES BONILLA**

(UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR)

**PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, enero, 2020**



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.



## **Implicaciones funcionales de la variación de la pigmentación de corales simbióticos**

Fotoaclimatación vs blanqueamiento de coral

### **TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

(Biología Marina)

PRESENTA:

**M. en C. Tim Scheufen**

**TUTORA PRINCIPAL:**

**DRA. SUSANA ENRÍQUEZ DOMÍNGUEZ**

(UNIDAD ACÁDEMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS)

**COMITÉ TUTOR:**

**DR. ROBERTO IGLESIAS-PRieto**

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS)

**DR. MARTÍN MERINO IBARRA**

(INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA)

**DR. JUAN PABLO CARRICART GANIVET**

(UNIDAD ACADÉMICA DE SISTEMAS ARRECIFALES, INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA, PUERTO MORELOS)

**DR. HÉCTOR REYES BONILLA**

(UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR)

**PUERTO MORELOS, QUINTANA ROO, enero, 2020**

# Dedicatoria

A Heidi y Emma

Las amo

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para los estudios doctorales (CVU 391878).

Al proyecto FORCE, Future of Reefs in Changing Enviroments (PFP7-FORCE-244161) por haber otorgado apoyo económico a este trabajo.

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (PCMyL) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al personal académico y docente de la Unidad de Sistemas Arrecifales (UASA-UNAM).

Al proyecto DGAPA (IN206710) y CONACYT (Conv-CB-2009: 129880) otorgados a la Dra. Susana Enríquez los cuales financiaron este proyecto de investigación.

A la directora de tesis, Dra. Susana Enríquez y a los miembros del comité tutor, Dr. Roberto Iglesias-Prieto, Dr. Martin Merino-Ibarra, Dr. Juan Pablo Carricart-Ganivet y Dr. Hector Reyes Bonilla, gracias por sus comentarios y apoyo durante este proceso.

Se agradece al servicio Académico de Meteorología y Oceanografía (SAMMO) de la UASA del ICML de la UNAM a cargo del M. en C. Francisco Gerardo Ruiz- Rentería y M. en C. José Edgar Escalante-Mancera por los datos otorgados de irradiancia y temperatura utilizados de este trabajo.

Mencionar y agradecer a todos que tuvieron un impacto, sea directo o indirecto, sobre este trabajo sería imposible en este lugar. Todos ellos que no solo contribuyeron a este trabajo, sino a hacerme una persona mas completa. Pero créanme que están en mi mente y en mi corazón todo el tiempo. Aquí quiero tomar el tiempo para enumerar algunos de aquellos.

A mi esposa Heidi, por su enorme paciencia, su apoyo y su amor. No creo que sin ella hubiera tenido la fuerza de terminar este trabajo. Gracias por todo.

A mi hija, Emma, que me está enseñando disfrutar cada momento de la vida. Te amo mucho mi pequeño tesoro.

Meinen Eltern. Ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Dank, dass ihr immer an mich geglaubt habt.

A Susana Enríquez que no sólo ha sido la asesora de mi tesis, pero también mi guía en el mundo de fotobiología. Gracias por aceptarme a tu laboratorio, por la confianza en mi y por los miles de horas que representa este trabajo.

A Roberto Iglesias-Prieto por sus comentarios y consejos. Gracias por compartir tu conocimiento de los corales y de la fotobiología conmigo.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a Roman y Wiebke. Gracias por el tiempo compartido, las salidas al campo, las horas en el laboratorio y las horas fuera del mismo. Y a los demás colegas del laboratorio 3 y 4, en particular a Nancy, Miguel, Tati y Luisito.

A todos que he olvidado.

## Implicaciones funcionales de la variación de la pigmentación de corales simbióticos

### Fotoaclimatación vs blanqueamiento de coral

#### Resumen

Corales escleractíneos están los constructores principales de arrecifes coralinos, dándolos su forma y estructura, soportando un ecosistema que se encuentra, debido a sus servicios biológicos, económicos y sociales, entre los ecosistemas marinos más valiosos. El clave para el éxito de los corales en aguas oligotróficas es su simbiosis con dinoflagelados unicelulares de la familia *Symbiodiniaceae*. Gracias a este simbiosis los corales reciben energía en forma de fotosintatos producido por los simbiontes. Hoy en día estamos en peligro de perder este ecosistema. Los corales y sus simbiontes están amenazados por el aumento de la temperatura inducido por el cambio climático. Eventos de temperaturas elevadas del agua no comunes en una determinada región (anomalías térmicas) pueden inducir una cadena de ajustes causar daño en el aparato fotosintético que son similares a la fotoaclimatación a alta luz. En el inicio se observa una reducción de la sección transversal de los pigmentos, lo que resulta en una disminución de la pigmentación. En su extremo esta cadena de ajustes puede llevar a la ruptura de la simbiosis y la expulsión masiva de simbiontes por el coral. A estos eventos se llaman el blanqueamiento de coral como el esqueleto blanco se hace visible a través del tejido del coral y el coral parece blanco. Junto con el daño por la temperatura, la luz, la fuente de la energía del coral y de sus simbiontes, se convierte en una fuente de estrés también. Ambos, la luz y la temperatura pueden inducir ajustes en el holobionte de coral. En los simbiontes se puede observar cambios de la pigmentación, mientras a lo largo de la colonia de coral, hay un ajuste de la densidad de simbiontes. Debido a los cambios estacionales de ambos factores ambientales, se puede observar ciclos anuales en la densidad de simbiontes y de su pigmentación. Estos ciclos anuales presentan una mayor densidad de simbiontes, pero poco pigmentados, en el invierno y una menor densidad de simbiontes más pigmentados en el verano. Los ajustes internos inducidos por los cambios estacionales de los factores ambiental muestran que el proceso que lleva al blanqueamiento es un incremento gradual de la palidez. Por eso no es una sorpresa que es difícil distinguir entre un coral pálido, pero funcional, y un coral blanqueado no funcional. A pesar de que temperaturas elevadas han sido identificadas como el factor principal de estrés que induce el blanqueamiento de coral, es la combinación del efecto de la alta temperatura con el estrés lumínico que sienten los simbiontes *in hospite* lo que representa una amenaza a la estabilidad de la simbiosis. Por lo tanto, las características ópticas juegan un papel importante en entender los mecanismos del blanqueamiento de coral. Esfuerzos por conocer las características ópticas de los corales se remontan en trabajos similar al estudios ópticos del fitoplancton. Así extrajeron los simbiontes para investigar sus características ópticas. Sin embargo, investigaciones de la estructura intacta del coral documentaron un extraordinario incremento de la eficiencia de absorción de luz de las algas simbiontes *in hospite*, relativa a su capacidad de absorción en suspensión.

Investigaciones a micro-escala revelaron cambios del campo lumínico dentro del tejido del coral. A pesar del gran número de estudios enfocados a entender el blanqueamiento, los cambios estacionales y espaciales, en el ajuste de los corales a la variación ambiental, los cambios en el campo lumínico en el interior del tejido, o los cambios en las propiedades ópticas del esqueleto de coral o de la estructura intacta, todavía se conoce poco cómo la variación de las propiedades ópticas de un coral condicionan o regulan otras propiedades funcionales como la tasa de fotosíntesis y calcificación en corales escleractíneos. Entender cómo se ajustan estos procesos permitirá entender la dinámica de variación del ajuste fotoaclimatativo al ambiente. Las implicaciones funcionales de estos ajustes son también muy relevantes pues pueden contribuir a entender la diversidad de respuestas de los corales a la variación espacio-temporal de la temperatura y la luz, explicar diferencias en su productividad y crecimiento en el arrecife, y también la diferente sensibilidad entre especies durante eventos extremos de calentamiento. Es cierto que existe una comprensión cada vez mejor de la importancia del campo lumínico dentro de los corales. Sin embargo, falta todavía una mejor comprensión: (1) del papel central que juegan los simbioses y su pigmentación en regular las propiedades ópticas de los corales, y (2) de las implicaciones funcionales de estos cambios ópticos para el desempeño del coral. Para profundizar en el conocimiento de las relaciones forma-función de los corales, y específicamente el efecto de la variación de la pigmentación sobre la óptica y la fisiología de los organismos simbioses, analicé la respuesta de cuatro especies de coral constructoras arrecifales en el Caribe (*Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa*, *Pseudodiploria strigosa*) y de sus simbioses a estrés térmico durante tres “fases estacionales”: final del invierno, e inicio y final del verano. Este enfoque permitió no solo analizar un espectro amplio de variabilidad estructural y funcional en cuatro especies, sino también incluir el componente estacional en el análisis, lo que implica examinar diferentes fenotipos de coral aclimatados de forma natural al invierno (fenotipo de invierno) o al verano (fenotipo de verano), sino también en la condición fisiológica del coral que normalmente enfrenta los eventos de calentamiento durante el verano (fenotipo de principio de verano). El estudio de las relaciones forma-función, y en concreto su aplicación para el estudio de organismos fotosintéticos, permite entender diferencias entre especies y/o poblaciones (morfortipos) en las habilidades competitivas, abundancias de especies y distribución de nicho. La comparación de la variabilidad natural entre especies y entre fenotipos estacionales confirmó los ciclos anuales y mas allá de eso permitió encontrar dos estrategias diferentes de los ajustes del holobionte de coral. La primera incluye corales capaz de albergar una gran densidad de simbioses poco pigmentados, representado por las dos *Orbicellas spp.*, mientras la otra incluye corales con menos simbioses, pero mas pigmentados, representado por *M. cavernosa* y *P. strigosa*. Además de la existencia de diferencias de las respuestas a estrés térmico de las cuatro especies y las dos fenotipos investigados, se encontraron grandes similitudes en su aclimatación estacional y en la susceptibilidad de cada fenotipo al estrés. Aquí las mayores caídas de productividad en el fenotipo de verano implican que la variabilidad estacional no está sólo regulada por cambios estacionales en luz y

temperatura, sino que debe existir un componente intrínseco. La comparación de los dos fenotipos estacionales además muestra que las disminuciones en la pigmentación y el  $F_v/F_m$  son insuficientes para identificar el blanqueamiento. Lo que subraya el argumento en favor de un descriptor más fuerte para indicar el blanqueamiento. Los resultados de este estudio no solo evidencian la importancia de los simbioses y de su habilidad para fotoaclimatarse a condiciones de alta luz en la determinación de la susceptibilidad de los corales simbióticos al estrés térmico, sino también demuestran que esta susceptibilidad depende de la condición fisiológica del hospedero (i.e., su fenotipo) y no sólo de la variabilidad genética/funcional de la población de simbioses. Estos resultados también evidencian la relevancia de la variabilidad estacional en la fisiología del holobionte para entender la estabilidad de esta simbiosis y el blanqueamiento de coral. El análisis morfo-funcional incluyendo todos los descriptores muestra que las propiedades ópticas dependen de la variación de la pigmentación, sea por cambios en el  $C_i$  o en la densidad de simbioses. Además, la productividad tiene una correlación con la eficiencia de absorber la luz y claramente muestra la importancia de  $a^*$  para definir el blanqueamiento. En esta tesis no sólo se describe la diferente sensibilidad al estrés térmico de cuatro especies de coral, sino también se revela la diferente sensibilidad de al estrés térmico de dos fenotipos estacionales. Y señalando por primera vez la importancia de distinguir entre los corales simbióticos estresados y blanqueados.

## Functional implications of the variation of the pigmentation of symbiotic corals Photoacclimation vs coral bleaching

### Abstract

Scleractinian corals are the main builders of coral reefs giving them their structure and help to support an ecosystem, which, due to its biological, economical and sociological services, is among the most valuable marine ecosystems. The key to the success of corals to grow in oligotrophic waters is their symbiosis with unicellular dinoflagellates of the family *Symbiodiniaceae*. Thanks to this symbiosis, the corals receive energy in form of photosynthates produced by their symbionts. Today we are in danger of losing this ecosystem. The corals and their symbionts are threatened by the climate change induced increases in temperature. Events with temperatures above average (thermal anomalies) can induce a chain reaction of adjustments and damage in the photosynthetic apparatus, which are similar to the adjustments during photoacclimation to high light. At the beginning, a reduction of the pigment cross-section, which leads to a reduction in total pigmentation, can be observed. In its extreme, this chain of adjustments can lead to the rupture of the symbiosis and the mass expulsion of the symbionts. These events are called coral bleaching, as the white coral skeleton becomes visible through the otherwise colorless coral tissue and the coral appears white. Together with the damage caused by the temperature increase, light, the source of energy for the coral and its symbionts, becomes in a stressor as well. Both, light and temperature, can induce adjustments in the coral holobiont. A decrease in pigmentation can be observed in the symbionts, while at the scale of the whole coral colony a change in symbiont density becomes visible. As both environmental factors change seasonally, annual cycles of the symbiont density and the pigmentation can be observed. These annual cycles result in a higher symbiont density with a lower pigmentation per symbiont in the winter and a lower symbiont density with a higher pigmentation in the summer. The internal adjustments, which are induced by the seasonal changes of the environmental factors, show that the processes leading to coral bleaching are gradual increases in paleness of the coral. Therefore, it is no surprise that it is difficult to distinguish between a pale but functional coral and a bleached, non-functional coral. Although high temperatures have been identified as the principal stressor inducing coral bleaching, it is the combined effect of high temperature and light stress, sensed by the symbionts *in hospite*, which represents a threat to the stability of the symbiosis. The optical properties, therefore, play an important role in understanding the mechanisms of coral bleaching. Efforts to understand the optical characteristics of corals are based in studies using technique from phytoplankton research. Hence the symbionts were extracted to investigate their optical characteristics. However, studies of the intact coral structure have shown an extraordinary increase of the absorption efficiency of the symbionts *in hospite* relative to their absorption efficiency while in suspension. Research into the micro-scale of the tissue and the skeleton revealed changes of the light field within the coral tissue. Despite of the large

number of studies looking into coral bleaching, seasonal and spatial changes, the changes in the light field inside the coral tissue, or changes of the optical properties of the coral skeleton, there is a lack of knowledge about how the variation in optical properties of a coral regulate other functional properties like the photosynthetic rate or calcification. Understanding how these processes adjust will allow to understand the dynamics of variation of the photoacclimatization adjustment to the environment. The functional implications of these adjustments are very important, as they can contribute to the understanding of the diverse responses of coral to the spatio-temporal variation of the temperature and the light, explain the differences in their productivity and growth, and the differences in sensitivity between coral species during extreme temperature events. It is true that there is an increasingly better understanding of the importance of the light field within corals. However, a better understanding of (1) the central role of the symbionts and their pigmentation in regulating the optical properties, and (2) the functional implications of these optical changes for the coral performance are still missing. To deepen the knowledge of the form-function relationships of corals, and specifically the effect of pigment variation on the optics and physiology of corals, I analyzed the response of four Caribbean coral reef building species (*Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa*, *Pseudodiploria strigosa*) and their symbionts to thermal stress during three “seasonal phases”: end of winter, and beginning and end of summer. This approach allowed not only to analyze a wide range of the structural and functional variability of the four species, but also include a seasonal component in the analysis. This way different coral phenotypes, naturally acclimated to winter (winter phenotype) and summer (summer phenotype), could be analyzed, but also physiological condition of the coral, which normally faces the heating event during the summer (initial summer phenotype). The analysis of the form-function relationship and, more precisely, their implications for the studies of photosynthetic organisms, allows to understand differences between species and/or populations (morphotypes) in competitive skills, abundance of species and niche distribution. The comparison of the natural variability between species and between seasonal phenotypes confirmed the annual cycles and beyond that allowed to find two different strategies of coral holobiont adjustments. The first includes corals capable of harboring a higher density of low pigmented symbionts, represented by the two *Orbicellas spp.*, while the second strategy includes corals with a lower density of highly pigmented symbionts, represented by *M. cavernosa* and *P. strigosa*. In addition to the existence of differences in the responses to thermal stress of the four species and the two phenotypes investigated, great similarities were found in their seasonal acclimatization and in the susceptibility of each phenotype to stress. Here the largest decreases in productivity in the summer phenotype imply that seasonal variability is not only regulated by seasonal changes in light and temperature, but that an intrinsic component must exist. The comparison of the two seasonal phenotypes also shows that the decreases in pigmentation and Fv/Fm are insufficient to identify bleaching. The results of this study not only show the importance of symbionts and their ability to photoacclimate to high light conditions in determining the susceptibility of

symbiotic corals to thermal stress, but also demonstrate that this susceptibility depends on the physiological condition of the host (ie, its phenotype) and not only the genetic/functional variability of the symbiont population. These results also show the relevance of seasonal variability in the physiology of the holobiont to understand the stability of this symbiosis and coral bleaching. The morpho-functional analysis including all the descriptors shows that the optical properties depend on the variation of the pigmentation, either by changes in the pigmentation per symbiont or in the symbiont density. In addition, the productivity correlates with the light absorption efficiency and clearly shows the importance of  $a^*$  in defining bleaching. This thesis not only describes the different sensitivity to thermal stress of four coral species, but also reveals the different sensitivity to thermal stress of two seasonal phenotypes. And pointing out for the first time the importance of distinguishing between stressed and bleached symbiotic corals.

## Contenido

<b>Capítulo 1 - Marco teórico.....</b>	<b>16</b>
1.1 Introducción general.....	16
1.2 Antecedentes.....	21
1.3 Preguntas y objetivos.....	28
1.4 Esquema de este estudio y organización de los capítulos.....	29
1.5 Materiales y Métodos.....	31
1.5.1 Parámetros ambientales.....	31
1.5.2 Área de estudio.....	31
1.5.3 Determinación de la densidad de clorofila a, del número de simbioses y de la cantidad de proteína soluble en el tejido.....	35
1.5.4 Determinación de las propiedades ópticas.....	35
1.5.5 Determinaciones de las tasas de fotosíntesis y respiración.....	39
1.5.6 Determinación de las tasas de calcificación.....	40
1.5.7 Análisis de datos.....	41
1.6 Literatura citada.....	42
<b>Capítulo 2 – Análisis comparativo de cuatro especies de coral y de tres fenotipos estacionales utilizando descriptores estructurales y funcionales.....</b>	<b>49</b>
2.1 Introducción.....	49
2.2 Materiales y métodos.....	54
2.3 Resultados.....	55
2.3.1 Descripción de las características de las cuatro especies examinadas.....	55
2.3.2 Diferencias estacionales.....	59
2.4 Discusión.....	64
2.4.1 Caracterización general de las cuatro especies de coral.....	65
2.4.2 Cambios estacionales.....	67
2.5 Literatura citada.....	71
<b>Capítulo 3 - Efecto del estrés térmico sobre la fisiología de dos condiciones fisiológicas del coral, invierno y verano.....</b>	<b>75</b>
3.1 Introducción.....	75
3.2 Materiales y Métodos.....	76
3.3 Resultados.....	78
3.3.1 Efecto de la temperatura sobre el metabolismo de coral ( $Q_{10}$ ).....	78
3.3.2 Análisis experimental de la respuesta de cuatro especies de coral y dos fenotipos estacionales al estrés térmico.....	79
3.4 Discusión.....	88
3.5 Literatura citada.....	96

<b>Capítulo 4 - Análisis alométrico.....</b>	<b>100</b>
4.1 Introducción .....	100
4.2 Materiales y Métodos.....	102
4.2.1 Análisis de datos .....	102
4.3 Resultados .....	103
4.3.1 Variabilidad estructural y funcional de los corales no-estresados.....	103
4.3.2 Análisis de los componentes principales (PCA) de los holobiontes no estresados .....	106
4.3.3 Variabilidad estructural y funcional de los corales estresados .....	108
4.3.4 Asociación de variación entre los cambios en pigmentación del coral y sus propiedades ópticas.....	109
4.3.5 Análisis de los componentes principales (PCA) de los corales estresados.....	110
4.3.6 Variabilidad de las propiedades ópticas del holobionte.....	112
4.3.7 Análisis de regresión múltiple .....	119
4.3.8 Asociación entre los descriptores ópticos y la tasa fotosintética del holobionte.....	120
4.4 Discusión.....	128
4.4.1 Variabilidad entre especies de coral .....	131
4.4.2 Variabilidad entre fenotipos.....	133
4.5 Literatura citada.....	135
<b>Capítulo 5 - Conclusiones generales.....</b>	<b>137</b>
5.1 Literatura citada.....	145
<b>Capítulo 6 – Anexos.....</b>	<b>148</b>
6.1 Anexo A.....	148

## Índice de figuras

Figura 1.1 Mapa de la área de estudio.....	32
Figura 1.2 Climatología de la laguna de Puerto Morelos.....	33
Figura 1.3 Fotos del sistema de los tanques experimentales.....	34
Figura 1.4 Espectros de emisión de las lámparas usadas.....	36
Figura 1.5 Esquema y fotos de la metodología utilizada para las determinaciones de reflectancia.....	37
Figura 1.6 Ejemplos de espectros de reflectancia medidos a ángulos y distancias diferentes.....	38
Figura 2.1 Variabilidad natural de las cuatro especies.....	56
Figura 2.2 Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras iniciales .....	58
Figura 2.3 Cambios estacionales de los rasgos estructurales .....	61
Figura 2.4 Cambios estacionales de los descriptores ópticos .....	62
Figura 2.5 Cambios estacionales de la fisiología.....	64
Figura 3.1 Exposición diurna en los tanques experimentales .....	77
Figura 3.2 Respuestas a la temperatura de las tasas metabólicas.....	79
Figura 3.3 Cambios en los atributos estructurales de los fenotipos de invierno y verano.....	84
Figura 3.4 Cambios en los atributos funcionales de los fenotipos de invierno y verano .....	85

Figura 3.5 Análisis de componentes principales (PCA) de los corales no-estresados y estresados.....	87
Figura 4.1 La variación entre los fenotipos no-estresados, estresados y blanqueados.....	105
Figura 4.2 Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras no-estresadas.....	108
Figura 4.3 Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras no-estresadas, estresadas y blanqueadas.....	112
Figura 4.4 Descripción de la asociación entre absorptancia y cambios en la densidad de clorofila a.....	113
Figura 4.5 Trayectorias diferentes de la absorptancia.....	114
Figura 4.6 Variación de la absorptancia en función de los cambios en el contenido celular de pigmentos de los simbiotes (Ci).....	115
Figura 4.7 Descripción de la variación de la absorptancia y coeficiente específico de absorción de luz ( $a^*_{Chla}$ ).....	117
Figura 4.8 Descripción de las asociaciones de variación entre la densidad de clorofila a y los coeficientes específicos de absorción.....	122
Figura 4.9 Descripción de la asociación de variación entre la densidad de simbiotes y la variación de su contenido celular de clorofila a, Ci.....	123
Figura 4.10 Análisis de rutas de <i>O. annularis</i> .....	125
Figura 4.11 Análisis de rutas de <i>O. faveolata</i> .....	126
Figura 4.12 Análisis de rutas de <i>M. cavernosa</i> .....	127
Figura 4.13 Análisis de rutas de <i>P. strigosa</i> .....	128
Figura 5.1 Modelo teórico del efecto del contenido celular de pigmentos, Ci, y del número de simbiotes $a^*_{Chla}$ .....	139

## Índice de tablas

Tabla 2.1 Resumen de los descriptores y atributos de corales.....	50
Tabla 2.2 Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de las muestras iniciales.....	58
Tabla 3.1 Resultados del análisis de componentes principales (PCA).....	88
Tabla 4.1 Niveles de estrés y sus criterios. Basados en su estados de Fv/Fm y Pmax, las muestras experimentales fueron agrupado en no-estresados, estresados y blanqueados.....	103
Tabla 4.2 Resultados del PCA de los corales no-estresados.....	107
Tabla 4.3 Resultados del PCA de los corales no-estresados, estresados y blanqueados.....	110
Tabla 4.4 Correlación de Pearson entre los descriptores ópticos, estructurales y foto-fisiológicos.....	118
Tabla 4.5 Correlaciones de Pearson de <i>O. annularis</i> .....	124
Tabla 4.6 Correlaciones de Pearson de <i>O. faveolata</i> .....	125
Tabla 4.7 Correlaciones de Pearson de <i>M. cavernosa</i> .....	126
Tabla 4.8 Correlaciones de Pearson de <i>P. strigosa</i> .....	127
Tabla 6.1 Valores promedios de los descriptores en el invierno.....	148

Tabla 6.2 ANOVA de una vía del efecto de la temperatura en marzo 2011 .....	150
Tabla 6.3 Valores promedios de los descriptores en el verano.....	151
Tabla 6.4 ANOVA de una vía del efecto de la temperatura en octubre 2011 .....	153
Tabla 6.5 Valores promedios Fv/Fm.....	154
Tabla 6.6 ANOVA de dos vías de la variación de Fv/Fm en marzo y octubre .....	155

## Capítulo 1 - Marco teórico

---

### 1.1 Introducción general

En las últimas décadas hemos visto un aumento de eventos de blanqueamiento de coral vinculados al aumento de la temperatura del océano (Hoegh-Guldberg 1999), que se han convertido en una amenaza global para los arrecifes coralinos. Se ha demostrado que el fenómeno del blanqueamiento está impulsado directamente por el cambio climático (IPCC 2014). En principio, incrementos anormales de la temperatura por encima de los promedios máximos locales del verano y en interacción con estrés lumínico, producen daños en el aparato fotosintético de los simbioses induciendo estrés oxidativo y una cadena de eventos fisiológicos que perturban fuertemente la relación simbiótica hasta llevarla a su ruptura (Hoegh-Guldberg 1999; Scheufen et al. 2017b). Esta perturbación fisiológica es la base del blanqueamiento de coral ya que el hospedero expulsa de forma drástica en un momento dado a sus algas simbioses (Weis 2008). A simple vista este daño se expresa en una pérdida severa de la pigmentación del coral que permite que el esqueleto de coral se vuelva visible a través del tejido y el coral parezca blanqueado. Sin embargo, el blanqueamiento sólo es el punto final extremo de un proceso natural que empieza con ajustes fotoaclimáticos a alta luz en el aparato fotosintético de los simbioses que se expresan en pérdida de pigmentos de los simbioses, pero también en pérdida de simbioses. El blanqueamiento del coral resulta en una pérdida severa en la actividad fotosintética y de calcificación de coral (Scheufen et al. 2017b; Scheufen et al. 2017a). Cambios estacionales y espaciales de factores ambientales como la luz y la temperatura, también resultan en ajustes del holobionte. En concreto, los cambios que se producen a lo largo del año se manifiestan como ciclos estacionales de variación en la pigmentación del coral (Fitt et al. 2000), en la densidad de la población de simbioses (Stimson 1997; Fagoonee et al. 1999; Fitt et al. 2000) y en su productividad (Kinsey 1985; Kayanne et al. 2005; Barnes y Lough 1989; Carricart-Ganivet et al. 2000). Estos

cambios se pueden confundir con la respuesta del coral a niveles severos de estrés térmico y lumínico que resultan en blanqueamiento, especialmente cuando algunas especies o colonias adquieren una coloración muy pálida. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de distinguir entre una condición fisiológica cambiante de un coral funcional (fotoaclimatación) y una condición de blanqueamiento que señala una situación fisiológica disfuncional de la relación simbiótica y, por tanto, refleja la ruptura de la simbiosis (Suggett y Smith 2011). Los dos fenotipos, aunque aparentemente tengan similares características en lo que respecta a su pigmentación, no pueden ser considerados condiciones fisiológicas o fenotipos de coral similares.

En la simbiosis entre el coral y algas unicelulares, dinoflagelados, de la familia *Symbiodiniaceae* (LaJeunesse et al. 2018), la fotosíntesis de las algas, alimentada por la radiación solar, sostiene los requerimientos metabólicos de ambos organismos, pero no completamente, pues el coral mantiene su dependencia de la alimentación heterotrófica externa (Grottoli et al. 2006). Sin embargo el proceso de calcificación sí parece más fuertemente dependiente de la actividad fotosintética de las algas (“light enhanced calcification”, Kawaguti y Sakumoto 1948; Goreau y Goreau 1959; Pearse y Muscatine 1971; Chalker y Taylor 1975; Moya et al. 2006), por lo que la radiación solar, que es recolectada por el aparato fotosintético de los simbioses y que se transforma de manera eficiente en carbono orgánico, que es luego traslocado al hospedero, podría cubrir la mayoría de las demandas metabólicas del holobionte pero sólo como “junk food” (Muscatine et al. 1981), es decir, como “comida chatarra” o de alto valor calórico. Esta producción orgánica es el fuerte aporte energético del coral, con poco valor nutritivo en nitrógeno y fósforo (Muscatine et al. 1981), pero con un alto valor como sostén energético y facilitador de la calcificación del coral (Pearse y Muscatine 1971; Colombo-Pallotta et al. 2010), y, por lo tanto, del crecimiento de la estructura primaria del arrecife de coral. Algunas especies de coral pueden adquirir hasta un 40% de su energía a través de la alimentación heterotrófica (Palardy et al. 2008), pero incluso en estos organismos, esta alimentación no es suficiente para mantener sus demandas metabólicas

durante largos periodos de tiempo (Grottoli et al. 2006), por lo que la fotosíntesis de los simbiontes se vuelve indispensable para la supervivencia del holobionte. Por lo tanto, cualquier reducción en la producción y transferencia de foto-sintetatos al coral afectará fuertemente a su desempeño y crecimiento, colocando a la actividad fotosintética de la población de simbiontes y a la estabilidad de su fisiología *in hospite* y de su aparato fotosintético en el centro de los procesos celulares que regulan y determinan el desempeño de coral.

Como la fotoaclimatación del simbionte depende de señales ambientales como la temperatura y la luz, las propiedades ópticas de los corales son fundamentales para determinar cuánta luz puede ser colectada por las algas simbiontes *in hospite*, y también determinan las características y variabilidad del campo lumínico al que están sometidas dentro del tejido de coral. Esfuerzos por conocer las características ópticas de los corales se remontan a los trabajos de Shibata y Haxo (1969), y también a los clásicos estudios de Dubinsky et al. (1984; 1990), Wyman et al. (1987) y Lesser et al. (2000), que examinaron sus propiedades ópticas a partir de la extracción del tejido vivo y la determinación de las propiedades ópticas de las en filtros por medio de un análisis espectrofotométrico, de forma similar al estudio óptico que se desarrolla con el fitoplancton. Sin embargo, Enríquez et al. (2005) examinaron por primera vez las propiedades ópticas de la estructura intacta del coral, y documentaron un extraordinario incremento de la eficiencia de absorción de luz de las algas simbiontes *in hospite*, relativa a su capacidad de absorción en suspensión. Estos autores explican estos resultados gracias a la capacidad del esqueleto del coral de inducir dispersión múltiple de la luz y alargar su paso óptico, confiriendo unas nuevas propiedades ópticas a la estructura intacta. Esto permite un incremento extraordinario de la probabilidad de un fotón de encontrar un pigmento y ser absorbido. Estudios posteriores han corroborado la importancia del esqueleto de coral como dispersor de luz (Terán et al. 2010; Marcelino et al. 2013), su gran variabilidad entre estructuras (Marcelino et al. 2013; Enríquez et al. 2017), y, sobre todo, su gran valor explicativo para entender la ecología y evolución de

los corales simbióticos (Enríquez et al. 2017). Todo ello ha estimulado también la atención a la descripción de la variabilidad a microescala del campo lumínico dentro del tejido del hospedero (Wangpraseurt et al. 2012; Wangpraseurt et al. 2014b), ya que es el que es percibido por el simbiote, y al que debe responder en su ajuste ambiental. Aunque los cambios morfológicos del esqueleto de coral son fundamentales para determinar las propiedades ópticas de organismo, hay otros rasgos estructurales como la variación de la pigmentación (Enríquez et al. 2005; Terán et al. 2010), la densidad de simbioses y su distribución en el tejido (Kühl et al. 1995; Terán et al. 2010; Wangpraseurt et al. 2012) así como la forma del tejido y del pólipo que pueden también contribuir a la variación de la capacidad y eficiencia de absorción de luz de los corales simbióticos (Brown et al. 1994). Alguna de esta variabilidad es intrínseca a una determinada especie o estructura, pero es importante considerar también la variación “aparente”, es decir, la que depende de la condición fotoaclimatativa del coral, es decir de cambios en su pigmentación, y que también es crítica para entender cómo cambian la propiedades ópticas de los corales y su efecto sobre el campo lumínico de las algas simbioses dentro del tejido. Estos cambios pueden estar asociados a las características particulares de una especie o también depender de un gradiente ambiental o una variación estacional, además de los que se producen durante eventos de estrés térmico severo. Por ejemplo, una disminución de la pigmentación en una estructura poco pigmentada y altamente eficiente para absorber la luz conduce a un incremento significativo del campo lumínico o del área colectora de luz para las algas que se mantienen dentro de la estructura. Esto induce necesariamente a un aumento importante del fotodaño en los simbioses que se mantienen funcionales dentro del tejido del coral (Enríquez et al. 2005). Por ello, uno de los retos más importantes del holobionte en su ajuste ambiental sería mantener un control de su pigmentación para regular el campo lumínico de los simbioses y así una actividad fotosintética óptima, evitando que los niveles de fotodaño se eleven por encima de los asumibles por los simbioses *in hospite*.

A pesar del gran número de estudios enfocados a entender el blanqueamiento de coral (Weis 2008), los cambios estacionales y espaciales en el ajuste de los corales a la variación ambiental (Kinsey 1985; Barnes y Lough 1989; Stimson 1997; Fagoonee et al. 1999; Carricart-Ganivet et al. 2000; Fitt et al. 2000; Kayanne et al. 2005; Suggett y Smith 2011), los cambios en el campo lumínico en el interior del tejido (Kühl et al. 1995; Terán et al. 2010; Wangpraseurt et al. 2012), o los cambios en las propiedades ópticas del esqueleto de coral o de la estructura intacta (Enríquez et al. 2005; Marcelino et al. 2013; Enríquez et al. 2017), todavía se conoce poco cómo la variación de las propiedades ópticas de un coral condicionan o regulan otras propiedades funcionales como la tasa de fotosíntesis y calcificación en corales escleractíneos. Entender cómo se ajustan estos procesos permitirá entender la dinámica de variación del ajuste fotoaclimatativo al ambiente. Las implicaciones funcionales de estos ajustes son también muy relevantes pues pueden contribuir a entender la diversidad de respuestas de los corales a la variación espacio-temporal de la temperatura y la luz, explicar diferencias en su productividad y crecimiento en el arrecife, y también la diferente sensibilidad que muestra esta respuesta entre especies durante eventos extremos de calentamiento.

Para profundizar en el conocimiento de las relaciones forma-función de los corales, y específicamente el efecto de la variación de la pigmentación sobre la óptica y la fisiología de los organismos simbiotes, analicé la respuesta de cuatro especies de coral constructoras arrecifales en el Caribe (*Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa*, *Pseudodiploria strigosa*) y de sus simbiotes a estrés térmico durante tres “fases estacionales”: final del invierno, e inicio y final del verano. Este enfoque permitió no solo analizar un espectro amplio de variabilidad estructural y funcional en cuatro especies, sino también incluir el componente estacional en el análisis, lo que implica examinar diferentes fenotipos de coral aclimatados de forma natural al invierno (fenotipo de invierno) o al verano (fenotipo de verano), sino también en la condición fisiológica del coral que normalmente enfrenta los eventos de calentamiento durante el verano (fenotipo de principio de verano). El estudio de las relaciones forma-función, y en concreto su

aplicación para el estudio de organismos fotosintéticos, permite entender diferencias entre especies y/o poblaciones (morfortipos) en las habilidades competitivas, abundancias/distribución de especies y distribución de nicho. La capacidad de los descriptores ópticos de aportar este tipo de información en macrófitas marinas ha sido documentado previamente por Enríquez et al. (1994) y recientemente para algas coralinas (Vásquez-Elizondo y Enríquez 2017). En este trabajo presento un análisis que extiende las posibilidades de este tipo de análisis a los corales.

## 1.2 Antecedentes

### *El ecosistema de estudio*

Los arrecifes coralinos se encuentran entre los ecosistemas marinos más valiosos debido a los servicios biológicos, económicos y sociales que proveen (de Groot et al. 2012). En algunos casos, es difícil asignar un valor económico a estos servicios, ya que incluyen valores culturales intangibles que sobreviven y se alimentan de las comunidades cuyo sustento depende del arrecife, y cuya cultura está intrincadamente entrelazada en estos ecosistemas (de Groot et al. 2012). Los arrecifes coralinos soportan un 25% de la biodiversidad mundial de peces (Spalding et al. 2001) y ofrecen protección de la erosión y de las tormentas a las playas y a los asentamientos y propiedades costeras situadas en las zonas protegidas por la presencia de los arrecifes (Elliff y Silva 2017). La estructura arrecifal consigue disipar hasta el 97% de la energía de las tormentas y huracanes (Ferrario et al. 2014). Económicamente, se ha estimado que 500,000 a 750,000 personas dependen directamente de los servicios del arrecife.

Sin embargo, estos servicios están fuertemente amenazados por actividades humanas que causan la degradación de los arrecifes de coral a escalas locales y globales. Localmente, cambios en la calidad del agua, sobreexplotación pesquera y daño físico están afectando negativamente a los arrecifes de coral. La calidad del agua se reduce con los vertidos de aguas residuales y con la contaminación, lo que aumenta la susceptibilidad de los

organismos a sufrir enfermedades (Pollock et al. 2014), cambia las condiciones tróficas del hábitat, pero también incrementa la turbidez de la columna de agua, lo que disminuye la cantidad de luz disponible para la fotosíntesis (Fabricius 2005), y puede conllevar un incremento de partículas en suspensión, es decir, sedimento que al depositarse sobre los pólipos los puede obstruir y amenazar seriamente la supervivencia de colonias de coral enteras. Berry et al. (2016) documentaron un caso extremo por contaminación por polvo de carbono. La sobrepesca causa importantes cambios en las redes tróficas del arrecife de coral, y más específicamente la pérdida de herbívoros, lo que según Mumby (2006) favorece el crecimiento de algas que compiten por luz y por el espacio con los corales. La estructura arrecifal también puede sufrir daño físico causado por fuertes tormentas como huracanes, pero también por contacto accidental con barcos, buzos, turistas, actividad como dragado o construcción de puertos y otras estructuras costeras. Mientras los factores de estrés locales a menudo no están relacionados con la inducción del blanqueamiento de coral, sí pueden bajar la salud general de los organismos y su resistencia/resiliencia a otros factores como el estrés lumínico y/o térmico (Ban et al. 2014). Algunos autores defienden que las amenazas globales vinculadas al cambio climático sobrepasan el impacto de factores de estrés locales sobre la salud de corales (Bruno y Valdivia 2016). Sin embargo, en otras áreas como Cancún y la Riviera Maya, el volumen de vertidos por el fuerte desarrollo turístico puede significar una amenaza de origen local mucho mayor que las relacionadas con el cambio climático.

A escala global se ha documentado que temperaturas del agua por encima del valor máximo promedio del verano (MMM, maximum monthly mean) tienen un gran impacto sobre los arrecifes coralinos ya que están directamente asociadas con la inducción de blanqueamiento y la ruptura de la simbiosis (Weis 2008). Mientras el blanqueamiento de coral fue documentado por primera vez en 1911 en los cayos de Florida (Mayer 1914) y en 1928 en la Gran Barrera de Coral australiana (Yonge 1930), en donde se describe la palidez de corales debido a temperaturas inusualmente altas, los reportes de blanqueamiento son muy escasos durante el mayor parte del siglo XX con sólo un evento

reportado en 1961 (Shinn 1966). No fue hasta los años 1980 que eventos de blanqueamiento comenzaron a suceder a escalas más frecuentes y se desarrollaron durante periodos más largos de tiempo. Dentro de las últimas cuatro décadas se han registrado seis eventos de blanqueamiento de larga duración (1981/82, 1997/98, 2001/02, 2005/06, 2010), culminando en el primer evento de blanqueamiento que abarcó varios años (2014-2017), moviéndose por el Pacífico y afectando a la mayoría de los arrecifes del Pacífico en múltiples ocasiones (Eakin et al. 2016). Los eventos de 1997/1998, 2010 y 2014-2017 fueron declarados eventos de blanqueamiento global por la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA, por sus siglas en inglés). Durante el evento de 2014-2017 la Gran Barrera de Coral experimentó su peor blanqueamiento registrado hasta la fecha, que culminó en un blanqueamiento masivo que se prorrogó dos veranos consecutivos. Un 93% de los arrecifes inspeccionados mostraron un cierto grado de afectación por blanqueamiento y se observó una mortalidad >50% en muchos áreas situadas en el norte de la Gran Barrera de Coral (Authority 2017). En algunos lugares de Hawái el blanqueamiento masivo de coral llegó a afectar al 75% de la comunidad coralina en un reporte publicado en 2015 (Minton et al. 2015). Estos dos lugares sólo son ejemplos de la extensión y severidad de los eventos masivos de blanqueamiento de coral que han ocurrido en las últimas décadas, y que quizás se incrementen en el futuro. Nuevos estudios mostrarán la verdadera extensión y dimensión del aumento de este fenómeno directamente relacionado con el calentamiento global del planeta.

Las posibilidades de recuperación de una comunidad coralina después de un evento de blanqueamiento masivo que ha causado mortalidad en la comunidad son también limitadas, pues se estima que el tiempo de recuperación de corales es alrededor de 10 años para corales de rápido crecimiento y puede ser mucho más largo en corales de lento crecimiento (Hughes et al. 2017). Si la frecuencia de los eventos de blanqueamiento se incrementa y se extiende por encima del tiempo de recuperación la afectación de los arrecifes coralinos será dramática (Hughes et al. 2018).

*Daño fisiológico en los simbiotes y el coral*

A pesar de que temperaturas elevadas del agua no comunes en una determinada región (anomalías térmicas) han sido identificadas como el factor principal de estrés que induce el blanqueamiento de coral, es la combinación del efecto de la alta temperatura con el estrés lumínico que sienten los simbiotes *in hospite* lo que representa una amenaza a la estabilidad de la simbiosis (Lesser 1996; Robison y Warner 2006; Iglesias-Prieto 2006; Suggett y Smith 2011; Scheufen et al. 2017b). Ambos, temperaturas elevadas y alta irradiancia, pueden inducir fotoinhibición de la fotosíntesis por fuertes acumulaciones de fotodaño en el aparato fotosintético de las algas simbiotes al igual que un fuerte incremento de estrés oxidativo en las algas, y en consecuencia en el hospedero. La proteína D1 dentro del fotosistema II (PSII) es considerada el eslabón más débil en el aparato fotosintético y dónde se acumula el daño por luz (fotodaño) más frecuente en todos los organismos fotosintéticos (Ohad et al. 1994). Por ello, dinoflagelados de la familia *Symbiodinaceae* (LaJeunesse et al. 2018), tienen como el resto de organismos fotosintéticos, mecanismos efectivos de reparación de esta proteína (Ohad et al. 1994). A alta luz o durante eventos de temperaturas del agua elevadas, se incrementa fuertemente la tasa de daño sobre la proteína D1, que finalmente supera la capacidad de reparación que un determinado tipo de simbiote tiene expresada (Warner et al. 1999). Se ha propuesto que el estrés térmico incluso puede provocar daños en los mecanismos de reparación de esta proteína (Takahashi et al. 2004). La acumulación de daño en la proteína D1 lleva a una disminución en la eficiencia fotoquímica para utilizar la luz absorbida en el transporte de electrones y a un incremento de la energía de excitación que recibe el pool de PSIIs (Warner et al. 1999). También se ha propuesto que otro potencial sitio del daño durante el estrés térmico se encuentra en la enzima RuBisCO, de nombre completo ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, que es el “cuello de botella” de la fase oscura de la fotosíntesis por su lentitud en la fijación del carbono orgánico. Una disminución de la capacidad de RuBisCO de fijar carbono resulta en la fotoinhibición de la fotosíntesis (Lesser 1996; Jones et al. 1998). La reducción del

consumo del ATP y NADPH en la fase oscura de fijación de carbono de la fotosíntesis lleva otra vez a un incremento de la energía de excitación en el PSII y a incrementarse el daño por luz (Jones et al. 1998; Venn et al. 2008). Un último punto del daño por alta temperatura que se ha postulado es el que afecta directamente a las membranas fotosintéticas, conocidas como tilacoides (Tchernov et al. 2004). Según estos autores, este daño causa el desacoplamiento energético del transporte de electrones en ambos fotosistemas, es decir, el aparato fotosintético continúa generando electrones, pero deja de producir ATP y NADPH (Tchernov et al. 2004). Aunque Díaz-Almeyda et al. (2011) demostraron que las propiedades térmicas de las membranas del cloroplasto no son un predictor de este fenómeno. Independientemente de la necesidad todavía de esclarecer el sitio donde se produce el daño durante el estrés térmico y de los mecanismos celulares involucrados, lo que sí es aceptado de forma unánime es que durante el estrés térmico se produce una sobreexcitación del aparato fotosintético de los simbiositos y resulta en la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que se transfieren también al hospedero. Este tipo de compuestos conocidos como ROS, son importantes señalizadores celulares y se producen cuando el  $O_2$  es el principal receptor de electrones, procedentes de una cadena de transporte de electrones de la membrana fotosintética o mitocondrial, formándose un superóxido ( $O_2^-$ ) (Tchernov et al. 2004). El  $O_2^-$  producido puede ser reducido por la enzima superóxido dismutasa (SOD) a una molécula ROS menos reactiva y estable, aunque aún dañina como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (Jones et al. 1998; Lesser 2006). El  $H_2O_2$  puede reaccionar con hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) para formar un radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), que es una de las especies de ROS más reactivas. En las membranas fotosintéticas, la presión de excitación puede transformar las moléculas de clorofila en tripletes que a su vez son capaces de generar oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Lesser 2006). A medida que los niveles de ROS se incrementan y acumulan, el sistema de defensa contra el estrés oxidativo, es decir, SOD y peroxidasa de ascorbato, se puede ver saturado (Lesser 1996; Franklin et al. 2004), resultando en un incremento de daño oxidativo en las membranas fotosintéticas en un ciclo de retroalimentación positiva (Lesser 2006). Estos

altos niveles de ROS se difunden hacia el tejido del hospedero, donde causa también daño, además de señalar el estrés de los simbioses.

Para disipar el exceso de energía lumínica absorbida por el aparato fotosintético de los simbioses y evitar la acumulación del ROS, los dinoflagelados cuentan con mecanismos de fotoprotección. Este es un paso fundamental en la línea de defensa contra la acumulación de fotodaño en el aparato fotosintético, y aunque todavía se conoce poco del mecanismo de fotoprotección de los dinoflagelados, si se sabe que cuentan con un ciclo de xantofilas para disipar térmicamente el exceso de energía (Demers et al. 1991) y con el transporte cíclico de electrones (Peltier y Cournac 2002). Además de estos mecanismos de regulación, es importante también para los simbioses reducir su sección transversal de absorción de luz y aclimatarse eficientemente a condiciones de mayores irradiancias. Los organismos fotosintéticos se aclimatan a alta irradiancia cambiando su sección transversal de absorción (óptica), que consiste en reducir tanto el tamaño como el número de las unidades fotosintéticas (PSU) (Iglesias-Prieto y Trench 1994). Aún bajo condiciones de luz baja, y con suficiente capacidad para regular los niveles de ROS el aparato fotosintético necesita mantener un mecanismo de reparación constante (Takahashi et al. 2009). Por otro lado, cuando los niveles de ROS producidos por los simbioses se incrementan demasiado, la respuesta del hospedero es la expulsión de éstos (Davy et al. 2012). Junto a esta respuesta se ha documentado también la muerte celular programada de células del hospedero, desprendimiento de células del tejido y necrosis (Davy et al. 2012).

### *El papel central de la luz*

La luz como fuente de energía, pero también de daño juega un papel importantísimo tanto en el ajuste de los corales, como en el control de su crecimiento y de su respuesta al estrés. Todo ello subraya la importancia de entender el campo lumínico de los simbioses. La luz percibida por los simbioses dentro del tejido está modulada primero por la columna de agua, y después por el tejido de coral que adquiere propiedades

ópticas nuevas gracias a las del esqueleto (Enríquez et al. 2017). La cantidad y variación espectral de la luz determinan las propiedades ópticas del agua que resultan en una disminución exponencial de la luz con la profundidad. También la estructura tridimensional del arrecife afecta a la disponibilidad de luz, pues los salientes, cuevas y grietas forman áreas sombreadas que condicionan el campo lumínico local. Por su estructura tridimensional y grado de inclinación, el campo lumínico local puede ser también muy diferente para una misma colonia. Colonias de corales masivos suelen tener la parte más alta más expuesta y los lados más sombreados, mientras que los corales ramificados presentan un campo lumínico más complejo. Se han documentado diferencias en el desempeño fotosintético (Anthony et al. 2005) y aún en el fenotipo dominante de los simbioses (Kemp et al. 2008) en una misma colonia. A escalas más pequeñas, aún la forma del cáliz puede presentar una cierta plasticidad y variar en el ajuste ambiental para mejorar el desempeño del coral (Ow y Todd 2010). El tejido pigmentado del coral presenta gradientes internos de luz, más fuertes en corales con un tejido más grueso (Wangpraseurt et al. 2012). Adicionalmente, el coral puede variar la exposición de luz de sus simbioses a la luz expandiendo y contrayendo su tejido (Brown et al. 2002) y/o sus pólipos (Levy 2003). La macro y microestructura del coral proporciona nuevas propiedades ópticas (Enríquez et al. 2005; Terán et al. 2010; Marcelino et al. 2013; Enríquez et al. 2017) que van a afectar a la población de simbioses que viven dentro del tejido del coral. Con la ayuda del esparcimiento múltiple de la luz sobre el esqueleto el holobionte se logra mejorar su capacidad de absorción de luz, la absorptancia, con una inversión muy moderada en pigmentos (Enríquez et al. 2005). La mayor diversidad estructural del esqueleto de coral en los corales simbióticos y su mayor integración clonal sugiere que la evolución de los corales ha podido estar determinada por un esfuerzo conjunto del hospedero y de los simbioses (coevolución) para diseñar un eficiente colector de luz y a la vez proveer el campo lumínico óptimo para sus simbioses (Enríquez et al. 2017).

Si bien es cierto que existe una comprensión cada vez mejor de la importancia del campo lumínico dentro de los corales (Terán et al. 2010; Wangpraseurt et al. 2012; Wangpraseurt et al. 2014a), falta todavía una mejor comprensión: (1) del papel central que juegan los simbioses y su pigmentación en regular las propiedades ópticas de los corales, y (2) de las implicaciones funcionales de estos cambios ópticos para el desempeño del coral. En general, el conocimiento actual de la variabilidad de las propiedades ópticas de los corales simbióticos es todavía muy limitado. Cambios de la densidad de simbioses, en su pigmentación y en su distribución en el tejido, pueden resultar en cambios muy relevantes en las propiedades ópticas de toda la estructura, pero, sobre todo, en la cantidad de luz que las algas simbioses colectan y que utilizan en la fotosíntesis para fijar carbono orgánico que luego va a facilitar la actividad de calcificación del coral. Análisis de los cambios en los parámetros estructurales y su efecto sobre a las propiedades ópticas todavía son escasos (Enríquez et al. 2005; Rodríguez-Román et al. 2006). Profundizar en el conocimiento de estas asociaciones y su relación con los procesos de ajuste ambiental de los corales podría ayudar a entender la respuesta al estrés y las diferencias entre especies en su vulnerabilidad o robustez frente al estrés térmico y lumínico. Estas diferencias también pueden ser relevantes para entender diferencias entre especies en sus habilidades competitivas o en su habilidades para colonizar diferentes nichos en el arrecife de coral.

### **1.3 Preguntas y objetivos**

El objetivo general de este proyecto de investigación fue el análisis morfo-funcional de la respuesta de los corales escleractíneos al estrés térmico y a la fluctuación estacional de la luz y la temperatura. Se ha prestado especial interés a la comprensión de la asociación entre los cambios en la densidad de simbioses y en su pigmentación (contenido celular de pigmentos por simbiote) con la productividad (fotosíntesis y calcificación) del coral y también con su susceptibilidad al blanqueamiento. Para poder diferenciar entre las

variabilidad estacional en la condición fisiológica de los corales y la variabilidad asociada al estrés térmico, se analizaron los cambios estructurales, ópticos y fisiológicos de cuatro especies de coral constructoras de los arrecifes del Caribe: *Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa* y *Pseudodiploria strigosa*, en tres diferentes momentos de su variabilidad estacional: i) al final del invierno; ii) al final del verano; y iii) cuando inicia la temporada en la que el agua del mar sube  $>1^{\circ}\text{C}$  sobre el promedio anual local de temperatura ( $28^{\circ}\text{C}$ ) que ocurre en esta laguna de Puerto Morelos en el mes de Junio. Los organismos en cada una de estas condiciones fisiológicas se sometieron a estrés térmico controlado y se describió su respuesta al finalizar 10 días de estrés y su recuperación. La variabilidad natural y experimental obtenida permitió:

1. describir un amplio rango de variación estructural y funcional de cada especie.
2. identificar diferencias estacionales en cada especie, pero también similitudes entre especies en los diferentes fenotipos identificados.
3. determinar la susceptibilidad de cada especie y de cada fenotipo a estrés térmico y lumínico experimental.
4. describir el fenotipo de coral blanqueado
5. analizar la contribución de las propiedades ópticas de los corales y de sus más importantes determinantes, los cambios en la densidad de simbiontes y la pigmentación de cada simbionte,  $\text{Ci}$ , a entender los cambios observados en los parámetros fisiológicos y en la susceptibilidad o robustez de la especie o fenotipo al blanqueamiento.

#### **1.4 Esquema de este estudio y organización de los capítulos**

En los siguientes capítulos se presentan los resultados de este análisis. En el *primer capítulo* se describe la variabilidad generada para cada descriptor durante el desarrollo de este proyecto para cada una de las especies examinadas: *Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa* y *Pseudodiploria strigosa*; y se analiza en detalle el

efecto de la variabilidad estacional de luz y temperatura en cada especie, caracterizando dos fenotipos para cada especie, el fenotipo de coral al final del invierno (fenotipo de invierno) y el fenotipo al final del verano (fenotipo de verano) para cada especie. En el *segundo capítulo* se describen los resultados de dos experimentos en los que se sometieron a los dos fenotipos de cada especie a estrés térmico, y se analizó si los fenotipos estacionales tenían la misma susceptibilidad al estrés y a sufrir blanqueamiento bajo condiciones similares del estrés térmico y lumínico. El *tercer capítulo* muestra los resultados de un análisis alométrico que incorpora toda la variabilidad natural y experimental producida a lo largo de este estudio, incluyendo un tercer experimento que se realizó al principio del verano, en el mes de junio. Este análisis permitió examinar diferentes asociaciones de variación entre los descriptores estructurales, ópticos y fisiológicos analizados. Se ha prestado particular atención al efecto diferencial de los cambios de la densidad de simbiontes y su pigmentación ( $C_i$ ) sobre las propiedades ópticas del holobionte, especialmente sobre la variación del coeficiente específico de absorción ( $a^*$ ), y sobre los descriptores fisiológicos (fotosíntesis y calcificación) de las cuatro especies analizadas. Este enfoque permite distinguir entre tendencias generales en la respuesta del holobionte de coral y estrategias o respuestas específicas de cada especie. Además, permite reconocer diferencias entre especies en los cambios estacionales de la pigmentación, en la magnitud de estos cambios, e identificar los factores estructurales más implicados y su efecto sobre la variación de las propiedades ópticas y tasas fisiológicas del holobionte. Este análisis inductivo ofrece la posibilidad de construir hipótesis capaces de explicar el origen de la variabilidad entre especies o fenotipos (condición fisiológica) a sufrir blanqueamiento del coral y las razones mecánicas que pudieran explicar esta fragilidad y que conducen a la ruptura de la relación simbiótica. Los resultados presentados en el *tercer capítulo* pueden ayudar a identificar el umbral fisiológico (“tipping point”) que condiciona el blanqueamiento de coral y su variabilidad entre especies y dependiente del fenotipo.

## 1.5 Materiales y Métodos

### 1.5.1 Parámetros ambientales

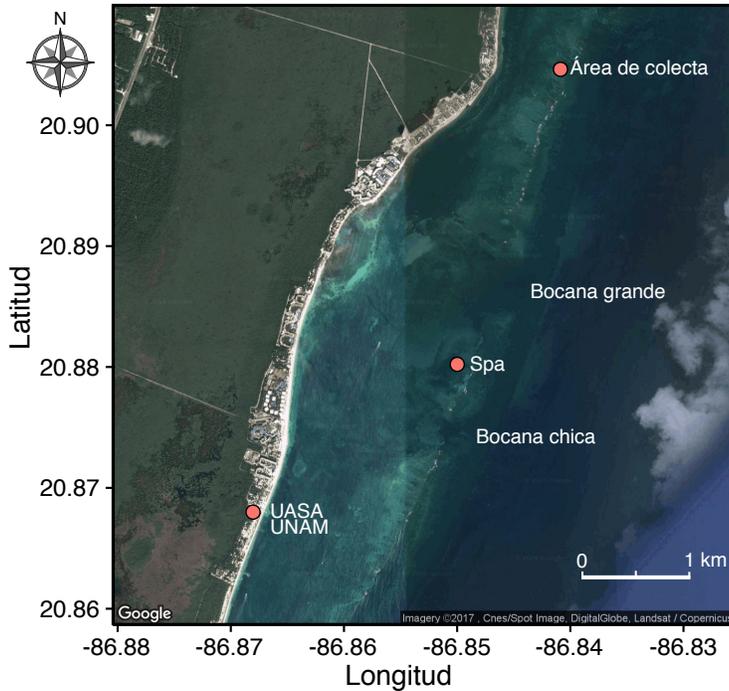
La irradiancia superficial ( $E_s$ ,  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y la temperatura del agua de la laguna se midieron en el muelle de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales de Puerto Morelos (UASA) del ICMYL de la UNAM (

**Figura 1.1**) por el Servicio Académico de Meteorología y Oceanografía (SAMH) de la UASA. La irradiancia superficial se midió cada 15 minutos con un sensor plano corregido por coseno (LI193-SAR conectado a un Data Logger LI-COR 1400, Lincoln, NE, USA). Las mediciones de la temperatura del agua se llevaron a cabo a las 9:00 AM con un termómetro de mano. La exposición diaria a la luz ( $H_{\text{día}}$ ,  $\text{mol quanta m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ) se calculó como la integral de la variación de la irradiancia a lo largo del día  $H_{\text{día}} = E_s * \text{tiempo}$  (Kirk 2010). Los promedios mensuales de la variación de  $H_{\text{día}}$  y de la temperatura se utilizaron para describir la variación estacional a lo largo de los dos años en que se realizaron los experimentos (2011 y 2012), así como los cambios interanuales para el periodo de 2011-2014 en el caso de la irradiación superficial y para el periodo 1992-2015 en el caso de temperatura. La variabilidad analizada es una extensión de los datos publicados por Rodríguez-Martínez et al. (2010). Las condiciones lumínicas a una profundidad de 5 m en la laguna arrecifal de Puerto Morelos fueron estimadas usando el coeficiente de atenuación  $0.198 \text{ (Kd, m}^{-1}\text{)}$  reportado por Enríquez y Pantoja-Reyes (2005) para esta misma laguna.

### 1.5.2 Área de estudio

La laguna de Puerto Morelos se encuentra a  $20^{\circ} 50' 53.6964'' \text{ N}$ ,  $86^{\circ} 52' 33.9816'' \text{ W}$  en Quintana Roo, México, y forma parte del parque nacional arrecife de Puerto Morelos en el norte del Sistema arrecifal Mesoamericano (

**Figura 1.1**).



**Figura 1.1 Mapa de la área de estudio**  
Área de colecta y sitio del vivero (Spa)  
en el Arrecife de Puerto Morelos,  
Quintana Roo, México.

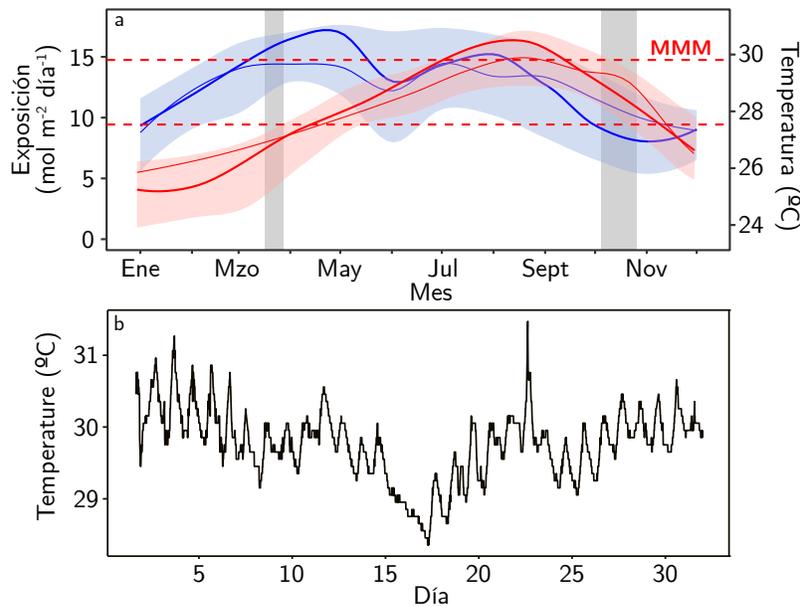
### Irradiancia y temperatura en Puerto Morelos

La exposición diurna promedio durante el periodo 2011-2014 varió de un mínimo de  $8.5 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  en noviembre a un máximo de  $15 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  en abril. De noviembre a enero se detectaron los meses con la exposición lumínica diurna más baja y de abril a julio los meses con la exposición más alta (Figura 1.2a). Los datos también revelaron dos máximos anuales dentro de los meses de mayor exposición, uno en mayo y otro en julio. Esto es causado parcialmente por la trayectoria del Sol, que se encuentra en el cenit a la latitud de Puerto Morelos en dos momentos del año, a finales de abril y finales de julio. Además, el aumento de la nubosidad, especialmente en junio puede causar este segundo pico, de localización más variable como lo muestra la mayor desviación estándar.

La temperatura del agua varió en promedio de  $26^{\circ}\text{C}$  (enero) a casi  $30^{\circ}\text{C}$  (agosto) durante el período de 1993 a 2014. Sin embargo, las temperaturas máximas pueden alcanzar hasta  $32^{\circ}\text{C}$  (Figura 1.2b). La base de datos de la temperatura es una extensión

de la base de datos previamente publicada por Rodríguez-Martínez et al. (2010) para el periodo de 1993 a 2005.

La comparación de 2011 y 2012, los años en los que se llevaron a cabo los experimentos, muestra que la exposición disminuyó en el 2012 en comparación con el 2011. La temperatura a principios del año fue más alta en 2012, pero la tasa de incremento en primavera fue más baja hasta junio. Ambos cambios son relevantes y serán considerados en la discusión de los resultados de los experimentos de estrés térmico en el capítulo 2.



**Figura 1.2 Climatología de la laguna de Puerto Morelos**

(a) Variabilidad de la temperatura (rojo) de 1998 a 2014 y de la luz (azul) de 2010 a 2014. Las áreas sombradas muestran la desviación estándar de los promedios mensuales de la temperatura y de la luz, respectivamente. Las líneas dentro de las áreas sombradas marcan los promedios mensuales de 2011 (línea gruesa) y de 2012 (línea delgada). Líneas discontinuas marcan la temperatura promedio ( $28^{\circ}\text{C}$ ) y el MMM de la laguna de Puerto Morelos. Las barras grises marcan los experimentos de marzo 2011 y octubre 2011. (b) Ejemplo de la fluctuación de la temperatura en la laguna de Puerto Morelos. Datos fueron obtenidos para agosto de 2016. Se nota que fluctuaciones de más de  $1^{\circ}\text{C}$  son posibles dentro de un día y que la temperatura puede variar en casi tres grados en menos de una semana.



**Figura 1.3 Fotos del sistema de los tanques experimentales**

- (A) Los tanques experimentales cubiertos con mallas para el control de la iluminación y  
(B) ilustrando la posición de los corales dentro de un tanque

#### Colecta de los organismos:

Muestras de las cuatro especies investigadas (*Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa*, y *Pseudodiploria strigosa*) se colectaron buceando a una profundidad de 5 m en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (Quintana Roo, México,

**Figura 1.1**) en los meses de febrero y septiembre de 2011, y en junio de 2012. Las muestras se transportaron a los mesocosmos de la Unidad Académica de Sistemas Arrecifales de la Universidad Nacional Autónoma de México (UASA-UNAM) y se colocaron en tanques al aire libre con flujo de agua de mar continuo alimentado desde la laguna (Figura 1.3). Los tanques se sombrearon con malla neutra, lo que permitió la reducción de la intensidad de la luz a niveles similares a los que se encuentran en la profundidad de muestreo (37% de la irradiancia superficial, Es). Se cortaron piezas de igual tamaño ( $\approx 10 \text{ cm}^2$ ) de los corales previamente colectados en la laguna, para generar los organismos experimentales. Estos fragmentos se pegaron a placas de PVC usando epoxi submarino no tóxico (Z-Spar Splash Zone, A-788). Diferencias en las características de cada experimento se explica en los capítulos correspondientes.

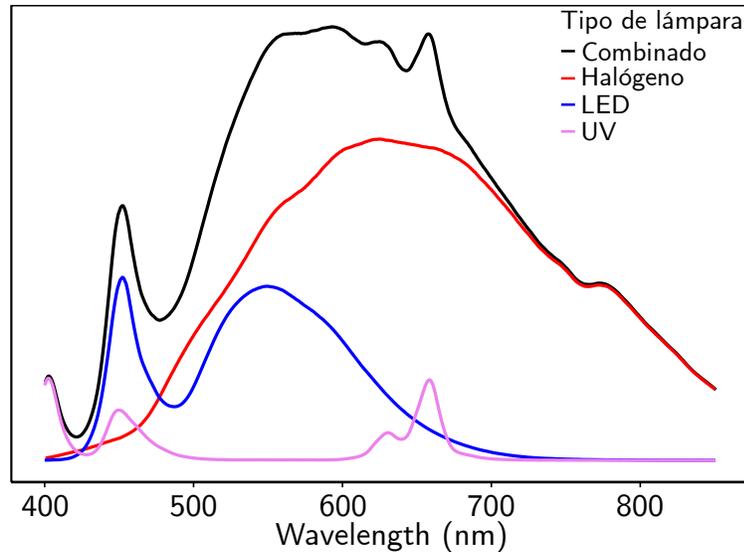
### 1.5.3 Determinación de la densidad de clorofila *a*, del número de simbioses y de la cantidad de proteína soluble en el tejido

Por medio de un aerógrafo y un homogenizador de tejido (T 10 basic Ultra-Turrax), se extrajeron los simbioses de las muestras de coral, usando agua de mar filtrada (0.45  $\mu\text{m}$ , Whatman). Las células de simbioses se concentraron centrifugando durante 5 minutos a 2000 rpm, después de lo cual se recolectaron 10 ml del sobrenadante y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posteriores determinaciones de proteínas. Se resuspendió el pellet en agua de mar filtrada, el cual fue utilizado para la determinación de clorofila *a* y la estima de la densidad de simbioses. Muestras para la determinación de la densidad de simbioses se almacenaron después de agregar 200  $\mu\text{l}$  de Lugol, y se realizó el conteo de células en un hemocitómetro. La extracción del pigmento se realizó en acetona/sulfóxido de dimetilo (95:5, vol/vol). Se guardaron las muestras de pigmentos extraídos en acetona/sulfóxido de dimetilo en oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 24h. Se centrifugaron y se determinó el contenido de clorofila *a* espectrofotométricamente usando un Miniature Ocean Optics USB4000 (Ocean Optics Ltd, FL) y una geometría óptica fija. Para el cálculo del contenido final de clorofila *a*, se usaron las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey (1975) para dinoflagelados. El contenido de proteínas solubles también se determinó espectrofotométricamente usando las ecuaciones de Whitaker y Granum (1980).

### 1.5.4 Determinación de las propiedades ópticas

La **reflectancia de coral (R)** se midió de acuerdo a Enríquez et al. (2005) y Vásquez-Elizondo et al. (2017). La absorptancia (*A*) se calculó como  $A = 1 - R$  asumiendo que la cantidad de la luz transmitida (*T*) por el esqueleto es desdeñable, como ha documentado Vásquez-Elizondo et al. (2017). Se colocaron las muestras en un contenedor negro con agua de mar filtrada e iluminado con luz difusa, y con suficiente intensidad en todo el espectro visible (Figura 1.4). Para crear la luz difusa se colocó una semiesfera, recubierta con óxido de bario (BaO), encima del contenedor y la muestra (Figura 1.5). Un anillo LED sumergible se colocó en el contenedor alrededor de la muestra para iluminar la semiesfera desde abajo, y la iluminación se completó con lámparas halógenas y diodos

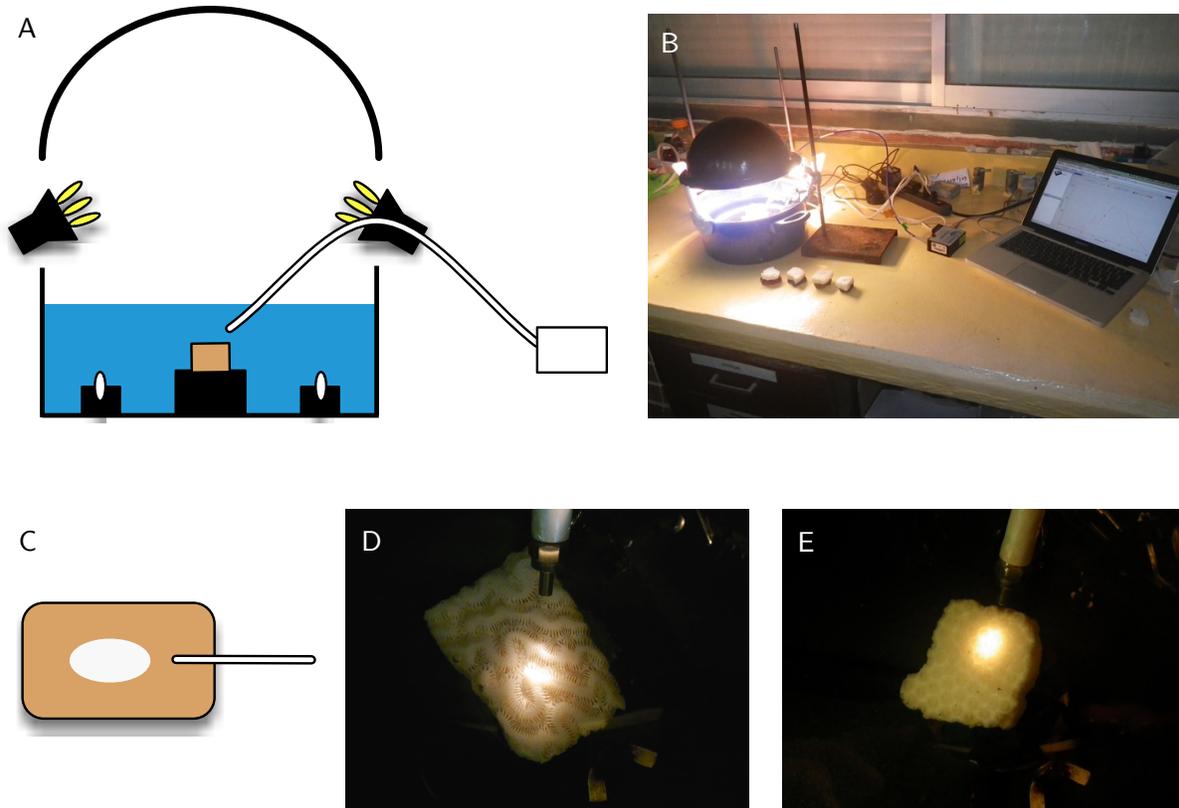
(LED) azul violeta, que aumentaron el rango espectral de la luz reflejada por la semiesfera en las regiones roja-infrarroja y azul-violeta, respectivamente, (Figura 1.4).



**Figura 1.4 Espectros de emisión de las lámparas usadas**

Se muestra los espectros de emisión de la lámparas UV (línea morada), LED (línea azul), halógeno (línea roja) y la emisión combinada (línea negra) de cada una de las lámparas usadas en las determinaciones de reflectancia

La luz reflejada por la muestra de coral se colectó por medio de una fibra óptica situada por encima de la superficie de la muestra y en un ángulo de  $45^{\circ}$  y a una distancia de 1 cm para evitar sombrear el área de iluminación (Figura 1.5). Las mediciones se realizaron entre 400 y 750 nm usando un Miniature Ocean Optics USB 4000 (Ocean Optics Ltd, FL). Para la calibración se utilizó la reflectancia de esqueletos de coral blanqueados de cada una de las especies analizadas. Ejemplos para detectar posibles errores de medición debido a diferencias en la geometría óptica entre la muestra y el blanco (esqueleto sin tejido vivo) se dan en Figura 1.6. En la figura se observa que los valores de la reflectancia a 750 nm deberían ser alrededor del 100%, ya que a esta longitud de onda no hay absorción de luz por los pigmentos

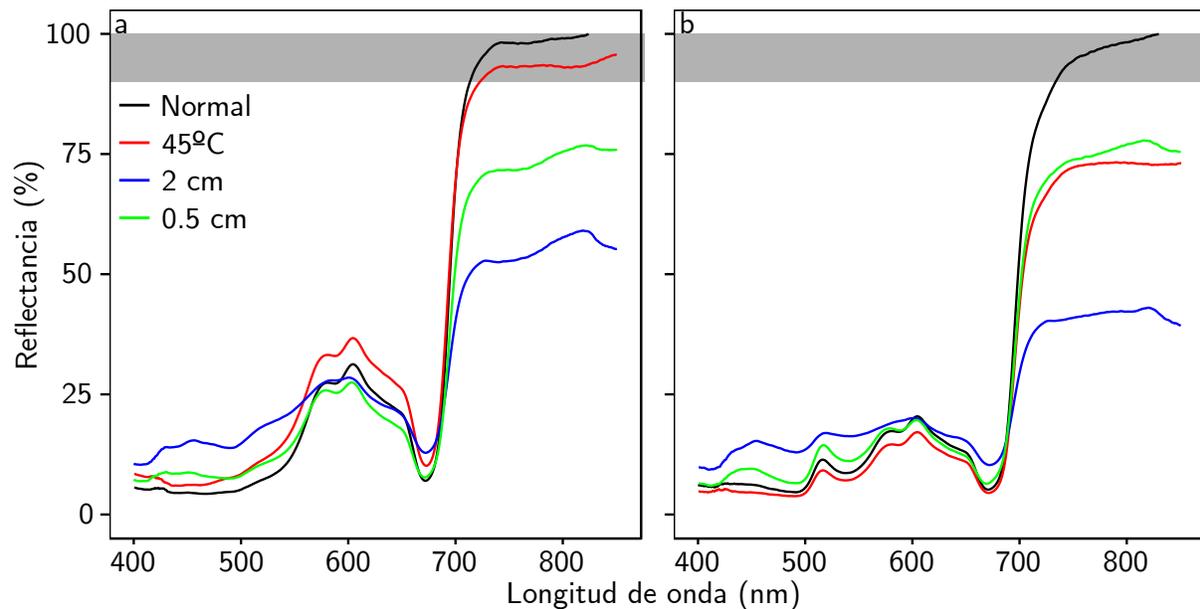


**Figura 1.5 Esquema y fotos de la metodología utilizada para las determinaciones de reflectancia**

(A) Esquema ilustrando la posición de la muestra (cuadrado café) en el contenedor, la fibra óptica conectado al espectrofotómetro (Miniature Ocean Optics USB 4000), la semiesfera y las fuentes de iluminación, B) foto de todo el setup, C) esquema de del área sobre la que se realizó la medida y fotos del área iluminada por la fibra óptica y que corresponden al área de medición sobre dos esqueletos de coral utilizados como referencia del 100% de reflectancia: *Pseudodiploria strigosa* (D) y *Orbicella faveolata* (E)

fotosintéticos y la mayor parte de la luz de iluminación debe ser reflejada por el esqueleto. Errores durante la determinación por pérdidas de luz no controladas pueden deberse a diferencias en la distancia entre la fibra óptica y la superficie de la muestra entre las dos mediciones (por ejemplo 2 cm y 0.5 cm de diferencia entre la posición de la muestra y la posición de la referencia se ilustra en la Figura 1.6). Estas diferencias se pueden interpretar de forma errónea como absorción de luz, ya que se pierde luz reflectada a 750 nm, pero son en realidad pérdidas de luz residual no controladas en la

medida. Por lo tanto, una reducción del valor de reflectancia a 750 nm en el espectro indica el nivel de error de la determinación óptica de reflectancia por pérdida de luz debida a errores en el mantenimiento de la geometría óptica (distancia o ángulo). En la Figura 1.6 se presentan diferentes resultados para ilustrar posibles errores durante las determinaciones de reflectancia que no alcanzaron a llegar a pérdidas inferiores al 10% (reflectancia >90% a 750 nm; barra gris, Figura 1.6).



**Figura 1.6 Ejemplos de espectros de reflectancia medidos a ángulos y distancias diferentes**

Se muestra el efecto de cambiar el ángulo y distancia entre la muestra y la fibra óptica sobre los espectros de reflectancia medidos para (a) *O. annularis* y (b) *M. cavernosa*. La barra gris marca una reflectancia encima de 90%.

El coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* ( $a^*_{\text{Chla}}$ ,  $\text{m}^2 \text{ mg Chla}^{-1}$ ) se calculó de acuerdo a Enríquez et al. (2005) usando la ecuación:

$$a^*_{\text{Chla}} = (De/\rho) * \ln(10) \quad (1.1)$$

en donde *De* es el valor de absorbancia, calculado a partir de las determinaciones de reflectancia como:  $De = \log(1/R)$ , siguiendo las indicaciones de Shibata y Haxo (1969); y  $\rho$  es el valor de la densidad de clorofila *a* en  $\text{mg Chla m}^{-2}$ . Además, en este estudio estimamos dos descriptores adicionales de la eficiencia de absorción de luz del holobionte, sustituyendo  $\rho$  por: (1) la densidad de simbiontes ( $\text{simbiontes m}^{-2}$ ) y (2) el contenido de proteína soluble del hospedero ( $\text{mg proteína m}^{-2}$ ), respectivamente. El primer parámetro  $a^*_{\text{sym}}$  ( $\text{m}^2 \text{ simbionte}^{-1}$ ) se utilizó para describir la eficiencia de absorción de luz de los simbiontes; y el segundo,  $a^*_M$  ( $\text{m}^2 \text{ mg proteína}^{-1}$ ) la eficiencia de absorción de luz del hospedero, utilizando el contenido de proteína como proxy de su masa. Este coeficiente específico de absorción se calculó de acuerdo a Enríquez y Sand-Jensen (2003), y siguiendo sugerencias previas de Falkowski et al. (1985), y Ramus (1990).

### 1.5.5 Determinaciones de las tasas de fotosíntesis y respiración

Las tasas de fotosíntesis y de respiración se determinaron polarográficamente utilizando electrodos tipo Clark (Hansatech, Norfolk, UK) conectados a cámaras de incubación de acrílico fabricadas en el laboratorio. Las cámaras, de un volumen de 200 ml estaban provistas de un espacio periférico para recircular agua y permitir el control de la temperatura durante la incubación, por medio de un baño recirculador con control de temperatura (Model AD07R-20, PolyScience, Niles, IL) para mantener la temperatura de incubación constante. Muestras de coral fueron colocadas dentro de las cámaras que se llenaron con agua de mar filtrada (0.45  $\mu\text{m}$  Whatman). Se añadió  $\text{NaHCO}_3$  (5 mN) al agua para evitar limitaciones de  $\text{CO}_2$  durante la incubación (Iglesias-Prieto et al. 1992; Enríquez et al. 2002; Cayabyab y Enríquez 2007). Los electrodos fueron calibrados con agua de mar filtrada saturada de oxígeno (100%  $\text{O}_2$ ) a la temperatura de incubación; y

burbujeada con  $N_2$  gas hasta aproximar el 0% de  $O_2$  disuelto en el agua. El número de réplicas que se utilizó para cada determinación fisiológica fue generalmente de cinco muestras por especie. La fotosíntesis neta máxima (net  $P_{max}$ ) se determinó exponiendo las muestras a una irradiancia de saturación de  $500 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durante 15 minutos. Esta irradiancia de saturación se determinó previamente por medio de curvas P vs E. Después de la determinación de las tasas de evolución de oxígeno en iluminación, se midieron las tasas de consumo de oxígeno en oscuridad durante 5 minutos adicionales para determinar las tasas de respiración post-iluminación (RPI). La fotosíntesis bruta máxima ( $P_{max}$ ) se estimó añadiendo el consumo de  $O_2$  por respiración a la fotosíntesis neta máxima (net  $P_{max}$ ). Como lo descrito anteriormente para las propiedades ópticas, se estimaron tres descriptores de la capacidad fotosintética: uno,  $P_{max}$ , normalizado por el área proyectada ( $\mu\text{mol } O_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ); otro,  $P_{sym}$ , normalizado por la densidad de simbiontes ( $\text{pmol } O_2 \text{ simbiontes}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) para describir la capacidad fotosintética por célula simbionte; y un tercero,  $P_M$ , normalizado por el contenido de proteínas solubles del hospedador ( $\mu\text{mol } O_2 \text{ mg proteína}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ ) para describir la actividad fotosintética por biomasa de hospedero.

### 1.5.6 Determinación de las tasas de calcificación

Para determinar las tasas de calcificación, las muestras de coral se incubaron durante una hora en vasos abiertos con agua de mar filtrada (0.45, Whatman), en recipientes de cristal abiertos. Las muestras se expusieron a una irradiancia de saturación de  $500 \mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Al final de cada incubación, se colectaron 150 - 170 ml del agua y se añadieron cuatro gotas de cloroformo para inhibir cualquier actividad biológica que podría cambiar la alcalinidad del agua. En promedio las muestras de agua de la incubación se guardaron entre 1 y 14 días antes de la determinación de la alcalinidad.

Para determinar la tasa de calcificación de coral se usó el principio de anomalía de alcalinidad, que se basa en la relación de dos equivalentes de alcalinidad total por cada mol de precipitación de  $\text{CaCO}_3$  precipitado. Para las mediciones de alcalinidad se usó un

procedimiento espectrofotométrico modificado (Colombo-Pallotta et al. 2010). Se determinó la alcalinidad en triplicados para cada muestra, por medio de microtitulaciones con 0.1 N HCL a una tasa de 35  $\mu\text{L min}^{-1}$  usando una jeringa de vidrio (Hamilton Company, Reno, USA) instalada en una bomba (Kd Scientific Inc, Holliston, USA). La desviación estándar de los triplicados de los valores de alcalinidad fue menor a 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . La alcalinidad fue determinada añadiendo el indicador Bromocresol purple (BCP; Sigma-Aldrich) a una muestra de agua de 5 ml antes de la microtitulación. Durante la medición, la muestra de agua se burbujeó suavemente con  $\text{N}_2$  y se midieron los cambios de la absorbancia a 432, 589 y 750 nm usando un Miniature Ocean Optics USB4000 (Ocean Optics Ltd, Dunedin, USA). La temperatura de agua se midió al final de cada microtitulación con un termómetro digital de alta resolución. Para la evaluación precisa de esta determinación, utilizamos material de referencia certificado (alcalinidad total conocida) del Marine Physical Laboratory (Scripps Institution of Oceanography, USA). Todas las tasas metabólicas se normalizaron al área superficial del coral, que se determinó recubriendo el tejido de coral con papel de aluminio de peso conocido por unidad de área (Marsh Jr 1970).

### 1.5.7 Análisis de datos

Los detalles del análisis de datos se pueden encontrar en la sección de materiales y métodos de cada capítulo. En general, los resultados están expresados como promedio  $\pm$  ES. Diferencias entre fenotipos se analizaron usando un Welch Two Sample t-test. Pruebas de ANOVA de un solo factor y análisis Post-Hoc Tukey HSD se usaron para identificar diferencias significativas entre especies en la respuesta de los corales al estrés térmico. Se usaron pruebas ANOVA de dos factores y análisis Post-Hoc Tukey HSD se usaron para determinar el efecto de la temperatura y el tiempo sobre la variación de  $F_v/F_m$ . Modelos de regresión lineal de mínimos cuadrados también se usaron para describir asociaciones entre las tasas metabólicas y la temperatura. Análisis de covarianza, ANCOVA, permitió evaluar diferencias entre especies en esos modelos lineales de variación. Para analizar los datos se usaron paquetes de estadística disponible

a través de R (Versión 3.5.3). Descripciones específicas de los métodos estadísticos y de los paquetes correspondientes utilizados se han incluido en los materiales y métodos de cada capítulo.

## 1.6 Literatura citada

- Anthony KRN, Hoogenboom MO, Connolly SR (2005) Adaptive variation in coral geometry and the optimization of internal colony light climates. *Functional Ecology* 19, 17-26
- Ban SS, Graham NA, Connolly SR (2014) Evidence for multiple stressor interactions and effects on coral reefs. *Glob Chang Biol* 20, 681-697
- Barnes DJ, Lough JM (1989) The nature of skeletal density banding in scleractinian corals: fine banding and seasonal patterns. *J Exp Mar Biol Ecol* 126, 119-134
- Berry KL, Hoogenboom MO, Flores F, Negri AP (2016) Simulated coal spill causes mortality and growth inhibition in tropical marine organisms. *Sci Rep* 6, 25894
- Brown BE, Downs CA, Dunne RP, Gibb SW (2002) Preliminary evidence for tissue retraction as a factor in photoprotection of corals incapable of xanthophyll cycling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 277, 129-144
- Brown BE, Le Tissier MDA, Dunne RP (1994) Tissue retraction in the scleractinian coral *Coeloseris mayeri*, its effect upon coral pigmentation, and preliminary implications for heat balance. *Marine Ecology-Progress Series* 105, 209-209
- Bruno JF, Valdivia A (2016) Coral reef degradation is not correlated with local human population density. *Sci Rep* 6, 29778
- Carricart-Ganivet JP, Beltrán-Torres AU, Merino M, Ruiz-Zárata MA (2000) Skeletal extension, density and calcification rate of the reef building coral *Montastraea annularis* (Ellis and Solander) in the Mexican Caribbean. *Bulletin of Marine Science* 66, 215-224
- Cayabyab NM, Enríquez S (2007) Leaf photoacclimatory responses of the tropical seagrass *Thalassia testudinum* under mesocosm conditions: a mechanistic scaling-up study. *New Phytol* 176, 108-123
- Chalker BE, Taylor DL (1975) Light-enhanced calcification, and the role of oxidative phosphorylation in calcification of the coral *Acropora cervicornis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 190, 323-331
- Colombo-Pallotta MF, Rodríguez-Román A, Iglesias-Prieto R (2010) Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. *Coral Reefs* 29, 899-907
- Davy SK, Allemand D, Weis VM (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 229-261

- de Groot R, Brander L, van der Ploeg S, Costanza R, Bernard F, Braat L, Christie M, Crossman N, Ghermandi A, Hein L, Hussain S, Kumar P, McVittie A, Portela R, Rodriguez LC, ten Brink P, van Beukering P (2012) Global estimates of the value of ecosystems and their services in monetary units. *Ecosystem Services* 1, 50-61
- Demers S, Roy S, Gagnon R, Vignault C (1991) Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Marine Ecology Progress Series* 185-193
- Díaz-Almeyda E, Thomé PE, El Hafidi M, Iglesias-Prieto R (2011) Differential stability of photosynthetic membranes and fatty acid composition at elevated temperature in *Symbiodinium*. *Coral Reefs* 30, 217-225
- Dubinsky Z, Falkowski PG, Porter JW, Muscatine L (1984) Absorption and utilization of radiant energy by light- and shade-adapted colonies of the hermatypic coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 222, 203-214
- Dubinsky Z, Stambler N, Ben-Zion M, McCloskey LR, Muscatine L, Falkowski PG (1990) The effect of external nutrient resources on the optical properties and photosynthetic efficiency of *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 239, 231-246
- Eakin MC, Liu G, Gomez AM, De la Cour J, Heron SF, Skirving W, Geiger EF, Tirak KV, Strong AE (2016) Global Coral Bleaching 2014-2017 Status and an Appeal for Observations. *Reef Encounter* 31, 20-26
- Elliff CI, Silva IR (2017) Coral reefs as the first line of defense: Shoreline protection in face of climate change. *Marine environmental research* 127, 148-154
- Enríquez S, Pantoja-Reyes NI (2005) Form-function analysis of the effect of canopy morphology on leaf self-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. *Oecologia* 145, 235-243
- Enríquez S, Agustí S, Duarte CM (1994) Light absorption by marine macrophytes. *Oecologia* 98, 121-129
- Enríquez S, Méndez ER, Iglesias-Prieto R (2005) Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol Oceanogr* 50, 1025-1032
- Enríquez S, Méndez ER, Hoegh-Guldberg O, Iglesias-Prieto R (2017) Key functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. *Proc R Soc B* 284, 20161667
- Enríquez S, Merino M, Iglesias-Prieto R (2002) Variations in the photosynthetic performance along the leaves of the tropical seagrass *Thalassia testudinum*. *Marine Biology* 140, 891-900
- Enríquez S, Sand-Jensen K (2003) Variation in light absorption properties of *Mentha aquatica* L. as a function of leaf form: Implications for plant growth. *Int J Plant Sci* 164, 125-136
- Fabricius KE (2005) Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Mar Pollut Bull* 50, 125-146

- Fagoonee I, Wilson HB, Hassell MP, Turner JR (1999) The dynamics of zooxanthellae populations: A long-term study in the field. *Science* 283, 843-845
- Falkowski PG, Dubinsky Z, Wyman K (1985) Growth-Irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 30, 311-321
- Ferrario F, Beck MW, Storlazzi CD, Micheli F, Shepard CC, Airoidi L (2014) The effectiveness of coral reefs for coastal hazard risk reduction and adaptation. *Nat Commun* 5, 3794
- Fitt WK, McFarland FK, Warner ME, Chilcoat GC (2000) Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol Oceanogr* 45, 677-685
- Franklin DJ, Hoegh-Guldberg O, Jones RJ, Berges JA (2004) Cell death and degeneration in the symbiotic dinoflagellates of the coral *Stylophora pistillata* during bleaching. *Mar Ecol Prog Ser* 272, 117-130
- Goreau TF, Goreau NI (1959) The Physiology of Skeleton Formation in Corals. II. Calcium Deposition by Hermatypic Corals under Various Conditions in the Reef. *Biological Bulletin* 117, 239-250
- Authority GBMP (2017) Final Report: 2016 Coral Bleaching Event on the Great Barrier Reef. GBRMPA, Townsville
- Grottoli AG, Rodrigues LJ, Palardy JE (2006) Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature* 440, 1186-1189
- Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshwater Res* 50, 839-866
- Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, Heron SF, Kerry JT, Lough JM, Baird AH, Baum JK, Berumen ML, Bridge TC, Claar DC, Eakin CM, Gilmour JP, Graham NAJ, Harrison H, Hobbs JA, Hoey AS, Hoogenboom M, Lowe RJ, McCulloch MT, Pandolfi JM, Pratchett M, Schoepf V, Torda G, Wilson SK (2018) Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science* 359, 80-83
- Hughes TP, Kerry JT, Álvarez-Noriega M, Álvarez-Romero JG, Anderson KD, Baird AH, Babcock RC, Beger M, Bellwood DR, Berkelmans R, Bridge TC, Butler IR, Byrne M, Cantin NE, Comeau S, Connolly SR, Cumming GS, Dalton SJ, Diaz-Pulido G, Eakin CM, Figueira WF, Gilmour JP, Harrison HB, Heron SF, Hoey AS, Hobbs JA, Hoogenboom MO, Kennedy EV, Kuo CY, Lough JM, Lowe RJ, Liu G, McCulloch MT, Malcolm HA, McWilliam MJ, Pandolfi JM, Pears RJ, Pratchett MS, Schoepf V, Simpson T, Skirving WJ, Sommer B, Torda G, Wachenfeld DR, Willis BL, Wilson SK (2017) Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* 543, 373-377
- Iglesias-Prieto R (2006) C4.4 - Thermal stress mechanisms in corals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 143, S132
- Iglesias-Prieto R, Matta JL, Robins WA, Trench RK (1992) Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc Nat Acad Sci USA* 89, 10302-10305

- Iglesias-Prieto R, Trench RK (1994) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Marine ecology progress series* 113, 163-175
- IPCC (2014) *Climate Change and the Ocean - Special Collection of Reprints from the Working Group II Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.*
- Jeffrey SW, Humphrey GF (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1, and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanz* 167, 191-194
- Jones RJ, Hoegh Guldberg O, Larkum AWD, Schreiber U (1998) Temperature induced bleaching of corals begins with impairment of the CO<sub>2</sub> fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell & Environment* 21, 1219-1230
- Kawaguti S, Sakumoto D (1948) The effect of light on calcium deposition in corals. *Bull Oceanogr Inst Taiwan* 4, 65-70
- Kayanne H, Hata H, Kudo S, Yamano H, Watanabe A, Ikeda Y, Nozaki K, Kato K, Negishi A, Saito H (2005) Seasonal and bleaching-induced changes in coral reef metabolism and CO<sub>2</sub> flux. *Global Biogeochemical Cycles* 19, GB3015
- Kemp DW, Fitt WK, Schmidt GW (2008) A microsampling method for genotyping coral symbionts. *Coral Reefs* 27, 289-293
- Kinsey DW (1985) Metabolism, calcification and carbon production I. System level studies. *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress, Tahiti, 27 May-1 June 1985*, 503-542
- Kirk JTO (2010) *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems.* Cambridge University Press, New York
- Kühl M, Cohen Y, Dalsgaard T, Jørgensen BB, Revsbech NP (1995) Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleratinian corals studied with microsensors for O<sub>2</sub>, pH and light. *Mar Ecol Prog Ser* 117, 159-172
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, Santos SR (2018) Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr Biol* 28, 2570-2580.e6
- Lesser MP (1996) Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol Oceanogr* 41, 271-283
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-278
- Lesser MP, Mazel C, Phinney D, Yentsch CS (2000) Light absorption and utilization by colonies of the congeneric hermatypic corals *Montastraea faveolata* and *Montastraea cavernosa*. *Limnol Oceanogr* 45, 76-86
- Levy O (2003) Photobehavior of stony corals: responses to light spectra and intensity. *Journal of Experimental Biology* 206, 4041-4049
- Marcelino LA, Westneat MW, Stoyneva V, Henss J, Rogers JD, Radosevich A, Turzhitsky V, Siple M, Fang A, Swain TD, Fung J, Backman V (2013) Modulation

- of light-enhancement to symbiotic algae by light-scattering in corals and evolutionary trends in bleaching. *PLoS One* 8, e61492
- Marsh Jr JA (1970) Primary productivity of reef-building calcareous red algae. *Ecology* 51, 255-263
- Mayer AG (1914) The effects of temperature upon tropical marine animals. 6, 1-24
- Minton D, Amimoto R, Friedlander A, Stamoulis K, Conklin E (2015) Baseline Biological Surveys of 'A 'alapapa Reef, O 'ahu, Hawai 'i 2014-2015. TNC Technical Report prepared for the Lanikai Beach and Park Foundation. pp 58
- Moya A, Tambutté S, Tambutté E, Zoccola D, Caminiti N, Allemand D (2006) Study of calcification during a daily cycle of the coral *Stylophora pistillata*: implications for 'light-enhanced calcification'. *J Exp Biol* 209, 3413-3419
- Mumby PJ (2006) The impact of exploiting grazers (Scaridae) on the dynamics of Caribbean coral reefs. *Ecological Applications* 16, 747-769
- Muscatine L, McCloskey LR, Marian RE (1981) Estimating the daily contribution of carbon from zooxanthellae to coral animal respiration. *Limnol Oceanogr* 26, 601-611
- Ohad I, Keren N, Zer H, Gong H, Mor TS, Gal A, Tal S, Domovich Y (1994) Light-induced degradation of the photosystem II reaction centre D1 protein in vivo: an integrative approach. In: Baker N, Bowyer JR (eds) *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK, pp 161-177
- Ow YX, Todd PA (2010) Light-induced morphological plasticity in the scleractinian coral *Goniastrea pectinata* and its functional significance. *Coral Reefs* 29, 797-808
- Palardy JE, Rodrigues LJ, Grottoli AG (2008) The importance of zooplankton to the daily metabolic carbon requirements of healthy and bleached corals at two depths. *J Exp Mar Biol Ecol* 367, 180-188
- Pearse VB, Muscatine L (1971) Role of Symbiotic Algae (Zooxanthellae) in Coral Calcification. *Biological Bulletin* 141, 350-363
- Peltier G, Cournac L (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Phys* 53, 523-550
- Pollock FJ, Lamb JB, Field SN, Heron SF, Schaffelke B, Shedrawi G, Bourne DG, Willis BL (2014) Sediment and turbidity associated with offshore dredging increase coral disease prevalence on nearby reefs. *PLoS One* 9, e102498
- Ramus J (1990) A form-function analysis of photon capture for seaweeds. *Hydrobiologia* 204, 65-71
- Robison JD, Warner ME (2006) Differential impacts of photoacclimation and thermal stress on the photobiology of four different phlotypes of *Symbiodinium* (*Pyrrhophyta*). *J Phycol* 42, 568-579
- Rodríguez-Martínez RE, Ruíz-Rentería F, van Tussenbroek B, Barba-Santos G, Escalante-Mancera E, Jordán-Garza G, Jordán-Dahlgren E (2010) Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Revista de biología tropical* 58, 23-43
- Rodríguez-Román A, Hernández-Pech X, E Thomé P, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2006) Photosynthesis and light utilization in the Caribbean coral *Montastraea*

*faveolata* recovering from a bleaching event. *Limnology and Oceanography* 51, 2702-2710

- Scheufen T, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017a) Changes in the Number of Symbionts and Symbiodinium Cell Pigmentation Modulate Differentially Coral Light Absorption and Photosynthetic Performance. *Front Mar Sci* 4, 17
- Scheufen T, Krämer WE, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017b) Seasonal variation modulates coral sensibility to heat-stress and explains annual changes in coral productivity. *Sci Rep* 7, 601
- Shibata K, Haxo FT (1969) Light transmission and spectral distribution through epi-and endozoic algal layers in the brain coral, *Favia*. *Biol Bull* 136, 461-468
- Shinn EA (1966) Coral Growth-Rate, an Environmental Indicator. *Journal of Paleontology* 40, 233-240
- Spalding M, Ravilious C, Green EP (2001) *World Atlas of Coral Reefs*. Univ of California Press,
- Stimson J (1997) The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 214, 35-48
- Suggett DJ, Smith DJ (2011) Interpreting the sign of coral bleaching as friend vs. foe. *Global change biology* 17, 45-55
- Takahashi S, Nakamura T, Sakamizu M, van Woesik R, Yamasaki H (2004) Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. *Plant Cell Physiol* 45, 251-255
- Takahashi S, Whitney SM, Badger MR (2009) Different thermal sensitivity of the repair of photodamaged photosynthetic machinery in cultured Symbiodinium species. *P Natl Acad Sci Usa* 106, 3237-3242
- Tchernov D, Gorbunov MY, de Vargas C, Yadav SN, Milligan AJ, Haggblom M, Falkowski PG (2004) Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *P Natl Acad Sci Usa* 101, 13531-13535
- Terán E, Méndez ER, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2010) Multiple light scattering and absorption in reef-building corals. *Appl Opt* 49, 5032-5042
- Vásquez-Elizondo RM, Enríquez S (2017) Light Absorption in Coralline Algae (Rhodophyta): A Morphological and Functional Approach to Understanding Species Distribution in a Coral Reef Lagoon. *Front Mar Sci* 4, 393
- Vásquez-Elizondo RM, Legaria-Moreno L, Pérez-Castro MÁ, Krämer WE, Scheufen T, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017) Absorptance determinations on multicellular tissues. *Photosynthesis Research* 3, 311-324
- Venn AA, Loram JE, Douglas AE (2008) Photosynthetic symbioses in animals. *J Exp Bot* 59, 1-12
- Wangpraseurt D, Larkum AW, Franklin J, Szabó M, Ralph PJ, Kühl M (2014a) Lateral light transfer ensures efficient resource distribution in symbiont-bearing corals. *J Exp Biol* 217, 489-498

- Wangpraseurt D, Larkum AW, Ralph PJ, Kühl M (2012) Light gradients and optical microniches in coral tissues. *Front Microbiol* 3, 316
- Wangpraseurt D, Polerecky L, Larkum AWD, Ralph PJ, Nielsen DA, Pernice M, Kühl M (2014b) The in situ light microenvironment of corals. *Limnol Oceanogr* 59, 917-926
- Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW (1999) Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proc Nat Acad Sci USA* 96, 8007-8012
- Weis VM (2008) Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J Exp Biol* 211, 3059-3066
- Whitaker JR, Granum PE (1980) An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Analytical biochemistry* 109, 156-159
- Wyman KD, Dubinsky Z, Porter JW, Falkowski PG (1987) Light absorption and utilization among hermatypic corals: a study in Jamaica, West Indies. *Marine Biology* 96, 283-292
- Yonge CM (1930) Great Barrier reef expedition, 1928-29: Scientific reports. Printed by order of Trustees of the British Museum, London

## Capítulo 2 – Análisis comparativo de cuatro especies de coral y de tres fenotipos estacionales utilizando descriptores estructurales y funcionales

---

### 2.1 Introducción

Para realizar este análisis se han agrupado los diferentes descriptores de los corales y sus simbiontes en tres grupos: descriptores estructurales, ópticos y fisiológicos (Tabla 2.1).

#### Descriptores estructurales

Dentro del grupo de descriptores estructurales, hay que resaltar las características de la colonia considerando tanto la morfología macro (su forma) como la estructura del esqueleto, y por supuesto las características y cambios en la pigmentación del tejido vivo. En este estudio utilizamos como descriptor del tejido vivo del hospedero su biomasa, descrito por la cantidad de proteínas solubles. La contribución del simbionte a los descriptores estructurales del coral es su pigmentación, que varía dependiendo de los cambios en la pigmentación celular de los simbiontes (Ci) y de la variación de la densidad de simbiontes. Los dos parámetros determinan conjuntamente la variación de la pigmentación total del holobionte. La contribución del tejido del coral a la pigmentación del tejido representa un pequeño porcentaje del contenido de pigmentos totales, aunque se incrementa significativamente cuando el tejido pierde pigmentación de las algas simbiontes. Se asume que estos pigmentos del hospedero en su mayoría tienen actividad de fotoprotección (Salih et al. 2006). Los cambios en la densidad de simbiontes tienen un componente estacional (Fagoonee et al. 1999; Fitt et al. 2000) pero no está claro cómo la luz y la profundidad les afectan. Los simbiontes presentan una cierta variabilidad en cuanto a su tasa de crecimiento, que depende también de la disponibilidad de nutrientes *in hospite*. Al mismo tiempo, el coral puede controlar la densidad de simbiontes expulsándolos, degradándolos, o inhibiendo su crecimiento (Davy et al. 2012). El último descriptor estructural que ha sido incluido en la comparación es la

razón de simbioses por cantidad de proteína soluble del hospedero, que funciona como un proxy de la variación de la cantidad de simbioses por unidad de masa de hospedero. Este atributo se ha propuesto como un indicador del estrés en corales (Cunning y Baker 2012; Cunning y Baker 2014).

**Tabla 2.1 Resumen de los descriptores y atributos de corales**

Parámetro	Definición	Unidades
<b>Estructurales</b>		
Morfología	Forma de la colonia y micromorfología	s.u.
Masa del hospedero	Proteínas solubles por área	mg Proteína cm <sup>-2</sup>
Pigmentación de coral	Clorofila <i>a</i> por área proyectada	mg Chl <i>a</i> m <sup>-2</sup>
Densidad de simbioses	Numero de simbioses por área	x10 <sup>6</sup> Simbioses cm <sup>-2</sup>
Pigmentación del simbiote (Ci)	Clorofila <i>a</i> por simbiote	pg Chl <i>a</i> Simbiote <sup>-1</sup>
<b>Ópticos</b>		
Absorptancia, A	Fracción de la luz incidente absorbida	s.u.
a* <sub>Chl<i>a</i></sub>	Coefficiente específico de absorción del holobionte	m <sup>2</sup> mg Chl <i>a</i> <sup>-1</sup>
a* <sub>Sym</sub>	Coefficiente específico de absorción del simbiote	m <sup>2</sup> Simbiote <sup>-1</sup>
a* <sub>M</sub>	Coefficiente específico de absorción del hospedero	m <sup>2</sup> mg Proteína <sup>-1</sup>
<b>Fisiológicos</b>		
P <sub>max</sub>	Fotosíntesis máxima por área	μmol O <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup>

$P_{\text{sym}}$	Fotosíntesis máxima por simbionte	$\text{pmol O}_2 \text{ Simbionte}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$P_{\text{M}}$	Fotosíntesis máxima por masa del hospedero	$\mu\text{mol O}_2 \text{ mg Proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$G_{\text{max}}$	Calcificación máxima	$\mu\text{mol CaCO}_3 \text{ m}^{-2} \text{ h}^{-1}$

### Descriptorios ópticos:

Los descriptorios ópticos se pueden dividir en descriptorios de la capacidad de absorber la luz (Absorptancia,  $A$ ) y descriptorios de la eficiencia con la que la luz se absorbe (coeficiente específico de la absorción,  $a^*$ ). Ambos descriptorios dependen de las características estructurales del holobionte. La morfología de la colonia (Anthony et al. 2005; Enríquez et al. 2017), tanto como la morfología del esqueleto de coral (Enríquez et al. 2005; Enríquez et al. 2017; Terán et al. 2010; Marcelino et al. 2013), afectan el campo lumínico dentro del tejido a través del incremento del esparcimiento de la luz. El grosor del mismo tejido genera gradientes internos, afectando a la cantidad de luz que penetra hasta la capa más profunda del tejido (Kühl et al. 1995; Wangpraseurt et al. 2012), pero también se han documentado aumentos significativos en el campo lumínico local por efecto de la dispersión lateral de la luz (Wangpraseurt et al. 2014a). La cantidad de luz absorbida y la eficiencia de absorción son dos propiedades ópticas de la estructura completa directamente relacionadas con la cantidad de pigmentación y la densidad de simbiontes (Enríquez et al. 2005; Terán et al. 2010; Rodríguez-Román et al. 2006; Scheufen et al. 2017a). En este estudio, además del coeficiente específico de absorción de luz por unidad de pigmento, la clorofila  $a$  ( $a^*_{\text{Chla}}$ ;  $\text{m}^2 \text{ mg Chla}^{-1}$ ), descrito por Enríquez y Sand-Jensen (2003) y Enríquez et al. (2005), se van a examinar dos parámetros adicionales para describir la eficiencia de absorción de luz de los simbiontes y la eficiencia de absorción de luz del hospedero. El primer parámetro es el coeficiente específico de absorción de luz promedio del simbionte *in hospite* ( $a^*_{\text{sym}}$ ;  $\text{m}^2 \text{ Simbionte}^{-1}$ ). El segundo parámetro es el coeficiente específico de absorción de luz promedio del

hospedero, normalizado a su masa ( $a^*_M$ ;  $m^2 \text{ mg Proteína}^{-1}$ ). El coeficiente específico de absorción de luz por unidad de clorofila *a* ( $a^*_{Chla}$ ;  $m^2 \text{ mg Chla}^{-1}$ ) sería por tanto en este contexto, un descriptor de la eficiencia con la cual el holobionte absorbe la luz, ya que engloba el efecto de la condición fotoaclimatativa del simbiote (su pigmentación celular, Ci) y la regulación de la población de simbiotes. El coeficiente específico de absorción por masa ( $a^*_M$ ) ha sido propuesto previamente como un descriptor funcional para la eficiencia de los colectores fotosintéticos de luz para regresar la energía colectada a la masa estructural (Ramus 1990; Enríquez et al. 1994; Enríquez y Sand-Jensen 2003). En este estudio, por tanto, el  $a^*_M$  se utiliza como un descriptor de la eficiencia de absorción de luz del hospedero, para cuantificar el potencial retorno para el hospedero de los beneficios de la energía solar colectada por los simbiotes *in hospite*. Es importante, sin embargo, señalar que el carbono orgánico celular no tiene una sección transversal de absorción óptica real; por lo que este descriptor es una construcción matemática para describir una propiedad funcional relevante de esta asociación simbiótica (Falkowski et al. 1985; Ramus 1990; Enríquez y Sand-Jensen 2003; Vásquez-Elizondo y Enríquez 2017).

### **Descriptores fisiológicos:**

Los descriptores fisiológicos que se presenta en este trabajo son la tasa de calcificación y la actividad fotosintética del holobionte. Estos dos procesos están conectados a través de la translocación de foto-sintatos y la producción de oxígeno por la fotosíntesis de las algas simbiotes (Colombo-Pallotta et al. 2010), que permiten mejorar significativamente las tasas de calcificación en condiciones de iluminación (light enhanced calcification; Kawaguti y Sakumoto 1948; Goreau y Goreau 1959; Pearse y Muscatine 1971; Chalker y Taylor 1975; Moya et al. 2006). Esta situación no es exclusiva de los corales, ya que en muchas algas e incluso pastos marinos también se ha documentado (ej. Borowitzka 1982; Paasche 2001; Enríquez y Schubert 2014). En la sección anterior se ha discutido cómo diferencias en las características estructurales pueden ser determinantes para la variación

de las propiedades ópticas del holobionte. Esta variación en la capacidad y eficiencia de absorción de luz del coral también puede afectar a su fisiología fotosintética y a su actividad de calcificación. Por ejemplo, Hoadley et al. (2016) han mostrado una asociación entre la densidad de simbioses y la fotosíntesis. Sin embargo, la generalidad de esta asociación no está clara, ni se cumple siempre entre todas las especies.

La variabilidad de las características estructurales, ópticas y fisiológicas de los corales dependen de cada especie, pero también de cambios ambientales de la luz y la temperatura, tanto temporales como espaciales. La luz es el parámetro más variable y puede cambiar con la posición del coral en el arrecife, por ejemplo, profundidad, grietas/hendiduras/hoyos, la estructura tridimensional del arrecife y dentro de la misma colonia. La temperatura también puede tener un componente importante espacial dependiendo de la profundidad y del tiempo de renovación del agua en la laguna, pero también los dos factores tienen un componente importante en la variabilidad estacional. Los corales están afectados por esta variación estacional de la luz y temperatura del agua, que determina cambios significativos en sus características estructurales y funcionales. Se ha mostrado por ejemplo que el coral cambia estacionalmente su pigmentación (Fitt et al. 2000), su densidad de simbioses (Stimson 1997; Fagoonee et al. 1999; Fitt et al. 2000), y la pigmentación por simbionte (Ci) (Fitt et al. 2000), pero también su tasa de calcificación (Barnes y Lough 1989; Carricart-Ganivet et al. 2000) y el desempeño fotosintético (Kinsey 1985; Falter et al. 2012). Curiosamente, la temporada con temperaturas más altas y mayor irradiancia, en verano, que es cuando el coral adquiere una menor densidad de simbioses y de pigmentación, es también cuando su crecimiento y calcificación es mayor (Barnes y Lough 1989; Carricart-Ganivet et al. 2000). Si los cambios estacionales de la luz y temperatura sobrepasan los máximos del verano, o la tasa de cambios es muy rápida (Chollett et al. 2014), los corales pueden estar expuestos a demasiado estrés térmico y lumínico.

El análisis comparativo que se presenta en este capítulo examina una gran variedad de descriptores estructurales, ópticos y fisiológicos de cuatro especies diferentes. Cada especie fue descrita a partir de colonias sometidas a la misma variabilidad ambiental natural (profundidad en la laguna arrecifal de Puerto Morelos o estacionalidad) o experimental. Construir una base de datos de estas características permite aumentar la variabilidad que se examina de cada parámetro, y también analizar e identificar las asociaciones de variación e interacciones entre parámetros más complejas. Algunos de estos cambios que se analizan reflejan los cambios que ocurren durante el proceso de blanqueamiento de coral, y otros los que ocurren durante el estrés o simplemente cambios fotoaclimatativos en respuesta a la variabilidad estacional. Aquí presentaré primero una descripción general de las características de cada una de las cuatro especies para poder comprender mejor las diferencias entre ellas en sus rangos naturales y también sus cambios estacionales similares.

## 2.2 Materiales y métodos

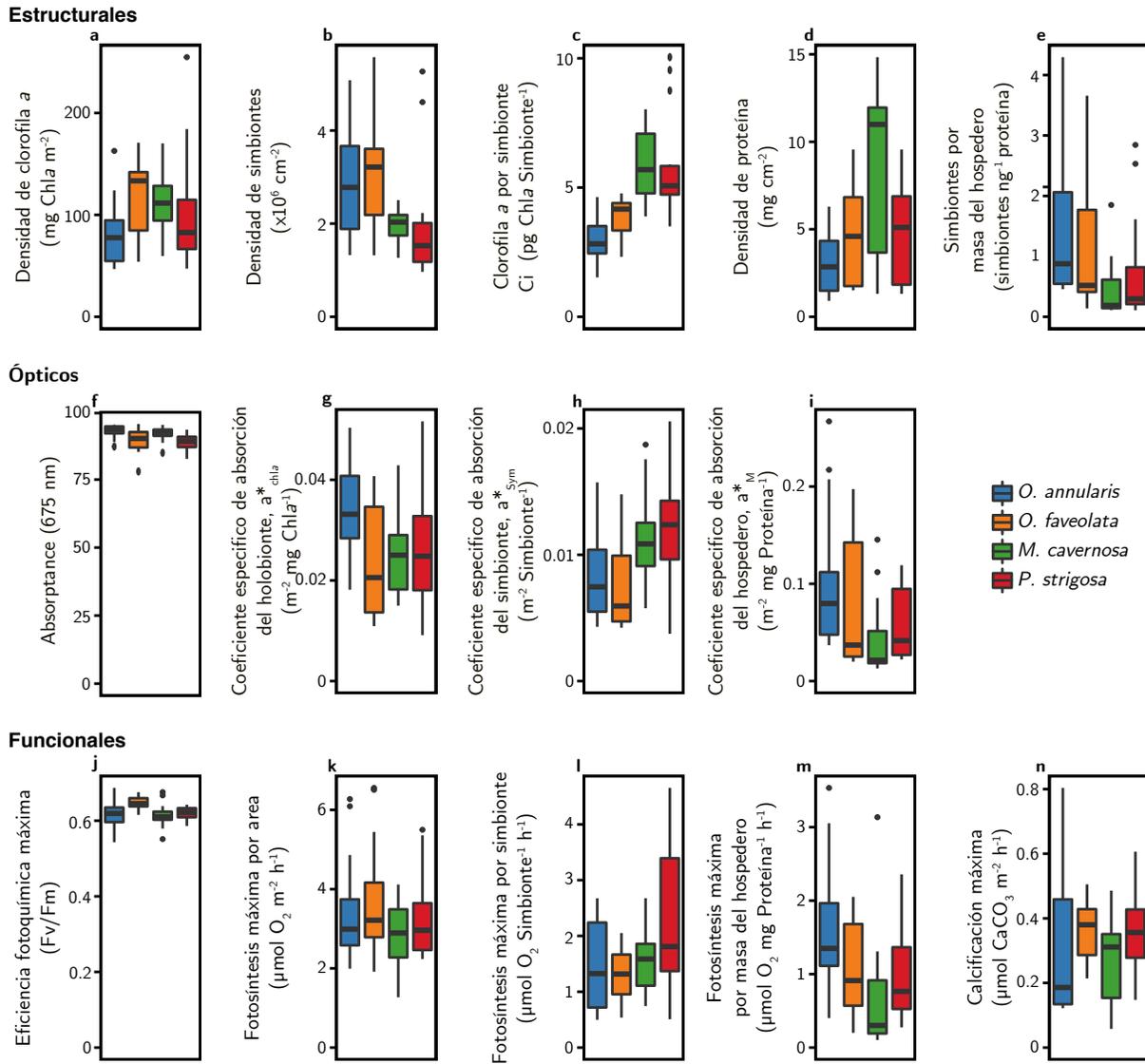
Los datos presentados en este capítulo son una parte de la base de datos generada durante este estudio. Aquí se está examinando sólo la variabilidad de los organismos en las condiciones iniciales (día cero) de cada experimento, es decir, se analiza sólo variabilidad natural que muestra cada especie en respuesta a los cambios estacionales en la laguna de Puerto Morelos. En el caso de *O. faveolata* se utilizaron muestras de organismos colectados al mismo tiempo en la laguna y no utilizados en el experimento de marzo de 2011, ya que los organismos experimentales habían sido colectados en noviembre-diciembre del año anterior y cortados a un tamaño más pequeño. Eran por tanto organismos que procedían de otro tratamiento experimental y que se mantuvieron más tiempo en la laguna en condiciones de fragmentos de colonias y que mostraban características distintas a los de la población natural. Para una descripción de los métodos analíticos usados, por favor refiérase a la sección de material y método general.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Descripción de las características de las cuatro especies examinadas

Con respecto a las características estructurales, las cuatro especies presentaron una grande variabilidad, pero a la vez se observaron densidades de clorofila *a* similares (Figura 2.1a, one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ). Diferencias importantes entre especies se observaron en la densidad de simbiontes (Figura 2.1b) y en su pigmentación intracelular (Ci, Figura 2.1c). Atendiendo a estas diferencias se pudieron identificar dos grupos de especies: uno de alta densidad de simbiontes y bajo Ci formado por las dos *Orbicella spp*; y otro de baja densidad de simbiontes y alto Ci representado por *M. cavernosa* y *P. strigosa*. La misma agrupación se observó en la razón de simbiontes por proteína (Figura 2.1d). La cantidad de proteínas solubles del coral hospedero era significativamente más alta en *M. cavernosa* que en las otras tres especies (Figura 2.1d, one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ), reflejando el hecho de que esta especie tiene pólipos más grandes y un tejido más grueso.

Las diferencias entre los descriptores ópticos fueron más pequeñas, pero se pudieron detectar también diferencias significativas entre especies, *O. annularis* mostró una absorptancia más alta que *P. strigosa* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.001$ ), la especie con valores de absorptancia más bajos. La capacidad de absorción de luz más alta en relación a la densidad de clorofila *a* se encontró en *O. annularis*, la especie que se documentó en esta comparación como el colector de luz más eficiente por unidad de pigmentos, lo que se reflejó en un mayor valor para el coeficiente específico de absorción de luz ( $a^*_{Chla}$ ). La variación del  $a^*_{Chla}$  entre especies siguió un patrón inverso en comparación a la variación en las densidades de clorofila *a*, con valores altos de  $a^*_{Chla}$  en las especies con menor pigmentación y viceversa. El mismo patrón se pudo observar comparando la densidad de simbiontes y el coeficiente específico de absorción de luz por simbionte ( $a^*_{Sym}$ ), así como la densidad de proteína y el coeficiente específico de absorción de luz por masa ( $a^*_M$ ).



**Figura 2.1 Variabilidad natural de las cuatro especies**

Los gráficos de Box muestran la variabilidad natural de los descriptores estructurales (a-e), ópticos (f-i) y funcionales (j-n) de *O. annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *M. cavernosa* (verde) y *P. strigosa* (rojo). Las cajas abarcan la variación entre el 25 y 75% de los cuartiles. La línea representa la mediana y las barras se extienden entre el 95 y 5% de los límites de confianza.

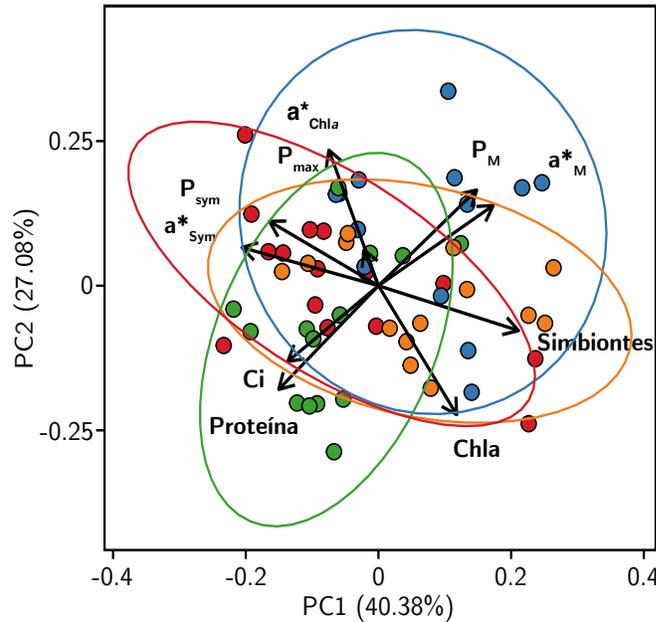
De forma similar a la variación de los atributos ópticos, las diferencias que se observaron entre las cuatro especies en los descriptores fisiológicos fueron pequeñas. La eficiencia fotoquímica máxima (Fv/Fm), por ejemplo, no varió entre especies (Figura 2.1j). Sólo *O. faveolata* mostró valores significativamente más altos (one-way ANOVA,

Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). Las tasas de fotosíntesis normalizadas al área, el  $P_{\max}$ , no mostraron diferencias significativas entre especies (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ), sin embargo, normalizadas al contenido de simbiontes,  $P_{\text{sym}}$ , o al contenido de proteínas solubles del hospedero,  $P_M$ , sí mostraron diferencias siguiendo el mismo patrón de variación anteriormente indicado para sus respectivos descriptores estructurales. El valor más alto de  $P_{\text{sym}}$  fue encontrado en la especie con la densidad de simbiontes más baja, *P. strigosa*. Debido a la gran variabilidad de  $P_{\text{sym}}$  observada en *P. strigosa*, no se encontraron diferencias significativas con *M. cavernosa* y *O. annularis* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ), pero sí con *O. faveolata* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). En el caso de  $P_M$  el valor más alto fue encontrado en *O. annularis*, la especie con el valor más bajo de la densidad de proteínas. De nuevo, una gran variabilidad para este parámetro resultó que la única diferencia significativa para  $P_M$  se encontró entre *O. annularis* y *M. cavernosa* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ), las especies con contenidos de proteínas/masa corporal más contrastantes. Curiosamente, la tasa de calcificación fue similar en las cuatro especies (Figura 2.1n, one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ).

### 2.3.1.1 El análisis de componentes principales (PCA) de los rangos naturales de los holobiontes

El análisis de componentes principales (PCA, Tabla 2.2, Figura 2.2) permitió diferenciar a las cuatro especies que quedaron claramente discriminadas. El primer componente (PC1) explicó 40% de la variabilidad y tuvo una alta correlación con dos descriptores estructurales, la densidad de simbiontes y la densidad de proteínas; dos ópticos,  $a^*_{\text{Sym}}$  y  $a^*_M$ ; y dos fisiológicos,  $P_{\text{sym}}$  y  $P_M$ . El primer componente fue capaz de distinguir entre las dos especies con densidad de simbiontes altas, las dos *Orbicellas spp.*, y las especies con un contenido de proteínas solubles del hospedero y Ci más alto, *M. cavernosa* y *P. strigosa*. El segundo componente (PC2) incrementó la variabilidad explicada al 67% y tuvo una alta correlación con la densidad de clorofila *a* y  $a^*_{\text{Chl}a}$ . Así se diferenciaron las especies con más pigmentación (*O. faveolata*, *M. cavernosa*) de las menos pigmentadas

(*O. annularis*, *P. strigosa*). Finalmente, el tercer componente (PC3) aumentó la variabilidad explicada al 82% gracias a la capacidad explicativa y la alta correlación con el Ci,  $P_{max}$ ,  $a^*_{M}$  y  $P_M$ .



**Figura 2.2 Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras iniciales**

El PCA muestra los descriptores estructurales (clorofila *a*, simbioses, *Ci*, proteína), ópticos ( $a^*_{Chla}$ ,  $a^*_{Sym}$ ,  $a^*_M$ ) y fotosintéticos ( $P_{max}$ ,  $P_{sym}$ ,  $P_M$ ). Flechas negras indican la correlación de los parámetros con PC1 y PC2. Los grupos de los corales muestran *O. annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *M. cavernosa* (verde) y *P. strigosa* (rojo).

**Tabla 2.2 Resultados del análisis de componentes principales (PCA) de las muestras iniciales**

	PC1	PC2	PC3
Clorofila <i>a</i> (mg Chla m <sup>-2</sup> )	0.25	<b>-0.47</b>	0.21
Simbioses (x10 <sup>6</sup> #sym cm <sup>-2</sup> )	<b>0.44</b>	-0.16	-0.00
<i>Ci</i> (pg Chla sym <sup>-1</sup> )	-0.29	-0.27	0.20
Proteínas (mg cm <sup>-2</sup> )	<b>-0.32</b>	<b>-0.38</b>	-0.13

$P_{\max}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )	-0.05	0.13	<b>0.71</b>
$P_{\text{sym}}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ sym}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	<b>-0.35</b>	0.23	<b>0.46</b>
$P_{\text{M}}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	<b>0.31</b>	<b>0.35</b>	0.25
$a^*_{\text{Chl}a}$ ( $\text{m}^{-2} \text{ mg Chl}a^{-1}$ )	-0.16	<b>0.49</b>	<b>-0.32</b>
$a^*_{\text{Sym}}$ ( $\text{m}^{-2} \text{ sym}^{-1}$ )	<b>-0.43</b>	0.14	-0.09
$a^*_{\text{M}}$ ( $\text{m}^{-2} \text{ mg protein}^{-1}$ )	<b>0.36</b>	0.29	-0.03
<hr/>			
Desviación estándar	2.01	1.65	1.21
Fracción de la variación	0.40	0.27	0.15
Fracción acumulativa	0.40	0.67	0.82

Valores en negrita señalan las correlaciones fuertes (loading > 0.3) entre las variables originales y los componentes principales (PC). La tabla muestra los valores de correlación de cada rasgo para los primeros tres componentes. Además, la tabla muestra la variación acumulada de cada componente.

### 2.3.2 Diferencias estacionales

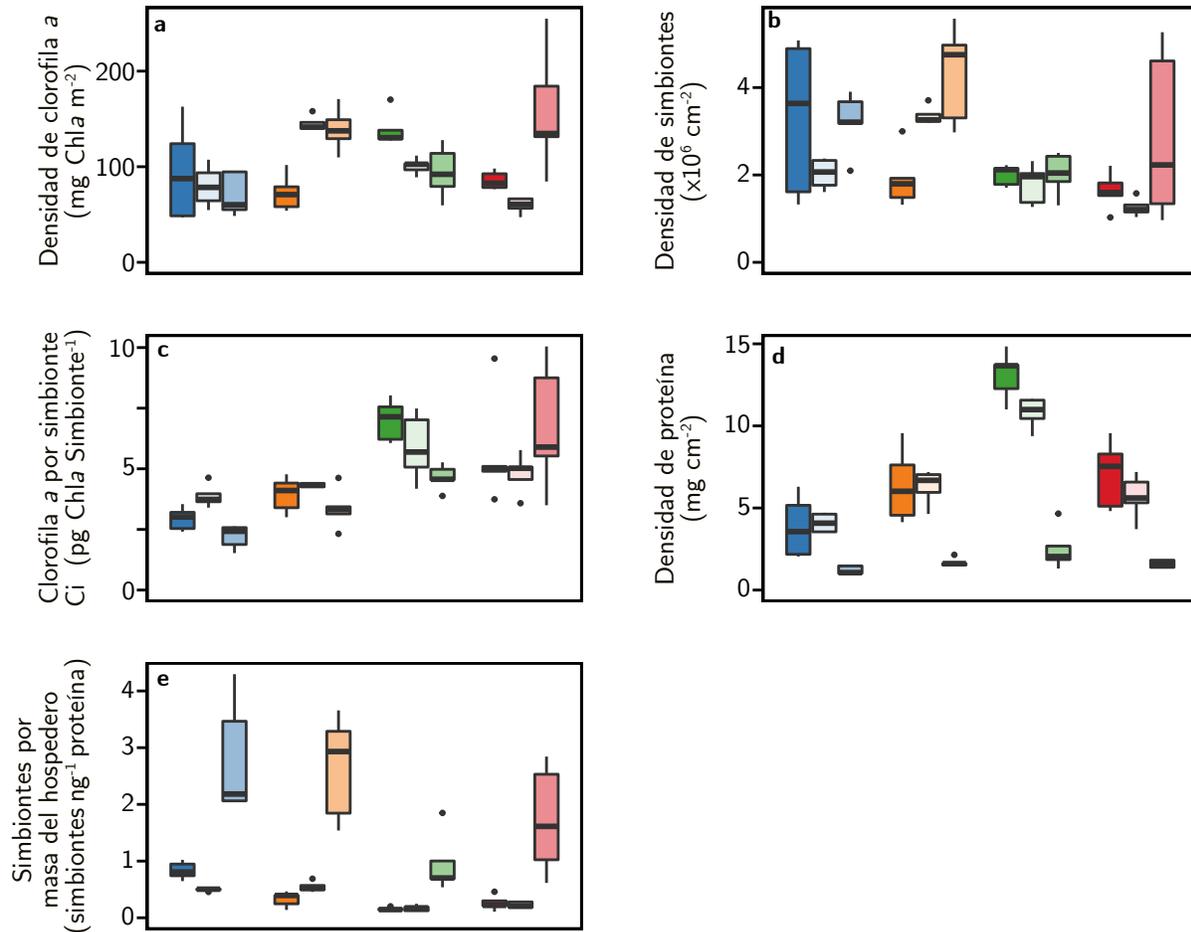
Como se mencionó anteriormente, los corales muestran patrones estacionales en la variación de su pigmentación, contenido de proteínas y densidad de simbiontes (Stimson 1997; Fagoonee et al. 1999; Brown et al. 1999; Fitt et al. 2000), así como también en la fotosíntesis (Kinsey 1985; Kayanne et al. 2005; Falter et al. 2012) y la calcificación (Barnes y Lough 1989; Carricart-Ganivet et al. 2000). Los datos publicados indican que los corales tienen densidades de clorofila *a* y de simbiontes más altas en el invierno, mientras que su productividad, es decir su fotosíntesis y calcificación, son más altas en el verano. Sin embargo, esta es el primer estudio que documenta esta variación estacional en simultáneo para las características estructurales, ópticas y fisiológicas y comparando varias especies.

En las figuras se presenta la variación en el orden de los experimentos, es decir, primero los datos de marzo y octubre de 2011 seguido por los datos de julio 2012. La variación

documentada para el mes de julio representa la condición de los corales al inicio del verano de 2011. Por tanto, marzo representa la condición fisiológica de final del invierno, mientras que octubre, la condición del final del verano y julio la condición del inicio del verano.

### 2.3.2.1 Diferencias estructurales

De acuerdo a los datos publicados (Stimson 1997; Fagoonee et al. 1999; Brown et al. 1999; Fitt et al. 2000), las cuatro especies mostraron cambios estacionales en las densidades de clorofila *a* y simbiotes. Ambos descriptores aumentaron al final del invierno (marzo) y disminuyeron al final del verano (octubre). Como se ha mencionado en los materiales y métodos, los organismos experimentales de *O. faveolata* del experimento de marzo fueron más pequeños y experimentaron un tratamiento diferente en el inicio del experimento, lo cual podría explicar la desviación del ciclo anual esperado. Valores de las densidades de clorofila *a* fueron similares en octubre 2011 y julio 2012, con la excepción de *P. strigosa*, en donde la densidad de clorofila *a* fue mucho más alta en julio que en octubre. La densidad de simbiotes, por otro parte, aumentó en julio en comparación a octubre en todas las especies. La coincidencia del aumento de las dos, de la densidad de clorofila *a* y de simbiotes, fue debida a la presencia de valores de Ci más bajos en julio, otra vez con la excepción de *P. strigosa*. La densidad de proteínas solubles del hospedero fue similar en marzo y octubre 2011 en todas las especies, mientras los valores fueron significativamente más bajos en julio. Las diferencias relativas en los cambios del número de simbiotes y de la biomasa del hospedero descrita como contenido en proteína soluble, se reflejan en la variación de la razón de simbiote por proteína. Este parámetro aumentó significativamente al principio del verano, en julio, y especialmente en las *Orbicellas spp* y en *P. strigosa*. Los valores en el fenotipo de invierno fueron especialmente altos en *O. annularis*.

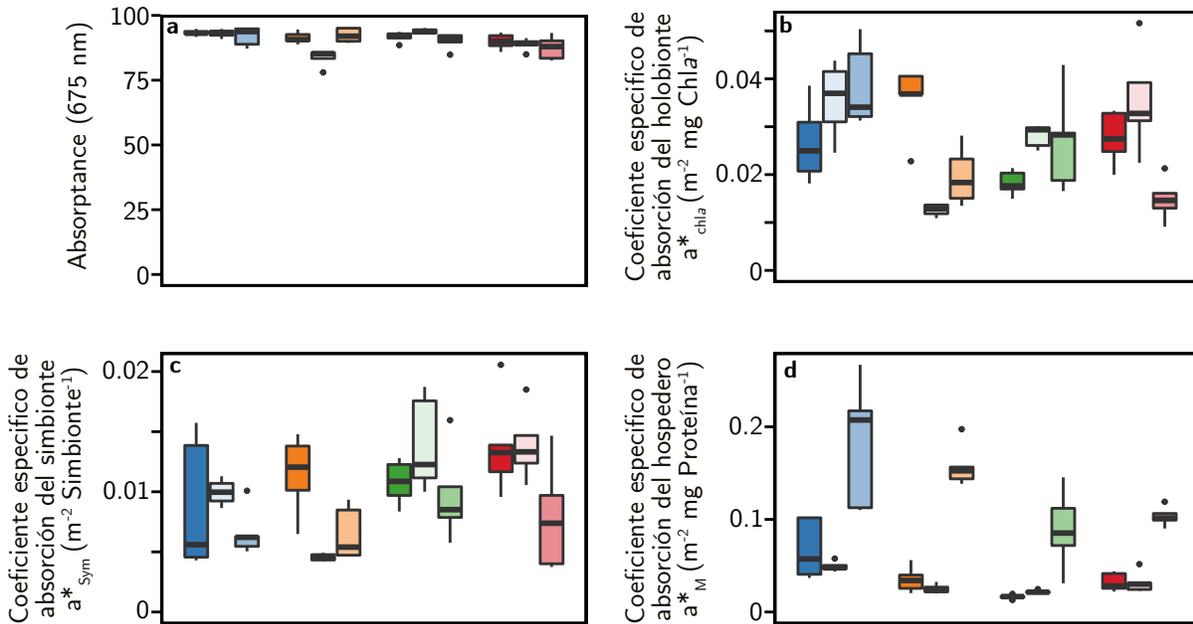


**Figura 2.3 Cambios estacionales de los rasgos estructurales**

Los gráficos de Box muestran la variabilidad natural de *O. annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *M. cavernosa* (verde) y *P. strigosa* (rojo) en marzo 2011 (color oscuro), octubre 2011 (color más claro) y julio 2012 (color claro). Las cajas abarcan la variación entre el 25 y 75% de los cuartiles. La línea representa la mediana y las barras se extienden entre el 95 y 5% de los límites de confianza.

### 2.3.2.2 Variabilidad de los descriptores ópticos

No se encontraron cambios estacionales de la absorptancia en *O. annularis* y *P. strigosa* (Figura 2.4a, one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ), mientras que *O. faveolata* mostró valores significativos más bajos en octubre en comparación con los otros fenotipos (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). Por contraste, *M. cavernosa* mostró una absorptancia mayor en octubre en comparación con julio (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ).



**Figura 2.4 Cambios estacionales de los descriptores ópticos**

Los gráficos de Box muestran la variabilidad natural de *O. annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *M. cavernosa* (verde) y *P. strigosa* (rojo) en marzo 2011 (color oscuro), octubre 2011 (color más claro) y julio 2012 (color claro). Las cajas abarcan la variación entre el 25 y 75% de los cuartiles. La línea representa la mediana y las barras se extienden entre el 95 y 5% de los límites de confianza.

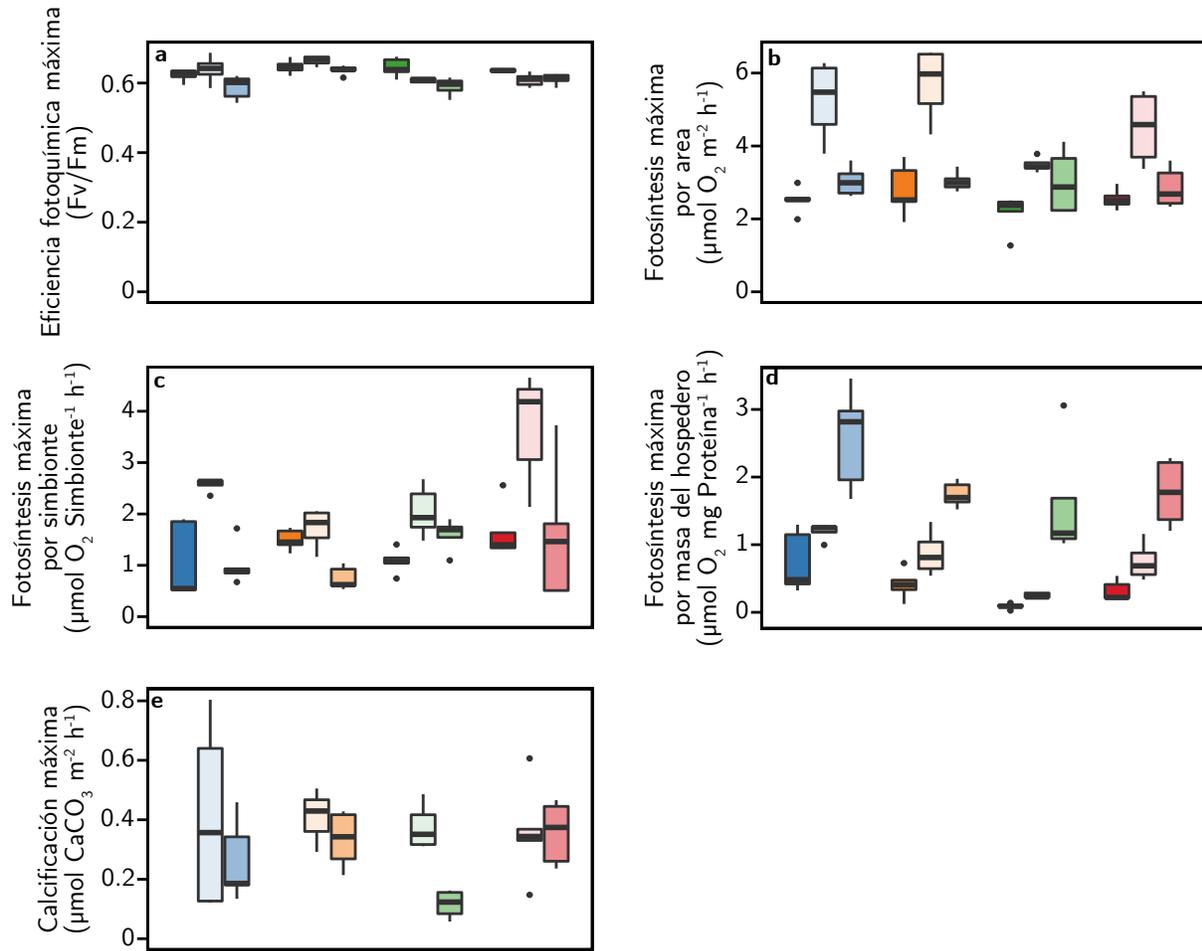
Sin embargo, aunque los cambios en la absorción fueron pequeños, los cambios de los coeficientes específicos de absorción de luz por unidad de clorofila *a* ( $a^*_{Chl a}$ , Figura 2.4b), densidad de simbioses ( $a^*_{Sym}$ , Figura 2.4c), y biomasa de hospedero ( $a^*_M$  Figura 2.4d) fueron mucho mayores y fuertemente dependientes de los cambios de sus respectivos rasgos estructurales. Disminuciones en los descriptores estructurales resultaron en aumentos significativos en los coeficientes específicos de absorción. Los cambios de  $a^*_{Chl a}$  sólo fueron significativos en *O. faveolata* en marzo y en *P. strigosa* en julio en comparación a los otros fenotipos. En el caso de  $a^*_{Sym}$  sólo hubo diferencias significativas en *O. faveolata* en marzo en comparación con los otros fenotipos. Por otro lado,  $a^*_M$  mostró valores significativamente más altos en julio en todas las especies.

### 2.3.2.3 Variabilidad de los descriptores de la fisiología

El análisis del efecto de la estacionalidad sobre la eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) mostró valores menores en julio en todas las especies (Figura 2.5a). En octubre *M. cavernosa* y *P. strigosa* tuvieron valores también menores, mientras que las dos *Orbicella spp* presentaron valores de  $F_v/F_m$  más altos.

La fotosíntesis máxima ( $P_{max}$ , Figura 2.5b) fue significativamente mayor en octubre en comparación a marzo y julio en todas las especies (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ), excepto en *M. cavernosa* debido a la gran variabilidad que se observó en julio (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ). No hubo diferencias en  $P_{max}$  entre marzo y julio (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ). El incremento de la  $P_{max}$  en octubre coincidió con un incremento de la fotosíntesis máxima por simbionte ( $P_{sym}$ , Figura 2.5c). A pesar de los valores bajos de la  $P_{max}$  en julio, los corales mostraron valores más altos de  $P_M$  (Figura 2.5d).

En marzo 2011 no se realizaron determinaciones de calcificación. Se comparan entonces las determinaciones de octubre y julio, que no mostraron diferencias significativas entre los dos experimentos, salvo en *M. cavernosa* que tuvo valores de calcificación más bajos en julio (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ).



**Figura 2.5 Cambios estacionales de la fisiología**

Los gráficos de Box muestran la variabilidad natural de *O. annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *M. cavernosa* (verde) y *P. strigosa* (rojo) en marzo 2011 (color oscuro), octubre 2011 (color más claro) y julio 2012 (color claro). Las cajas abarcan la variación entre el 25 y 75% de los cuartiles. La línea representa la mediana y las barras se extienden entre el 95 y 5% de los límites de confianza.

## 2.4 Discusión

El análisis comparativo presentado en este capítulo explica diferencias entre especies y entre fenotipos estacionales en la variabilidad natural que presenta un diverso grupo de descriptores estructurales, ópticos y fisiológicos en cuatro especies de corales simbióticos del Caribe mexicano.

### 2.4.1 Caracterización general de las cuatro especies de coral

Los descriptores estructurales que se utilizan comúnmente para caracterizar el estado de los corales simbióticos están relacionados con la variación de su pigmentación. El descriptor más comúnmente utilizado es la densidad de clorofila *a*, que no mostró diferencias significativas entre las cuatro especies analizadas. Todas las colonias examinadas se habían fotoaclimatado a la misma profundidad en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, lo que podría explicar esta similaridad, pero independientemente de este hecho, este estudio pudo documentar para todas ellas una importante variabilidad natural asociada a la estacionalidad de la misma magnitud para las cuatro especies. La variación en la densidad de clorofila *a* en el holobionte, fue el resultado, sin embargo, de cambios muy contrastantes en la densidad de simbioses y en el contenido celular de clorofila *a* de los simbioses ( $C_i$ ). Ambos descriptores explican si la misma pigmentación del coral se concentra en pocas células muy pigmentadas, o se distribuye entre muchos simbioses poco pigmentados. En este sentido, se distinguieron dos tipos de coral entre las especies examinadas. Un grupo, formado por las dos *Orbicella spp*, se caracterizó por presentar una alta densidad de simbioses con un  $C_i$  bajo. El otro grupo representado por *M. cavernosa* y *P. strigosa*, se caracterizó por ser corales con menor densidad de simbioses muy pigmentados (con un  $C_i$  más alto).

En contraste con la gran variabilidad documentada para la clorofila *a*, la densidad de simbioses y el  $C_i$ , la capacidad de absorber luz (Absorptancia,  $A_{max}$ ) mostró mucha menos variabilidad (C.V. <10%) estacional en los organismos de coral recién colectados. Sin embargo, sí se pudieron observar diferencias significativas entre especies en la absorptancia máxima,  $A_{max}$ . *O. annularis* alcanzó los valores más altos y *P. strigosa* los más bajos. La capacidad del esqueleto de coral de reflejar la luz incidente, gracias al esparcimiento múltiple de la luz sobre el esqueleto (Enríquez et al. 2005), y que ha permitido que los corales hayan evolucionado como uno de los colectores de luz más eficientes de la naturaleza (Enríquez et al. 2005; Enríquez et al. 2017; Vásquez-Elizondo et al. 2017) podría explicar la poca variabilidad documentada para  $A_{max}$ . Un indicador

de su alta eficiencia para colectar la luz es el alto valor de  $A_{\max}$  que casi es una constante a pesar de la variabilidad de la pigmentación y de la densidad de simbiontes. Las implicaciones de esta observación son importantes, ya que los cambios en la coloración de los corales pueden ser quizás solo observados cuando la pérdida de coloración sea muy fuerte. Esta observación es importante en el contexto del estudio del blanqueamiento, basado fundamentalmente en la identificación de una pérdida importante en la coloración del coral, pues los cambios en la coloración no son siempre un buen reflejo del estado fisiológico del coral.

La definición de blanqueamiento de coral más común se reduce casi exclusivamente a considerar cambios severos en la pigmentación o la densidad de simbiontes (Suggett y Smith 2011). Sin embargo, esta definición es quizás insuficiente. Por ejemplo, las dos especies con una densidad de simbiontes mayor, las dos *Orbicellas*, al mismo tiempo presentaron un tejido más delgado, a juzgar por los bajos valores de proteínas solubles del hospedero. Estas dos características estructurales resultan en una proporción de simbiontes por biomasa de hospedero muy alta, lo que para algunos autores puede posiblemente resultar en un holobionte más susceptible al blanqueamiento (Cunning y Baker 2012; Cunning y Baker 2014). Sin embargo, también se ha documentado que especies con una alta densidad de simbiontes muestran una mortalidad menor durante eventos de blanqueamiento (Stimson et al. 2002), lo que contradice la anterior conclusión. El papel de la densidad de simbiontes en conferir mayor o menor robustez al holobionte frente al estrés por alta temperatura se analizará en los siguientes capítulos de este trabajo, al exponer los mismos organismos aquí analizados a estrés térmico durante 10 días.

En este capítulo se han analizado las diferencias expresadas por los organismos control que reflejan la variabilidad estacional de las cuatro especies, y se han podido reconocer dos grupos que quizás expresen estrategias diferentes de esta simbiosis en el modo en que el holobionte consigue maximizar su fotosíntesis ( $P_{\max}$ ). Las dos *Orbicella spp* albergan

una alta densidad de simbioses poco productivos, como lo refleja la baja fotosíntesis por simbiote ( $P_{sym}$ ), mientras que *M. cavernosa* y *P. strigosa* consiguen una  $P_{max}$  similar con un número de simbioses mucho menor pero más productivos como se puede ver en su alta  $P_{sym}$ .

## 2.4.2 Cambios estacionales

### 2.4.2.1 El fenotipo de invierno y verano

Investigaciones previas han documentado la variabilidad estacional en los descriptores estructurales y funcionales de los corales simbióticos. Estos trabajos se han enfocado a la descripción de la variación de la densidad de clorofila *a* (Fitt et al. 2000), la densidad de simbioses (Stimson 1997; Fagoonee et al. 1999; Fitt et al. 2000), el Ci y la biomasa (Fitt et al. 2000). Otros estudios han mostrado cambios en la fotosíntesis (Kinsey 1985; Kayanne et al. 2005; Falter et al. 2012) y la calcificación (Barnes y Lough 1989; Carricart-Ganivet 2007). Tomando en cuenta los dos extremos de la variación estacional (invierno y verano), se podrían reconocer dos fenotipos contrastantes en el holobionte de las cuatro especies analizadas, uno de invierno y otro de verano. Los dos fenotipos se caracterizan por un holobionte poco productivo con muchos simbioses y una pigmentación alta en el invierno y un holobionte más productivo, pero menos pigmentado y con menor densidad de simbioses en el verano.

En este trabajo, los fenotipos de invierno y verano se pudieron identificar en los organismos control (iniciales) de los experimentos realizados en marzo (final del invierno) y en octubre (final del verano). En marzo, los corales ya han experimentado todo el invierno y han podido desarrollar el fenotipo de invierno. Así mismo, en octubre, los corales han experimentado toda la condición ambiental del verano para desarrollar el fenotipo que aquí denominamos “del verano” con baja densidad de simbioses y pigmentación. En julio, al inicio del verano, el coral presenta un fenotipo más parecido al del final del invierno que al del final del verano.

El papel de los descriptores ópticos no ha recibido mucha atención en ecología de corales escleractíneos. Este estudio es pionero en el análisis y la discusión de su relevancia en la comparación entre especies y también en la comparación de los cambios fotoaclimatativos estacionales de los corales. Cambios en la cantidad de energía solar colectada por los simbioses *in hospite* o en la eficiencia con la que esta energía se colecta, podrían ser muy relevantes para entender tanto las diferencias entre especies y/o fenotipos en la adecuación de los organismos al ambiente, como su impacto sobre la productividad de coral y su fragilidad frente al estrés térmico. En las muestras recién colectadas no se detectaron cambios en la absorción de luz diferentes a los valores máximos ( $A_{\max}$ ). A lo largo del año los corales mantuvieron este valor máximo  $A_{\max}$  con capacidades de absorción de luz por encima del 80% de la luz incidente. Sin embargo, como consecuencia de los cambios en la pigmentación y en la densidad de simbioses, si se observaron cambios significativos en la eficiencia de absorción del holobionte,  $a^*_{\text{Chl}a}$ , y de los simbioses,  $a^*_{\text{Sym}}$ , con un aumento significativo en el fenotipo del verano. Esto implica también un aumento de la energía solar absorbida por unidad de clorofila *a* y/o simbiote (Enríquez et al. 2005) en el fenotipo de verano del coral, lo que podría explicar el aumento de la productividad de los simbioses ( $P_{\text{sym}}$ ) en el verano. En el análisis de PCA realizado en este estudio se observó una co-linearidad entre  $P_{\max}$  y  $a^*_{\text{Chl}a}$ , así como entre  $P_{\text{sym}}$  y  $a^*_{\text{Sym}}$ . No se puede descartar como posible explicación que este aumento esté también asociado a un aumento de los recursos disponibles por simbiote, por ejemplo, un aumento en la disponibilidad de carbono inorgánico disuelto (DIC) a bajas densidades de simbioses (Hoadley et al. 2016).

#### 2.4.2.2 Análisis comparativo de los atributos estructurales y funcionales

Explicar los procesos metabólicos/celulares que ocurren en los ajustes estacionales del holobionte anteriormente descritos, está fuera del alcance de este estudio. Sin embargo, este análisis comparativo ofrece un marco más completo y adecuado a esta simbiosis en la aproximación denominada: “Trait-Based approach”, recientemente propuesta (Madin et al. 2016), con un amplio repertorio de descriptores cuantitativos capaces de

caracterizar una gran variedad de atributos morfológicos y funcionales del coral simbiótico. Aquí se propone que además de las descripciones estructurales y demográficas de los corales simbióticos, o la incorporación propuesta de nuevos atributos derivados de la ecología vegetal (Madin et al. 2016), se puedan utilizar descriptores cuantitativos funcionales de procesos fisiológicos clave de la simbiosis, como es la producción de carbono orgánico e inorgánico, o como son los cambios en la eficiencia en la adquisición de recursos del organismo. Creemos que esta aproximación puede ser la más útil para el desarrollo del “Coral Trait Based Approach”. En este contexto, este análisis comparativo permite no sólo caracterizar cada especie y morfotipo, sino distinguir entre dos grupos: especies con la capacidad de albergar más simbiontes y que además presentan una gran variabilidad en el número de simbiontes que albergan, como las dos *Orbicella spp*; y especies con una densidad de simbiontes reducida, como *M. cavernosa* y *P. strigosa*. Las diferencias en sus atributos estructurales podrían explicar diferencias entre ellas en cómo incrementaron su tasa de fotosíntesis ( $P_{\max}$ ) en el fenotipo de verano. En el primer grupo, las dos *Orbicella spp* aumentaron su productividad manteniendo una alta densidad de simbiontes con pequeños incrementos de la tasa de fotosíntesis por simbionte ( $P_{\text{sym}}$ ). En el segundo grupo, los simbiontes de *M. cavernosa* y *P. strigosa* consiguieron aumentar  $P_{\max}$  aumentando significativamente la tasa de fotosíntesis por simbionte ( $P_{\text{sym}}$ ). *O. annularis* y *P. strigosa* representarían las dos estrategias contrastantes para optimizar la contribución de los simbiontes a la tasa de fotosíntesis. Según el análisis de componentes principales (PCA) *P. strigosa* fue capaz alcanzar tasas de fotosíntesis por área similares a las tasas de *O. faveolata* con una densidad de simbiontes mucho más baja, gracias a un aumento significativo de la fotosíntesis por simbionte. Tal optimización se asoció también, según el PCA, a una mayor eficiencia de la absorción de luz por simbionte ( $a^*_{\text{sym}}$ ).

Cambios en la identidad genética del tipo de simbionte también podrían afectar a la optimización de las tasas de fotosíntesis y de calcificación (LaJeunesse 2002; Baker 2003; Pettay et al. 2015), aunque no se debe descartar la capacidad del hospedero de mejorar

el desempeño de sus simbioses regulando la disponibilidad de recursos fundamentales como la luz (Enríquez et al. 2005; Terán et al. 2010), o el carbono y/o nitrógeno disponible (Grottoli et al. 2006). El análisis de PCA también subrayó la importancia de los cambios en el contenido de proteínas solubles del hospedero y en la pigmentación del simbionte (Ci) para caracterizar diferencias significativas entre especies. La especie que mostró los valores más bajos en los dos atributos, *O. annularis*, presentó por contraste los valores mayores en la tasa de la fotosíntesis por masa ( $P_M$ ) y en la eficiencia de absorción de luz por masa de hospedero ( $a^*_M$ ). Por el contrario, *M. cavernosa* representaría la solución evolutiva opuesta (las  $a^*_M$  y  $P_M$  más bajas), mostrando el desempeño fotosintético menor en el fenotipo de verano y la tasa de calcificación más baja en el fenotipo de invierno.

#### **2.4.2.3 Transición entre fenotipos**

En los organismos recién colectados en julio se observó una alta densidad de simbioses con menor pigmentación (Ci) y al mismo tiempo con una baja densidad de proteínas solubles en el hospedero. Fitt et al. (2000) observaron un desequilibrio similar en la transición al invierno y lo explicaron por una recuperación de la densidad de simbioses más rápida que la capacidad del coral en recuperar la disminución de su masa al final del verano (Fitt et al. 2000). El potencial desequilibrio encontrado en este estudio entre la biomasa del coral y de los simbioses en el inicio de verano indica que el coral disminuye su masa (se “adelgaza”) durante la primavera, mientras que la densidad de simbioses sigue alta. A la vez, parece que los simbioses se han fotoaclimatado ya al incremento de la temperatura y de la luz ya que se observa una menor Ci y sección transversal de absorción de luz en julio en comparación a las determinadas para el fin del invierno. Por tanto, en julio, al principio del verano, los corales presentan un tejido más delgado, hospedando una densidad alta similar de simbioses, aunque menos pigmentados que al final del invierno. Para entender la transición estacional de la condición fisiológica de esta simbiosis y cómo los cambios estacionales en la luz y en la temperatura explican las transiciones del fenotipo de invierno al de verano y viceversa, se debería analizar la

variabilidad de la tasa de estos cambios estacionales en la primavera y en el otoño como sugieren Chollett et al. (2014).

## 2.5 Literatura citada

- Anthony KRN, Hoogenboom MO, Connolly SR (2005) Adaptive variation in coral geometry and the optimization of internal colony light climates. *Functional Ecology* 19, 17-26
- Baker AC (2003) Flexibility and Specificity in Coral-Algal Symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of *Symbiodinium*. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 34, 661-689
- Barnes DJ, Lough JM (1989) The nature of skeletal density banding in scleractinian corals: fine banding and seasonal patterns. *J Exp Mar Biol Ecol* 126, 119-134
- Borowitzka MA (1982) Morphological and Cytological Aspects of Algal Calcification. *International Review of Cytology* 74, 127-162
- Brown BE, Dunne RP, Ambarsari I, Le Tissier MDA, Satapoomin U (1999) Seasonal fluctuations in environmental factors and variations in symbiotic algae and chlorophyll pigments in four Indo-Pacific coral species. *Mar Ecol Prog Ser* 191, 53-69
- Carricart-Ganivet JP (2007) Annual density banding in massive coral skeletons: result of growth strategies to inhabit reefs with high microborers' activity? *Marine Biology* 153, 1-5
- Carricart-Ganivet JP, Beltrán-Torres AU, Merino M, Ruiz-Zárate MA (2000) Skeletal extension, density and calcification rate of the reef building coral *Montastraea annularis* (Ellis and Solander) in the Mexican Caribbean. *Bulletin of Marine Science* 66, 215-224
- Chalker BE, Taylor DL (1975) Light-enhanced calcification, and the role of oxidative phosphorylation in calcification of the coral *Acropora cervicornis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 190, 323-331
- Chollett I, Enríquez S, Mumby PJ (2014) Redefining thermal regimes to design reserves for coral reefs in the face of climate change. *PLoS One* 9, e110634
- Colombo-Pallotta MF, Rodríguez-Román A, Iglesias-Prieto R (2010) Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. *Coral Reefs* 29, 899-907
- Cunning R, Baker AC (2014) Not just who, but how many: the importance of partner abundance in reef coral symbioses. *Front Microbiol* 5, 400
- Cunning R, Baker AC (2012) Excess algal symbionts increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change* 3, 259-262
- Davy SK, Allemand D, Weis VM (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 229-261

- Enríquez S, Schubert N (2014) Direct contribution of the seagrass *Thalassia testudinum* to lime mud production. *Nat Commun* 5, 3835
- Enríquez S, Agustí S, Duarte CM (1994) Light absorption by marine macrophytes. *Oecologia* 98, 121-129
- Enríquez S, Méndez ER, Iglesias-Prieto R (2005) Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol Oceanogr* 50, 1025-1032
- Enríquez S, Méndez ER, Hoegh-Guldberg O, Iglesias-Prieto R (2017) Key functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. *Proc R Soc B* 284, 20161667
- Enríquez S, Sand-Jensen K (2003) Variation in light absorption properties of *Mentha aquatica* L. as a function of leaf form: Implications for plant growth. *Int J Plant Sci* 164, 125-136
- Fagoonee I, Wilson HB, Hassell MP, Turner JR (1999) The dynamics of zooxanthellae populations: A long-term study in the field. *Science* 283, 843-845
- Falkowski PG, Dubinsky Z, Wyman K (1985) Growth-Irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 30, 311-321
- Falter JL, Lowe RJ, Atkinson MJ, Cuet P (2012) Seasonal coupling and de-coupling of net calcification rates from coral reef metabolism and carbonate chemistry at Ningaloo Reef, Western Australia. *J Geophys Res* 117, C05003
- Fitt WK, McFarland FK, Warner ME, Chilcoat GC (2000) Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol Oceanogr* 45, 677-685
- Goreau TF, Goreau NI (1959) The Physiology of Skeleton Formation in Corals. II. Calcium Deposition by Hermatypic Corals under Various Conditions in the Reef. *Biological Bulletin* 117, 239-250
- Grottoli AG, Rodrigues LJ, Palardy JE (2006) Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature* 440, 1186-1189
- Hoadley KD, Pettay DT, Dodge D, Warner ME (2016) Contrasting physiological plasticity in response to environmental stress within different cnidarians and their respective symbionts. *Coral Reefs* 35, 529-542
- Kawaguti S, Sakumoto D (1948) The effect of light on calcium deposition in corals. *Bull Oceanogr Inst Taiwan* 4, 65-70
- Kayanne H, Hata H, Kudo S, Yamano H, Watanabe A, Ikeda Y, Nozaki K, Kato K, Negishi A, Saito H (2005) Seasonal and bleaching-induced changes in coral reef metabolism and CO<sub>2</sub> flux. *Global Biogeochemical Cycles* 19, GB3015
- Kinsey DW (1985) Metabolism, calcification and carbon production I. System level studies. *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress, Tahiti, 27 May-1 June 1985*, 503-542
- Kühl M, Cohen Y, Dalsgaard T, Jørgensen BB, Revsbech NP (1995) Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleratinian corals studied with microsensors for O<sub>2</sub>, pH and light. *Mar Ecol Prog Ser* 117, 159-172

- LaJeunesse TC (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology* 141, 387-400
- Madin JS, Hoogenboom MO, Connolly SR, Darling ES, Falster DS, Huang D, Keith SA, Mizerek T, Pandolfi JM, Putnam HM, Baird AH (2016) A Trait-Based Approach to Advance Coral Reef Science. *Trends Ecol Evol*
- Marcelino LA, Westneat MW, Stoyneva V, Henss J, Rogers JD, Radosevich A, Turzhitsky V, Siple M, Fang A, Swain TD, Fung J, Backman V (2013) Modulation of light-enhancement to symbiotic algae by light-scattering in corals and evolutionary trends in bleaching. *PLoS One* 8, e61492
- Moya A, Tambutté S, Tambutté E, Zoccola D, Caminiti N, Allemand D (2006) Study of calcification during a daily cycle of the coral *Stylophora pistillata*: implications for 'light-enhanced calcification'. *J Exp Biol* 209, 3413-3419
- Paasche E (2001) A review of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* 40, 503
- Pearse VB, Muscatine L (1971) Role of Symbiotic Algae (Zooxanthellae) in Coral Calcification. *Biological Bulletin* 141, 350-363
- Pettay DT, Wham DC, Smith RT, Iglesias-Prieto R, LaJeunesse TC (2015) Microbial invasion of the Caribbean by an Indo-Pacific coral zooxanthella. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 7513-7518
- Ramus J (1990) A form-function analysis of photon capture for seaweeds. *Hydrobiologia* 204, 65-71
- Rodríguez-Román A, Hernández-Pech X, Thomé P, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2006) Photosynthesis and light utilization in the Caribbean coral *Montastraea faveolata* recovering from a bleaching event. *Limnology and Oceanography* 51, 2702-2710
- Salih A, Cox G, Szymczak R, Coles S (2006) The role of host-based color and fluorescent pigments in photoprotection and in reducing bleaching stress in corals. *Proc 10th Int Coral Reef Symp* 746-756
- Scheufen T, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017) Changes in the Number of Symbionts and Symbiodinium Cell Pigmentation Modulate Differentially Coral Light Absorption and Photosynthetic Performance. *Front Mar Sci* 4, 17
- Stimson J, Sakai K, Sembali H (2002) Interspecific comparison of the symbiotic relationship in corals with high and low rates of bleaching-induced mortality. *Coral reefs* 21, 409-421
- Stimson J (1997) The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory-held *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 214, 35-48
- Suggett DJ, Smith DJ (2011) Interpreting the sign of coral bleaching as friend vs. foe. *Global change biology* 17, 45-55
- Terán E, Méndez ER, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2010) Multiple light scattering and absorption in reef-building corals. *Appl Opt* 49, 5032-5042

- Vásquez-Elizondo RM, Enríquez S (2017) Light Absorption in Coralline Algae (Rhodophyta): A Morphological and Functional Approach to Understanding Species Distribution in a Coral Reef Lagoon. *Front Mar Sci* 4, 393
- Vásquez-Elizondo RM, Legaria-Moreno L, Pérez-Castro MÁ, Krämer WE, Scheufen T, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017) Absorptance determinations on multicellular tissues. *Photosynthesis Research* 3, 311-324
- Wangpraseurt D, Larkum AW, Franklin J, Szabó M, Ralph PJ, Kühl M (2014) Lateral light transfer ensures efficient resource distribution in symbiont-bearing corals. *J Exp Biol* 217, 489-498
- Wangpraseurt D, Larkum AW, Ralph PJ, Kühl M (2012) Light gradients and optical microniches in coral tissues. *Front Microbiol* 3, 316

## Capítulo 3 - Efecto del estrés térmico sobre la fisiología de dos condiciones fisiológicas del coral, invierno y verano

---

### 3.1 Introducción

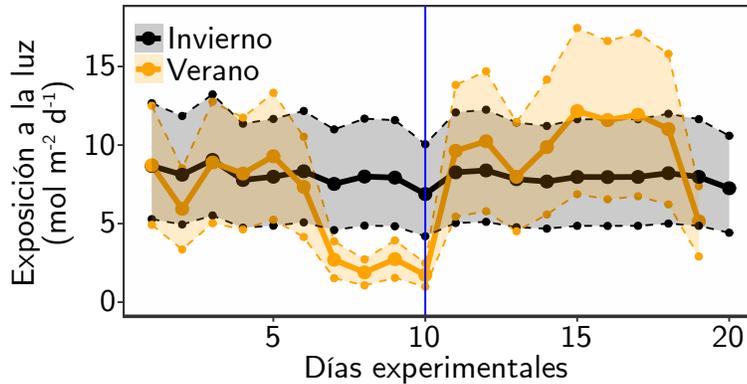
La fluctuación estacional de la temperatura y de la luz es el motor que regula de la variación estacional de la pigmentación los de corales simbióticos (Brown et al. 1999). Esta variabilidad natural es necesario diferenciarla de la pérdida severa de pigmentación (Warner et al. 1996; Iglesias-Prieto y Trench 1997), asociada al fenómeno del blanqueamiento de coral y que conlleva una fuerte perturbación de la relación simbiótica (Hoegh-Guldberg 1999). El blanqueamiento de coral es inducido por la exposición prolongada de los corales a temperaturas  $>1^{\circ}\text{C}$  por encima del máximo promedio local en el verano (MMM o maximum monthly mean), y conduce a un fuerte incremento del estrés lumínico en los simbioses. El blanqueamiento de coral no sólo culmina en pérdidas fuertes de la pigmentación y de los simbioses, sino también en un holobionte disfuncional. Si el coral logra sobrevivir al evento de estrés por temperaturas “anormalmente” elevadas y las condiciones estresantes desaparecen, la asociación simbiótica se puede reestablecer y la fisiología del holobionte puede recuperarse (Grottoli et al. 2014; Schoepf et al. 2015).

Se ha documentado una gran variabilidad entre especies de la susceptibilidad a sufrir el blanqueamiento durante el estrés térmico entre especies (Marshall y Baird 2000; Loya et al. 2001), y se han descrito asociaciones con diferentes características del coral como la morfología de la colonia (Loya et al. 2001), el grosor del tejido (Loya et al. 2001; Thornhill et al. 2011), la fisiología fotosintética del tipo dominante del simbiote (Toller et al. 2001; Rowan 2004), el nivel de energía del hospedero (Grottoli et al. 2006), y/o la capacidad del simbiote y del hospedero soportar altos niveles del estrés oxidativo durante el estrés térmico (Lesser 2006).

Además del amplio espectro de posibles factores ambientales o intrínsecos a la relación simbiótica que pueden afectar a la sensibilidad de los corales simbióticos al estrés térmico y lumínico, examinar si la condición variable del holobionte resultado de su aclimatación estacional puede jugar un papel importante en esta respuesta, podría contribuir también a entender los factores que perturban más fuertemente la relación simbiótica o que le aportan robustez. La importancia de examinar la respuesta de diferentes fenotipos estacionales al estrés térmico la apoya el hecho de que se han documentado diferencias significativas entre el verano y invierno en los umbrales del blanqueamiento (Berkelmans y Willis 1999), aunque este hecho ha recibido todavía poca atención. La mayor parte del esfuerzo actual en el estudio del blanqueamiento de coral se ha enfocado a entender la capacidad de adaptación de esta simbiosis al calentamiento global y a la acidificación del océano, desatendiendo el estudio del mecanismo celular que explica el blanqueamiento y si los cambios en la condición fisiológica del organismo están también asociados con respuestas diferentes al estrés térmico.

### **3.2 Materiales y Métodos**

Para entender si los cambios estacionales en la aclimatación del coral afectan a la susceptibilidad del coral a estrés térmico, se realizaron dos experimentos exponiendo fenotipos del final del invierno y del final de verano (ver capítulo 1), a niveles similares de estrés lumínico y térmico. Los experimentos se realizaron en marzo de 2011, al final de la temporada fría, y en octubre de 2011, al final de la temporada cálida, con organismos colectados y preparados para el análisis experimental, en febrero y en septiembre. Los corales experimentales fueron aclimatados en la laguna arrecifal a temperaturas de agua comparables entre experimentos, y cercanas a la temperatura promedio anual de la laguna arrecifal de Puerto Morelos (SST media anual 28°C, Rodríguez-Martínez et al. 2010). Los organismos experimentales se expusieron durante 10 días en los mesocosmos de la UNAM (UASA-ICML, Puerto Morelos, México) a tres



**Figura 3.1 Exposición diurna en los tanques experimentales**

Variación de las condiciones de luz (exposición diurna,  $\text{mol quanta m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ ) en los tanques experimentales durante de los experimentos de marzo (negro/gris) y octubre 2011 (naranja). Las líneas continuas representan la exposición del tratamiento de media luz (ML), mientras que líneas discontinuas superiores e inferiores representan valores de los tratamientos de alta luz (HL) y baja luz (LL), respectivamente.

tratamientos de temperaturas: control ( $28^{\circ}\text{C}$ ), estrés térmico moderado ( $+2^{\circ}\text{C} = 30^{\circ}\text{C}$ ) y estrés térmico severo ( $+4^{\circ}\text{C} = 32^{\circ}\text{C}$ ). Antes de comenzar los experimentos, se determinó la respuesta de cada especie y fenotipo a cinco temperaturas (de  $26^{\circ}\text{C}$  a  $34^{\circ}\text{C}$ ) en incubaciones cortas. Los experimentos se realizaron utilizando radiación solar natural y en dos temporadas muy contrastantes debido a cambios en la declinación del sol y al diferente grado de nubosidad y afectación por tormentas. Las dos temporadas coinciden en representar las transiciones de invierno a verano (marzo) o de verano a invierno (octubre). Estas diferencias permitieron también analizar el efecto directo de la luz sobre los cambios estacionales en el fenotipo y la fisiología del holobionte. Adicionalmente a los cambios progresivos de la exposición diurna durante cada experimento, se tuvieron que considerar las diferencias significativas entre los dos experimentos en la cobertura de nubes y por tanto en otra fuente de variación, pero estocástica/aleatoria, en la exposición diurna. Para resolver este problema, se usaron tres niveles de irradiancia (alta luz-HL, media luz-ML, baja luz-LL) y aleatoriamente se intercambiaron diariamente los

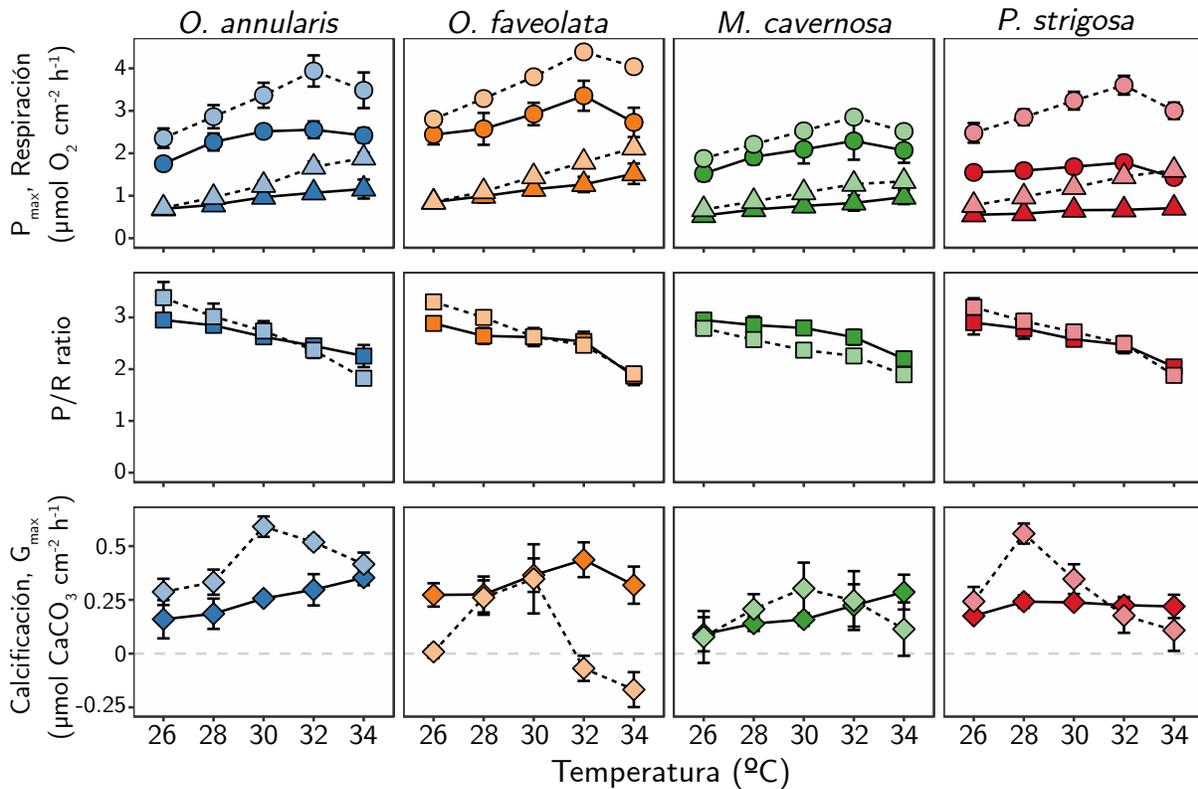
organismos entre los tres tratamientos de luz, para generar regímenes de luz experimentales de alta variabilidad e imprevisibilidad similares entre ambos experimentos. Estas fluctuaciones diarias en la exposición a la luz simularon el paso de frentes de lluvias, que raramente ocurren en marzo, pero son muy frecuentes en septiembre-octubre en la costa del Caribe mexicano (Figura 3.1).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Efecto de la temperatura sobre el metabolismo de coral ( $Q_{10}$ )

Previo al análisis experimental de la respuesta de los corales al estrés térmico, se analizó la respuesta de la fisiología de los organismos a la temperatura en incubaciones cortas. Se observó un aumento de todas las tasas metabólicas, fotosíntesis, respiración y calcificación, con el incremento de la temperatura hasta un determinado valor máximo a partir de cual aumentos progresivos de la temperatura las afectaba negativamente (Figura 3.2). Se observaron efectos adversos en la fotosíntesis del coral por encima de 32°C para todas las especies y fenotipos, pero no se detectó ningún impacto negativo en la respiración post-iluminación en el rango de temperatura (26°C - 34°C) analizado (Figura 3.2a-d). La fotosíntesis y la respiración de los corales mostraron importantes diferencias entre los dos procesos, tanto entre especies como entre condiciones fisiológicas estacionales (fenotipos) en su respuesta a la temperatura. Los valores estimados para el cociente de incremento de la temperatura en 10 grados ( $Q_{10}$ ) fueron significativamente más altos en el verano, especialmente para la respiración, lo que resultó en disminuciones importantes en el cociente P/R del holobionte (Figura 3.2e-h), pero este cociente se mantuvo siempre por encima de 1 en las incubaciones cortas empleadas en este estudio, incluso a las temperaturas más altas analizadas y para todas las especies y fenotipos (Figura 3.2e-h). Las mayores diferencias entre fenotipos se observaron en la tasa de calcificación (Figura 3.2i-l). En invierno, solo *O. faveolata* presentó un efecto adverso a temperaturas por encima de 32°C. Por el contrario, todas las especies mostraron fuertes

efectos adversos en el fenotipo aclimatado al verano, o por encima de los 30°C (los dos *Orbicella spp* y *M. cavernosa*, Figura 3.2i-k), o incluso por encima de 28°C (*P. Strigosa*, Figura 3.2l). Para *O. faveolata*, se estimaron valores negativos, es decir, descalcificación, por encima de 32°C.



**Figura 3.2 Respuestas a la temperatura de las tasas metabólicas**

Se muestra la determinación de las respuestas a la temperatura de las tasas metabólicas de la fotosíntesis (círculos), respiración (triángulos) y calcificación (rombos), de las cuatro especies de coral analizadas y de sus fenotipos de verano (línea discontinua, color más claro) e invierno (línea continua, color más oscuro). Barras marcan el error estándar de la determinación.

### 3.3.2 Análisis experimental de la respuesta de cuatro especies de coral y dos fenotipos estacionales al estrés térmico

Para la realización de este análisis experimental se expusieron organismos aclimatados previamente a  $\approx 28^\circ\text{C}$  (control) tanto en marzo como en octubre a tratamientos de estrés térmico similares de  $+2^\circ\text{C}$  ( $30^\circ\text{C}$ ) y  $+4^\circ\text{C}$  ( $32^\circ\text{C}$ ). Para todas las especies analizadas, el

tratamiento de estrés térmico severo llevó a las mayores modificaciones estructurales y funcionales.

### 3.3.2.1 Cambios estructurales

En marzo de 2011, la densidad de clorofila *a*, Chl*a*, se redujo significativamente en el tratamiento de 32°C en todas las especies después de 10 días de exposición a estrés térmico (Figura 3.3a-d; Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2). *O. annularis* mostró la mayor disminución (65%) y *M. cavernosa* la menor (26%). Sin embargo, en octubre de 2011, la exposición por 10 días a una temperatura de 32°C no indujo ninguna reducción en la pigmentación en ninguna especie (Anexo A, Tabla 6.3 Tabla 6.4). La exposición prolongada al estrés (10 días adicionales a 32°C), por el contrario, causó una disminución muy grande en el contenido de Chl*a* en todas las especies. *M. cavernosa* y *P. strigosa* fueron las especies que sufrieron mayores pérdidas de pigmentación sufrieron, perdiendo ≈80% de sus valores iniciales (Figura 3.3a-d). Por otro lado, la densidad de simbioses también disminuyó significativamente en marzo de 2011 después de 10 días a 32°C, en *O. annularis* (62%), *O. faveolata* (53%) y *P. strigosa* (31%) (Figura 3.3e-h, Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2). En octubre de 2011, de nuevo, sólo se observaron importantes reducciones en la densidad de simbioses en las dos *Orbicella spp*, pero no para *M. cavernosa* y *P. strigosa*. Al extender el estrés térmico por otros 10 días, si se observó una disminución importante de la densidad de simbioses en todas las especies, las mayores reducciones se observaron en *M. cavernosa* y *P. strigosa* (≈80%, Figura 3.3g,h, Anexo A, Tabla 6.3 Tabla 6.4).

La variabilidad entre réplicas del contenido de clorofila *a* por simbiote (Ci) fue muy grande, lo que resultó en una fuerte limitación en la capacidad de detectar cambios significativos de este análisis en la mayoría de las comparaciones (Figura 3.3i-l). En marzo de 2011, sólo se observaron reducciones significativas del Ci en *O. faveolata* después de 10 días a 30°C (Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2). Este tratamiento, curiosamente, indujo para esta especie disminuciones mayores en el Ci que la exposición

a 32°C. En este mes de marzo, los simbioses incrementaron su Ci en las condiciones control de tres especies: *M. cavernosa*, *P. strigosa* y *O. annularis*. Sin embargo, bajo estrés térmico los valores de Ci se redujeron progresivamente (Figura 3.3i-l), aunque los cambios sólo fueron significativos para *M. cavernosa*. En octubre, por contraste, se observó la respuesta opuesta para las dos *Orbicella spp*, con incrementos en el Ci después de la exposición a estrés térmico (Figura 3.3i-l). Los mayores incrementos se estimaron para los simbioses de *O. annularis* expuestos a 32°C (49%). Esta especie aún mostró mayores valores en su Ci durante la fase extendida de estrés térmico (Figura 3.3i).

Con respecto a los cambios en el contenido de proteínas solubles del tejido del hospedero, *M. cavernosa* fue la única especie que redujo este contenido en marzo de 2011 después de exponerse a 32°C en marzo de 2011 (Figura 3.3o, Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2). En octubre de 2011, los valores fueron menos variables entre réplicas y claramente inferiores para esta especie. Sin embargo, se observó que se incrementaron en todos los organismos expuestos a 32°C, aunque los cambios sólo fueron significativos para *O. annularis* y *M. cavernosa* (Figura 3.3m-p, Anexo A, Tabla 6.3 Tabla 6.4). Al extender el estrés térmico en octubre por 10 días más en octubre, se observaron disminuciones en el contenido de proteínas solubles del hospedero para todas las especies, excepto para *O. faveolata* (Figura 3.3m-p), aunque los cambios solo fueron significativos para *M. cavernosa* (Anexo A, Tabla 6.3 Tabla 6.4). Finalmente, la variación en el contenido relativo de simbioses descrita por el número de simbioses por proteína soluble del hospedero disminuyó en marzo 2011 en los organismos expuestos a estrés térmico excepto para los de *M. cavernosa* (Figura 3.3q-t). Estas disminuciones fueron mayores para las dos *Orbicellas spp* en los dos experimentos. A 32°C disminuyeron entre un 39% y 76% (Figura 3.3q-t). Las otras dos especies, *M. cavernosa* y *P. strigosa*, también mostraron en octubre valores reducidos para este parámetro.

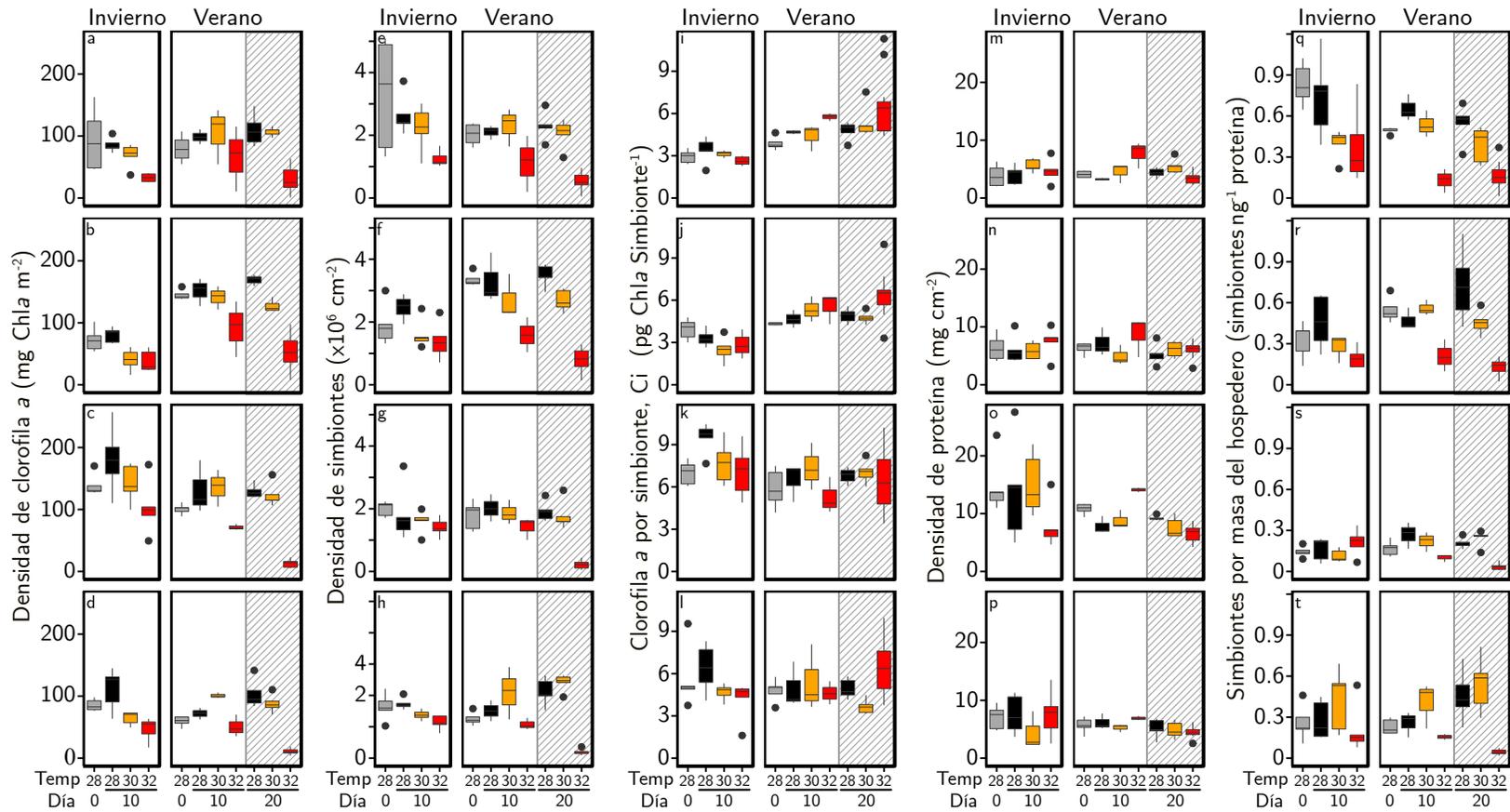
### 3.3.2.2 Variación de la eficiencia fotoquímica máxima de fotosistema II (Fv/Fm)

Este parámetro mostró en marzo una disminución progresiva durante los 10 días que duró el experimento, disminuciones que fueron proporcionales al nivel de la severidad del estrés térmico aplicado: moderado a 30°C y severo a 32°C (Figura 3.4a-d). Se observó también una pequeña disminución de Fv/Fm, y significativa, en las muestras control expuestas a 28°C de *M. cavernosa* y *P. strigosa* (Figura 3.4c,d, Anexo A Tabla 6.5, Tabla 6.6). En octubre de 2011, por el contrario, se observó reducción progresiva de Fv/Fm en estas mismas muestras control, aunque sólo hasta el día 6, seguido de una recuperación o el mantenimiento de los valores de Fv/Fm similares hasta el día 10 (Figura 3.4a-d). Esta recuperación coincidió con condiciones de mucha menor iluminación, días nublados, asociadas al paso de los frentes del huracán Rina, lo que redujo dramáticamente la exposición diurna después del día 6. Los niveles de luz regresaron a niveles iniciales en el día 0 o incluso más altos después del día 11 (Figura 3.1). Esto implica que los organismos experimentales estuvieron expuestos a fuertes incrementos de la irradiancia durante los 10 días adicionales de estrés térmico que se aplicaron sólo en el experimento de octubre (Figura 3.1). Curiosamente, los organismos del tratamiento control, pero también los expuestos a 30°C en octubre, no experimentaron cambios significativos en Fv/Fm, mientras que los que se expusieron a estrés térmico severo, a 32°C, acumularon una importante cantidad de fotodaño (inactivación del fotosistema II, PS II) en todas las especies (Figura 3.4a-d). Se estimaron disminuciones muy grandes en *M. cavernosa* (73%) y *P. strigosa* (40%), y moderadas en *O. faveolata* (27%) y *O. annularis* (21%; Figura 3.4a-d). Por contraste, el impacto sobre Fv/Fm que se observó en marzo fue el mayor en los organismos de *M. cavernosa* y *O. annularis* expuestos a 32°C (reducciones de 34-35%; Figura 3.4a,c), pero todas las especies y tratamientos experimentaron cambios significativos en el día 10, excepto los de *O. faveolata* del tratamiento control y de estrés térmico moderado, 30°C. Sin embargo, en octubre de 2011 sólo la aplicación de estrés térmico severo, 32°C, indujo una caída significativa en Fv/Fm (Figura 3.4a-d).

### 3.3.2.3 Impacto sobre la fotosíntesis del holobionte del holobionte, $P_{\max}$ y $P_M$

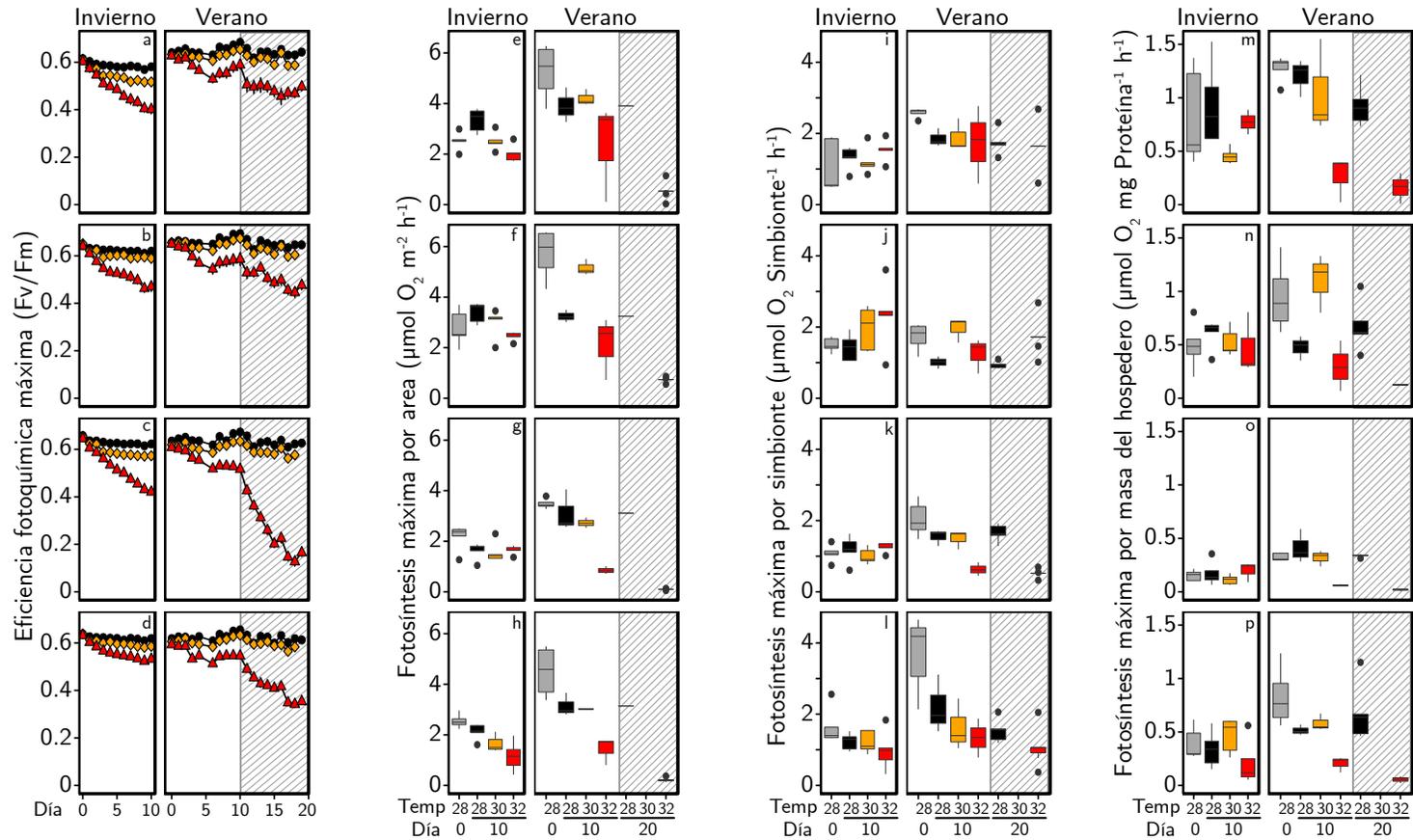
Para entender cómo se reflejaron los cambios de  $F_v/F_m$  con la actividad fotosintética se analizó directamente la variación de la fotosíntesis. En marzo de 2011 *P. strigosa* fue la única especie que mostró una disminución significativa de  $P_{\max}$  cuando se expusieron los organismos a temperaturas elevadas (Figura 3.4h, Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2), y a pesar de los cambios tan grandes que se observaron en la pigmentación en todas las especies. Las dos *Orbicella spp* incrementaron su  $P_{\max}$  después de 10 días a 28°C, aunque sólo se detectaron cambios significativos en *O. annularis* (Figura 3.4e-h, Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2). Sin embargo, en octubre todas las especies experimentaron disminuciones significativas de  $P_{\max}$ , especialmente a 32°C (Figura 3.4e-h, Anexo A, Tabla 6.3 Tabla 6.4). Más aun, el estrés térmico prolongado resultó en una supresión completa de  $P_{\max}$  en los organismos de *M. cavernosa* y *P. strigosa* expuestos a 32°C, y se observaron disminuciones muy severas en los de *O. annularis* (90%) y *O. faveolata* (87%), aunque estos valores no fueron todavía significativamente distintos de 0.

Normalizando los valores de las tasas de fotosíntesis de los corales al contenido de proteínas solubles ( $P_M$ ) se observó en marzo que después de 10 días a 32°C sólo las dos *Orbicella spp* y *P. strigosa* sufrieron reducciones pequeñas en  $P_M$ , aunque no significativas, mientras que *M. cavernosa* no experimentó ningún cambio en este descriptor (Figura 3.4i-l, Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2). Sin embargo, en octubre todas las especies experimentaron disminuciones significativas en su  $P_M$  a 32°C (Figura 3.4i-l, Anexo A, Tabla 6.3, Tabla 6.4).



**Figura 3.3 Cambios en los atributos estructurales de los fenotipos de invierno y verano**

Gráficos de Box, para describir los cambios en los atributos estructurales de los fenotipos de invierno y verano de los corales en los organismos control ( $28^{\circ}\text{C}$ , gris), sometidos a estrés térmico moderado,  $+2^{\circ}\text{C}$  ( $30^{\circ}\text{C}$ , negro), y sometidos a estrés térmico severo,  $+4^{\circ}\text{C}$ , ( $32^{\circ}\text{C}$ , rojo). La trama gris de rayas diagonales indica la extensión del estrés térmico durante 10 días más en el experimento de octubre.



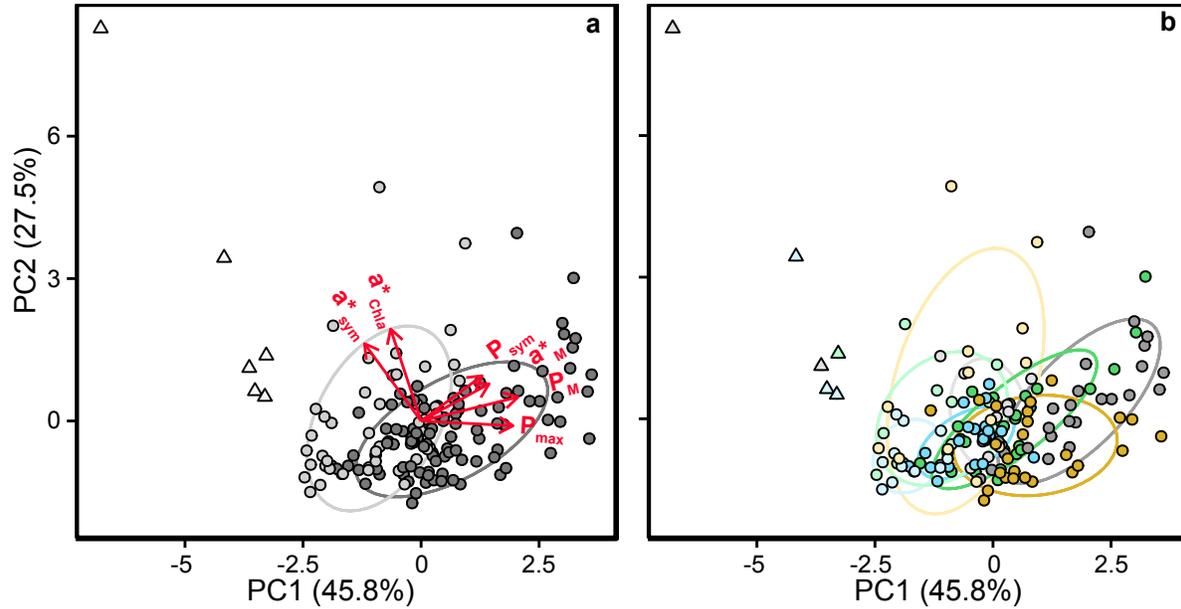
**Figura 3.4 Cambios en los atributos funcionales de los fenotipos de invierno y verano**

Gráficos de Box, para describir los cambios en los atributos funcionales de los fenotipos de invierno y verano de los corales en los organismos control (28°C, gris), sometidos a estrés térmico moderado, +2°C (30°C, negro), y sometidos a estrés térmico severo, +4°C, (32°C, rojo). La trama gris de rayas diagonales indica la extensión del estrés térmico durante 10 días más en el experimento de octubre.

### 3.3.2.4 Impacto sobre la fotosíntesis de *Symbiodinium*, $P_{sym}$

Para entender el impacto directo del estrés térmico sobre las algas simbiotas se examinó la variación de  $P_{sym}$ . No se observaron cambios significativos en  $P_{sym}$  para ninguna especie o tratamiento en marzo del 2011 (Figura 3.4m-p, Anexo A Tabla 6.1 Tabla 6.2). Sin embargo, en octubre del 2011, se observó un impacto negativo del estrés térmico en los valores de  $P_{sym}$  de *P. strigosa* y *M. cavernosa* (Figura 3.4o,p, Anexo A, Tabla 6.3, Tabla 6.4). En las dos *Orbicella spp*, no se observaron cambios significativos en  $P_{sym}$  entre tratamientos (Figura 3.4m,n). Al extender el estrés térmico por 10 días más, los valores de  $P_{sym}$  en el día 20 del tratamiento fueron similares en las dos *Orbicella spp* a los valores iniciales, mientras que en *M. cavernosa* y *P. strigosa* los valores fueron similar a los valores ya menores determinados para el día 10 (Figura 3.4o,p, Anexo A, Tabla 6.3, Tabla 6.4).

Al realizar un análisis de componentes principales (PCA) con los organismos control y estresados, se observó que los parámetros funcionales que mejor describían la variabilidad inducida por el estrés térmico (Figura 3.5) fueron descriptores de la fotosíntesis,  $P_M$ ,  $P_{max}$  y aún  $P_{sym}$ , negativamente asociados con la eficiencia de absorción de luz de los simbiotas  $a^*_{sym}$ , pero positivamente asociados con la eficiencia de absorción de luz del hospedero,  $a^*_M$ . Este primer componente del análisis (PC1) fue capaz de describir el 46% de la varianza inducida en los experimentos en las cuatro especies y en los dos fenotipos estacionales. El segundo componente (PC2) incrementó la variabilidad explicada al 73% gracias a la capacidad explicativa de  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{sym}$ , aunque  $P_{sym}$  también presentó una contribución significativa (Figura 3.5, Tabla 3.1). Con el tercer componente (PC3) la variabilidad explicada se incrementó hasta un 90%, gracias a la contribución de  $a^*_M$ , negativamente asociada con  $P_{sym}$  y positivamente con  $P_{max}$  (Tabla 3.1).



**Figura 3.5 Análisis de componentes principales (PCA) de los corales no-estresados y estresados**

(a) Los grupos de los corales del control (círculos oscuros), estresados (círculos grises) y blanqueados (círculos claros) basado en sus descriptores ópticos ( $a^*_{Chla}$ ,  $a^*_{Sym}$ ,  $a^*_M$ ) y foto-fisiológicos ( $P_{max}$ ,  $P_{Sym}$ ,  $P_M$ ). Flechas rojas indican las correlaciones de los descriptores con el PC1 y PC2. (b) Los grupos de los corales del control, estresados y blanqueados basados en los mismos descriptores por especie: *O. annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *M. cavernosa* (verde) y *P. strigosa* (rojo). Diferencias en los colores marcan el rango del estrés, de no-estresados (oscuro) a blanqueados (claros).

**Tabla 3.1 Resultados del análisis de componentes principales (PCA)**

	PC1	PC2	PC3
$a^*_{chl a}$ ( $m^2 \text{ mgChl} a^{-1}$ )	-0.17	<b>0.68</b>	-0.06
$a^*_{sym}$ ( $m^2 \text{ Symbiont}^{-1}$ )	<b>-0.32</b>	<b>0.57</b>	0.11
$a^*_M$ ( $m^2 \text{ mgProtein}^{-1}$ )	<b>0.39</b>	0.27	<b>-0.65</b>
$P_{max}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )	<b>0.53</b>	-0.03	<b>0.35</b>
$P_{sym}$ ( $\text{pmol O}_2 \text{ Symbiont}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	<b>0.35</b>	<b>0.33</b>	<b>0.62</b>
$P_M$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ protein}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	<b>0.56</b>	0.18	-0.22
Standard deviation	1.66	1.29	0.99
Proportion of Variance	0.46	0.28	0.16
Cumulative Proportion	0.46	0.73	0.90

Valores en negrita señalan las correlaciones fuertes (loading > 0.3) entre las variables originales y los componentes principales (PC). La tabla muestra los valores de correlación de cada rasgo para los primeros tres componentes. Además, la tabla muestra la variación acumulada de cada componente.

### 3.4 Discusión

En este análisis experimental se encontraron respuestas muy contrastantes entre las cuatro especies de coral y entre dos fenotipos estacionales, al exponer los organismos a niveles similares de estrés térmico, tanto moderados como severos, bajo moderados niveles de estrés lumínico. Curiosamente, los resultados también revelaron grandes similitudes entre las cuatro especies de coral investigadas en su aclimatación estacional y en la susceptibilidad de cada fenotipo al estrés lumínico y térmico.

El fenotipo de verano se caracterizó por presentar tasas más altas de calcificación y de fotosíntesis por área ( $P_{\max}$ ), por simbionte ( $P_{\text{sym}}$ ) y por masa del hospedero ( $P_M$ ), lo que concuerda con el mayor crecimiento (Barnes y Lough 1989) y la mayor producción de carbonato de calcio (Kinsey 1985; Carricart-Ganivet et al. 2000; Kayanne et al. 2005; Falter et al. 2012) documentada ampliamente en la literatura para corales simbióticos. El fenotipo de invierno no presentó ningún efecto negativo de las exposiciones cortas a estrés térmico, sobre las tasas de calcificación de tres especies. *O. faveolata* fue la única especie que sí presentó una respuesta negativa al estrés térmico en el fenotipo de invierno, y también sufrió las disminuciones más grandes en la calcificación al exponer su fenotipo de verano a similares niveles de estrés térmico. Sin embargo, esta especie mostró la respuesta más robusta de la fotosíntesis del holobionte a estrés térmico en los dos fenotipos. El factor de incremento del metabolismo con la temperatura ( $Q_{10}$ ) fue menor en el fenotipo de invierno en todas las especies investigadas, y en todos los procesos metabólicos, fotosíntesis, respiración y calcificación. En general, el análisis de la respuesta del metabolismo del coral al incremento de temperatura en incubaciones cortas reveló que la exposición a temperaturas elevadas indujo caídas significativas de la calcificación en las cuatro especies, y que estas fueron mayores en el fenotipo de verano. Esto implica que la variabilidad estacional de la producción de carbonato de calcio de los corales simbióticos no está sólo regulada por los cambios estacionales en luz y temperatura externos en el ambiente, sino que debe existir también un componente intrínseco en el holobionte relacionado con la condición fisiológica de la simbiosis, capaz de explicar la diferente sensibilidad al estrés térmico documentada entre especies, pero también los diferentes umbrales de blanqueamiento documentados en el invierno y en el verano (Berkelmans y Willis 1999).

La exposición por 10 y 20 días a estrés térmico resultó en una acumulación significativa de daño fotosintético en los simbiontes para las cuatro especies de coral y los dos fenotipos estacionales caracterizados en una acumulación significativa de daño fotosintético en los simbiontes. Comparando los primeros 10 días experimentales, se

observó una mayor acumulación de daño en los simbioses en el fenotipo de invierno (experimento realizado en marzo), independientemente de la especie y de la variabilidad potencial del tipo de simbiote dominante. Desafortunadamente esta variación en la población de alga simbioses no fue caracterizada en este estudio. Por otro lado, la única especie que no mostró esta respuesta en marzo, *P. strigosa*, también presentó la respuesta más robusta de los simbioses al estrés lumínico *in hospite* en octubre, pero a excepción de la fase de estrés térmico extendida de octubre. Los resultados aquí presentados concuerdan con los estudios previos que habían documentado que el estrés lumínico *in hospite* se ve exacerbado a temperaturas elevadas (Iglesias-Prieto et al. 1992; Jones et al. 1998; Warner et al. 1999; Takahashi et al. 2004; Hill et al. 2011). Además, los resultados confirman la especificidad de esta respuesta (Fitt et al. 2009), ya que *M. cavernosa* y *O. annularis* mostraron el impacto mayor con las pérdidas mayores de simbioses, mientras que *O. faveolata* y *P. strigosa* presentaron las respuestas más robustas de la fotosíntesis al estrés térmico. Un incremento similar del estrés lumínico y específico para cada especie se ha reportado recientemente para algas coralinas después de una exposición a estrés térmico bajo condiciones también moderadas de estrés lumínico (Vásquez-Elizondo y Enríquez 2016). En este estudio se ha podido documentar por primera vez que la gravedad del impacto del estrés lumínico en las algas de la familia *Symbiodinaceae* (LaJeunesse et al. 2018) *in hospite* durante el estrés térmico, medido como disminución de Fv/Fm, tiene un componente inherente a la condición fisiológica del coral, independiente de las fluctuaciones ambientales externas de luz y temperatura (Warner et al. 2002). Este componente tiene que estar relacionado con el estado fisiológico del holobionte. Asombrosamente, las mayores disminuciones de Fv/Fm que se observaron en los fenotipos de invierno no resultaron en reducciones similares de la fotosíntesis. Al contrario, las tasas de fotosíntesis del coral se vieron menos afectadas por el estrés térmico en el fenotipo de invierno. Esta observación es una llamada de atención a la interpretación de que la disminución de Fv/Fm es un sinónimo de fotoinhibición y, por tanto, un descriptor de cambios en la tasa de fotosíntesis. Disminuciones de Fv/Fm

reflejan en primer lugar la respuesta de cualquier organismo fotosintético a incrementos en el estrés lumínico. La ausencia de fotoinhibición de la actividad fotosintética en el fenotipo de invierno a pesar de la caída  $F_v/F_m$  documentada, es un claro indicador de la presencia de una respuesta fotoaclimatativa a alta luz en los simbioses. Esta respuesta a alta luz también la confirman las disminuciones tan importantes que se midieron en marzo en la pigmentación de los simbioses ( $C_i$ ), lo que resultó en pérdidas mayores de pigmentación, pero cambios menores en la densidad de simbioses. Una respuesta similar en la variación de  $F_v/F_m$  y en la pigmentación de los corales como resultado de la exposición al estrés térmico no se observó en octubre, pero sí se estimaron disminuciones mayores de la fotosíntesis. La robustez del fenotipo del invierno es aún más sorprendente considerando que se aplicó en marzo un estrés térmico experimental un poco mayor al de octubre, ya que los organismos control estaban aclimatados *in situ* ligeramente por debajo de las condiciones control (28°C, ver Figura 1.2). Por lo tanto, los resultados de este estudio no solo evidencian la importancia de los simbioses y de su habilidad para fotoaclimatarse a condiciones de alta luz en la determinación de la susceptibilidad de los corales simbióticos al estrés térmico, sino también demuestran que esta susceptibilidad depende de la condición fisiológica del hospedero (*i.e.*, su fenotipo) y no sólo de la variabilidad genética/funcional de la población de simbioses. Estos resultados también evidencian la relevancia de la variabilidad estacional en la fisiología del holobionte para entender la estabilidad de esta simbiosis y el blanqueamiento de coral. Hay que resaltar para entender parte de este componente intrínseco del holobionte la posible contribución del campo lumínico local de los simbioses *in hospite* (Wangpraseurt et al. 2012; Wangpraseurt et al. 2014b) y en especial la velocidad con la que ocurren los cambios de este campo lumínico interno como consecuencia de la pérdida de pigmentación del tejido del coral durante la exposición a estrés térmico.

Nuestros resultados también indican que se debe tener precaución al interpretar la variabilidad de  $F_v/F_m$ , especialmente cuando no está apoyada por mediciones de otros atributos funcionales y fisiológicos. Atención especial requiere la variación de la

irradiancia instantánea y de la exposición diaria cuando se analiza la respuesta de los corales al estrés utilizando  $F_v/F_m$  como el descriptor fisiológico principal. En este sentido, es importante resaltar que la variabilidad de  $F_v/F_m$  puede proporcionar mucha más información que la simple cuantificación del impacto negativo sobre la fotosíntesis. Por ejemplo, analizando en más detalle la variación de  $F_v/F_m$  de los organismos control en los dos experimentos, observamos dos tendencias opuestas: una acumulación pequeña, pero significativa de fotodaño en marzo, y una recuperación progresiva en octubre al final de los primeros 10 días de cada experimento. Además, en marzo,  $P_{max}$  aumentó en los corales control de las dos *Orbicella spp*, mientras que en octubre los corales control y también los expuestos a 30°C, experimentaron disminuciones de  $P_{max}$  a pesar de que no se registró acumulación de fotodaño como consecuencia del estrés lumínico. Se pueden interpretar estos hallazgos como el efecto directo de la irradiancia, y en concreto de la variación de la declinación del sol en cada período de transición, primavera y otoño, sobre los simbioses *in hospite*, expresado en dos patrones de cambio de  $F_v/F_m$  opuestos. Esta variación estacional de  $F_v/F_m$  de los simbioses, documentado previamente por Warner et al. (2002), podría ser el motor ambiental que explique el desarrollo de los dos fenotipos estacionales descritos en este trabajo. La variación interanual en los cambios estacionales de luz y temperatura podrían condicionar diferencias en el desarrollo del fenotipo de verano y en consecuencia en la condición fisiológica del holobionte y por tanto en su capacidad de hacer frente a eventos de estrés térmico similares (Chollett et al. 2014). Esto podría explicar también por que la pre-exposición a estrés térmico moderado es capaz de inducir tolerancia al estrés térmico (Ainsworth et al. 2016). El estudio presentado aquí apoya, en principio, esta conclusión ya que los corales expuestos en octubre a 30°C y previamente aclimatados en el campo a esa temperatura en el mes de agosto (Figura 1.2), no experimentaron estrés, mientras que, en marzo, el tratamiento de 30°C indujo un importante fotodaño en los simbioses y reducciones en la pigmentación de coral. Sin embargo, la aclimatación en el verano a elevada temperatura resultó en un holobionte más propenso a perder desempeño

fotosintético a 32°C, una condición ambiental claramente por encima del MMM local (30°C). Así, los hallazgos presentados aquí no soportan totalmente la conclusión de Ainsworth et al. (2016) que además documentaron patrones similares de expresión genética entre los organismos control y estresados, lo que cuestiona su capacidad experimental de este estudio de inducir suficiente estrés en los tratamientos. Esta situación resalta aún más la necesidad de distinguir entre los fenotipos estresados y blanqueados de coral, todavía no suficientemente establecida y sobre todo atendida en el estudio del blanqueamiento de coral. Solo una comprensión más profunda de los mecanismos fisiológicos/celulares involucrados en la adquisición de tolerancia a estrés térmico ayudará a dilucidar el origen de las diferencias entre especies a experimentar blanqueamiento.

Si se considera el blanqueamiento como el punto final de una cascada de eventos fisiológicos, que comienza con una mayor tasa de daño al aparato fotosintético del simbiote (Iglesias-Prieto et al. 1992; Jones et al. 1998; Warner et al. 1999; Takahashi et al. 2004; Hill et al. 2011), resultando en una mayor producción de ROS y estrés oxidativo (Lesser y Farrell 2004), y que conduce a la pérdida de células del hospedero y de simbioses a través de mecanismos de expulsión celular, apoptosis y/o necrosis (Davy et al. 2012), y que termina en un organismo disfuncional y una dramática pérdida de actividad fotosintética, se podría considerar la pérdida de pigmentos del simbiote (Ci) uno de los primeros mecanismos de regulación de esta simbiosis contra los niveles crecientes de estrés lumínico que induce el estrés térmico. Si la primera respuesta homeostática del simbiote es capaz de resistir el incremento del estrés lumínico inducido por la elevada temperatura y el holobionte permanece fotosintéticamente funcional y con mínimo impacto sobre la fotosíntesis, no se puede considerar que la pérdida resultante de pigmentación en el coral expresa un estado de blanqueamiento, incluso si resulta, como se encontró en este estudio, en un coral muy pálido. Por lo tanto, en nuestro estudio se concluye que tanto la pérdida de clorofila *a* como la caída de Fv/Fm, son insuficiente para identificar blanqueamiento o incluso reconocer el fenotipo de un coral estresado. Se

necesita un descriptor más seguro para detectar la condición disfuncional del holobionte. El análisis de componentes principales (PCA) de los resultados experimentales, incluyendo organismos control y estresados, fue capaz de discriminar claramente el fenotipo estresado y el blanqueado. Muestras blanqueadas mostraron los valores más altos de  $a^*_{\text{Sym}}$  y  $a^*_{\text{Chla}}$  junto con los valores más bajos de la productividad fotosintética ( $P_{\text{max}}$ ,  $P_M$ ). Curiosamente, algunas muestras estresadas, pero también control, mostraron valores muy altos de dos descriptores ópticos:  $a^*_{\text{Sym}}$  y  $a^*_{\text{Chla}}$  con todavía actividad fotosintética significativa. Se consideraron como muestras blanqueadas aquellas que presentaron una supresión completa de la fotosíntesis, como las de *M. cavernosa* y *P. strigosa*, y que también mostraron pérdidas importantes en la densidad de simbioses. Ambas especies mostraron las densidades de simbioses más bajas en las muestras control no-estresadas. Pérdidas grandes de simbioses se observaron también en las dos *Orbicella spp* después de 20 días a 32°C, pero estas muestras mantuvieron aún una cierta cantidad de simbioses ( $>4 \times 10^5$  simbioses  $\text{cm}^{-2}$ ) y también una mínima actividad fotosintética al final de la fase extendida de estrés térmico. Esta extensión del estrés térmico, sólo aplicada en octubre de 2011, sirvió para ilustrar la naturaleza acumulativa del estrés por elevada temperatura para la simbiosis de coral, y el papel central que juega el estrés lumínico en la determinación de la severidad del impacto del estrés térmico y en la inducción del blanqueamiento, lo que ha sido recientemente utilizado para mejorar la capacidad de producto DHW (Degree Heating Weeks) de la NOAA para predecir blanqueamiento y su severidad, utilizando el efecto combinado del estrés lumínico y térmico (Skirving et al. 2018).

Las diferencias documentadas en este estudio en la sensibilidad de los fenotipos de los corales al estrés térmico pueden representar una expresión particular de un compromiso o *trade-off* general entre el desempeño de las especies y su robustez (Kitano 2010) aplicado al estudio de la simbiosis de coral. Corales con una pigmentación y densidad de simbioses baja (aquí representados por el fenotipo del verano, pero también por la especie *O. annularis*) permiten el establecimiento de una simbiosis más eficiente y

productiva, pero al mismo tiempo más frágil, bajo estrés térmico y lumínico. Estos holobiontes son menos eficientes en mantener el desempeño de coral bajo estrés térmico que la condición menos productiva, más pigmentada y de organismos que contienen más simbiontes, más poblados, como son los corales con el fenotipo del invierno, o que generalmente son más pigmentados o más poblados. Esto implica que este estudio no apoya la interpretación de que un exceso de simbiontes aumenta la susceptibilidad de los corales al blanqueamiento (Cunning y Baker 2012; Cunning y Baker 2014). En esta condición, es decir en corales con una densidad de simbiontes alta, no se espera una perturbación similar a la que induce el estrés lumínico en organismos poco pigmentados. Todo lo contrario, en estos organismos de alta densidad de simbiontes se esperaría una reducción progresiva de la energía solar dentro del tejido, condicionando una situación similar a organismos limitados por luz, por ejemplo, corales profundos o en cuevas sombreadas. En este estudio, el valor máximo para el número de simbiontes por unidad de proteína del hospedero se encontró en organismos no-estresados de *O. annularis*, mientras que los valores más bajos se encontraron en las dos especies que experimentaron una supresión completa de la fotosíntesis y por tanto que había alcanzado el fenotipo blanqueado (simbiosis disfuncional), *M. cavernosa* y *P. strigosa*, después de 20 días bajo estrés térmico severo (32°C). El impacto esperado sobre la fisiología del holobionte del exceso de simbiontes en el tejido es más probable que sea el opuesto al incremento del estrés lumínico y de los niveles de fotodaño del simbionte. El incremento en la auto-sombra de los pigmentos dentro del tejido conduce a una reducción de la tasa fotosintética, similar a la que sufren corales creciendo a mayor profundidad o en cuevas (Palardy et al. 2008). Estos organismos estarían más bien limitados por luz y solo podrían sostener periodos largos de balances de carbono negativos incrementando su alimentación heterotrófica (Grottoli et al. 2006). En este sentido, la capacidad del esqueleto de coral de aumentar el campo lumínico local del simbionte (Enríquez et al. 2005; Enríquez et al. 2017) podría jugar un papel central en la regulación de la máxima densidad de simbiontes que el tejido de una determinada

especie podría albergar. En corales muy pigmentados se podría esperar también disminuciones de la calcificación como consecuencia de la disminución de la fotosíntesis (Colombo-Pallotta et al. 2010).

En resumen, para entender el impacto del calentamiento global sobre la producción del carbonato de calcio en el arrecie de coral (Cantin et al. 2010; De'ath et al. 2009; Perry et al. 2013) se requiere poner más atención al análisis fisiológico del efecto directo del estrés térmico sobre la fotosíntesis del coral y sobre el acoplamiento fisiológico entre la fotosíntesis del coral y la calcificación. Este análisis requiere atención especial al entendimiento de la posible contribución de un “componente inherente” del holobionte, que aún debe ser elucidado, a la regulación de la susceptibilidad de los corales al estrés térmico.

### 3.5 Literatura citada

- Ainsworth TD, Heron SF, Ortiz JC, Mumby PJ, Grech A, Ogawa D, Eakin CM, Leggat W (2016) Climate change disables coral bleaching protection on the Great Barrier Reef. *Science* 352, 338-342
- Barnes DJ, Lough JM (1989) The nature of skeletal density banding in scleractinian corals: fine banding and seasonal patterns. *J Exp Mar Biol Ecol* 126, 119-134
- Berkelmans R, Willis BL (1999) Seasonal and local spatial patterns in the upper thermal limits of corals on the inshore Central Great Barrier Reef. *Coral Reefs* 18, 219-228
- Brown BE, Dunne RP, Ambarsari I, Le Tissier MDA, Satapoomin U (1999) Seasonal fluctuations in environmental factors and variations in symbiotic algae and chlorophyll pigments in four Indo-Pacific coral species. *Mar Ecol Prog Ser* 191, 53-69
- Cantin NE, Cohen AL, Karnauskas KB, Tarrant AM, McCorkle DC (2010) Ocean warming slows coral growth in the central Red Sea. *Science* 329, 322-325
- Carricart-Ganivet JP, Beltrán-Torres AU, Merino M, Ruiz-Zárata MA (2000) Skeletal extension, density and calcification rate of the reef building coral *Montastraea annularis* (Ellis and Solander) in the Mexican Caribbean. *Bulletin of Marine Science* 66, 215-224
- Chollett I, Enríquez S, Mumby PJ (2014) Redefining thermal regimes to design reserves for coral reefs in the face of climate change. *PLoS One* 9, e110634

- Colombo-Pallotta MF, Rodríguez-Román A, Iglesias-Prieto R (2010) Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: evaluating the role of oxygen and glycerol. *Coral Reefs* 29, 899-907
- Cunning R, Baker AC (2014) Not just who, but how many: the importance of partner abundance in reef coral symbioses. *Front Microbiol* 5, 400
- Cunning R, Baker AC (2012) Excess algal symbionts increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change* 3, 259-262
- Davy SK, Allemand D, Weis VM (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 229-261
- De'ath G, Lough JM, Fabricius KE (2009) Declining coral calcification on the Great Barrier Reef. *Science* 323, 116-119
- Enríquez S, Méndez ER, Iglesias-Prieto R (2005) Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol Oceanogr* 50, 1025-1032
- Enríquez S, Méndez ER, Hoegh-Guldberg O, Iglesias-Prieto R (2017) Key functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. *Proc R Soc B* 284, 20161667
- Falter JL, Lowe RJ, Atkinson MJ, Cuet P (2012) Seasonal coupling and de-coupling of net calcification rates from coral reef metabolism and carbonate chemistry at Ningaloo Reef, Western Australia. *J Geophys Res* 117, C05003
- Fitt WK, Gates RD, Hoegh-Guldberg O, Bythell JC, Jatkar A, Grottoli AG, Gomez M, Fisher P, Lajuenesse TC, Pantos O, Iglesias-Prieto R, Franklin DJ, Rodrigues LJ, Torregiani JM, van Woesik R, Lesser MP (2009) Response of two species of Indo-Pacific corals, *Porites cylindrica* and *Stylophora pistillata*, to short-term thermal stress: The host does matter in determining the tolerance of corals to bleaching. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 373, 102-110
- Grottoli AG, Rodrigues LJ, Palardy JE (2006) Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. *Nature* 440, 1186-1189
- Grottoli AG, Warner ME, Levas SJ, Aschaffenburg MD, Schoepf V, McGinley M, Baumann J, Matsui Y (2014) The cumulative impact of annual coral bleaching can turn some coral species winners into losers. *Global Change Biology* 20, 3823-3833
- Hill R, Brown CM, DeZeeuw K, Campbell DA, Ralph PJ (2011) Increased rate of D1 repair in coral symbionts during bleaching is insufficient to counter accelerated photo-inactivation. *Limnol Oceanogr* 56, 139-146
- Hoegh-Guldberg O (1999) Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Freshwater Res* 50, 839-866
- Iglesias-Prieto R, Trench RK (1997) Photoadaptation, photoacclimation and niche diversification in invertebrate-dinoflagellate symbioses. 8th International Coral Reef Symposium Proc 8th Int Coral Reef Symp, 1319-1324
- Iglesias-Prieto R, Matta JL, Robins WA, Trench RK (1992) Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc Nat Acad Sci USA* 89, 10302-10305

- Jones RJ, Hoegh Guldberg O, Larkum AWD, Schreiber U (1998) Temperature induced bleaching of corals begins with impairment of the CO<sub>2</sub> fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell & Environment* 21, 1219-1230
- Kayanne H, Hata H, Kudo S, Yamano H, Watanabe A, Ikeda Y, Nozaki K, Kato K, Negishi A, Saito H (2005) Seasonal and bleaching-induced changes in coral reef metabolism and CO<sub>2</sub> flux. *Global Biogeochemical Cycles* 19, GB3015
- Kinsey DW (1985) Metabolism, calcification and carbon production I. System level studies. *Proceedings of the 5th International Coral Reef Congress, Tahiti, 27 May-1 June 1985*, 503-542
- Kitano H (2010) Violations of robustness trade-offs. *Mol Syst Biol* 6, 384
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, Santos SR (2018) Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr Biol* 28, 2570-2580.e6
- Lesser MP, Farrell JH (2004) Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral Reefs* 23, 367-377
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68, 253-278
- Loya Y, Sakai K, Yamazato K, Nakano Y, Sambali H, van Woesik R (2001) Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecol Lett* 4, 122-131
- Marshall PA, Baird AH (2000) Bleaching of corals on the Great Barrier Reef: differential susceptibilities among taxa. *Coral reefs* 19, 155-163
- Palardy JE, Rodrigues LJ, Grottoli AG (2008) The importance of zooplankton to the daily metabolic carbon requirements of healthy and bleached corals at two depths. *J Exp Mar Biol Ecol* 367, 180-188
- Perry CT, Murphy GN, Kench PS, Smithers SG, Edinger EN, Steneck RS, Mumby PJ (2013) Caribbean-wide decline in carbonate production threatens coral reef growth. *Nat Commun* 4, 1402
- Rodríguez-Martínez RE, Ruíz-Rentería F, van Tussenbroek B, Barba-Santos G, Escalante-Mancera E, Jordán-Garza G, Jordán-Dahlgren E (2010) Environmental state and tendencies of the Puerto Morelos CARICOMP site, Mexico. *Revista de biología tropical* 58, 23-43
- Rowan R (2004) Coral bleaching: Thermal adaptation in reef coral symbionts. *Nature* 430, 742
- Schoepf V, Grottoli AG, Levas SJ, Aschaffenburg MD, Baumann JH, Matsui Y, Warner ME (2015) Annual coral bleaching and the long-term recovery capacity of coral. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282, 20151887
- Skirving W, Enríquez S, Hedley J, Dove S, Eakin C, Mason R, De La Cour J, Liu G, Hoegh-Guldberg O, Strong A, Mumby P, Iglesias-Prieto R (2018) Remote Sensing of Coral Bleaching Using Temperature and Light: Progress towards an Operational Algorithm. *Remote Sensing* 10, 18

- Takahashi S, Nakamura T, Sakamizu M, van Woesik R, Yamasaki H (2004) Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. *Plant Cell Physiol* 45, 251-255
- Thornhill DJ, Rotjan RD, Todd BD, Chilcoat GC, Iglesias-Prieto R, Kemp DW, LaJeunesse TC, Reynolds JM, Schmidt GW, Shannon T, Warner ME, Fitt WK (2011) A connection between colony biomass and death in Caribbean reef-building corals. *PLoS One* 6, e29535
- Toller WW, Rowan R, Knowlton N (2001) Repopulation of zooxanthellae in the Caribbean corals *Montastraea annularis* and *M. faveolata* following experimental and disease-associated bleaching. *The Biological Bulletin* 201, 360-373
- Vásquez-Elizondo RM, Enríquez S (2016) Coralline algal physiology is more adversely affected by elevated temperature than reduced pH. *Sci Rep* 6, 19030
- Wangpraseurt D, Larkum AW, Ralph PJ, Kühl M (2012) Light gradients and optical microniches in coral tissues. *Front Microbiol* 3, 316
- Wangpraseurt D, Polerecky L, Larkum AWD, Ralph PJ, Nielsen DA, Pernice M, Kühl M (2014) The in situ light microenvironment of corals. *Limnol Oceanogr* 59, 917-926
- Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW (1999) Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proc Nat Acad Sci USA* 96, 8007-8012
- Warner ME, Chilcoat GC, McFarland FK, Fitt WK (2002) Seasonal fluctuations in the photosynthetic capacity of photosystem II in symbiotic dinoflagellates in the Caribbean reef-building coral *Montastraea*. *Marine Biology* 141, 31-38
- Warner ME, Fitt WK, Schmidt GW (1996) The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae in hospite from four different species of reef coral: a novel approach. *Plant, Cell & Environment* 19, 291-299

## Capítulo 4 - Análisis alométrico

---

### 4.1 Introducción

La descripción de los cambios en las características estructurales, ópticas y fisiológicas de tres fenotipos estacionales de los corales simbióticos, inducidos probablemente por cambios estacionales en la temperatura y en la irradiancia a lo largo del año, ha sido el tema del capítulo dos. En este capítulo se compararon los fenotipos de los organismos al final de dos estaciones, invierno y verano, y al principio de verano. En el capítulo tres, las cuatro especies de coral analizadas fueron empujadas experimentalmente a su límite de tolerancia al estrés térmico, lo que permitió describir diferencias entre especies y fenotipos en su sensibilidad al estrés por elevada temperatura. La base de datos generada permite analizar y visualizar los cambios desde la variabilidad estacional natural en la laguna arrecifal de Puerto Morelos, hasta la variabilidad generada por el estrés térmico y la que se observa en el momento disfuncional de la ruptura de la simbiosis y la aparición de blanqueamiento. Sólo en este momento se puede reconocer la pérdida completa de la funcionalidad del holobionte, y, por tanto, la condición del coral blanqueado. Contar con una base de datos tan grande y completa por el número de parámetros analizados en simultáneo, permite desarrollar modelos cuantitativos para entender un poco mejor las implicaciones funcionales (fisiológicas y ópticas) de los cambios estructurales en la pigmentación de coral, pero también la asociación entre los parámetros fisiológicos y ópticos.

La propiedad funcional clave del coral simbiótico es la fotosíntesis del simbionte *in hospite*, ya que ambos socios dependen de la energía química producida por los simbiontes, que a su vez depende de la energía lumínica absorbida *in hospite* por su aparato fotosintético. Por lo tanto, es esperable que los rasgos estructurales y ópticos de ambos socios se ajusten para optimizar la capacidad de recolectar la luz incidente de la estructura completa. El esqueleto del coral ha evolucionado como un extraordinario

amplificador del campo lumínico para los simbioses, contrarrestando la autosombra y el efecto paquete dentro del tejido (Enríquez et al. 2017) por su capacidad de inducir esparcimiento múltiple de la luz (Enríquez et al. 2005; Terán et al. 2010; Marcelino et al. 2013; Enríquez et al. 2017). El esparcimiento múltiple permite que la luz puede ser dispersada por el esqueleto y amplificada localmente (Marcelino et al. 2013). Este efecto es más fuerte en corales ramificados, aumentando el campo lumínico de secciones enteras del coral, y más débil en corales de tipo phaceloide, en donde cada pólipo crea su propio campo lumínico (Enríquez et al. 2017). Adicionalmente, el propio tejido de coral influye en el campo lumínico local de los simbioses (Wangpraseurt et al. 2014a).

El simbiote posee el aparato fotosintético que permite coleccionar la luz y convertir la energía en poder reductor y energía química en la forma de ATP. En el cloroplasto también están las enzimas que transforman estos primeros productos de la fotosíntesis en fotosintatos. Sin embargo, las propiedades de los simbioses y cambios en su densidad y en su pigmentación, pueden modificar enormemente el campo lumínico en el interior del tejido. Si se compara esta estructura con un dosel de una comunidad vegetal terrestre donde los simbioses serían las hojas, su distribución en el tejido formaría el dosel y su pigmentación individual ( $C_i$ ) determinaría su capacidad de absorción y de transmisión de luz dentro del dosel, una reducción del número de simbioses (equivalente de las hojas) abriría el dosel lo que permitiría aumentar la cantidad de luz que entra en el tejido y que es esparcida por el esqueleto. Por otro lado, también una reducción del  $C_i$  de los simbioses permitiría reducir la absorción y aumentar la transmisión de luz dentro del tejido, similar a un dosel. En cualquier caso, los dos cambios van a mejorar el campo lumínico local de los simbioses. Cambios en las propiedades ópticas de los simbioses por la sustitución del feno tipo dominante por otro diferente en tamaño y en pigmentación, pueden conducir también a cambios significativos en las propiedades ópticas de los corales.

Para dilucidar qué elementos son los que tienen el mayor poder explicativo de la variabilidad de las propiedades ópticas de los corales, se ofrece en este capítulo un análisis multivariable cuyo objetivo es aportar un poco de luz sobre las siguientes preguntas: (1) ¿Afectan de forma similar los dos factores determinantes del cambio de la pigmentación de los corales, densidad de simbiontes y  $C_i$ , a la variación de sus propiedades ópticas? y (2) ¿tienen estos cambios un efecto significativo sobre la productividad (la fotosíntesis y la calcificación) del coral? Para resolver la primera pregunta se examinará tanto el efecto de los cambios en la pigmentación sobre la absorptancia ( $A$  = capacidad de absorción de luz) como sobre el coeficiente específico de absorción ( $a^*$  = eficiencia de absorción de luz). Los análisis se llevaron a cabo por medio de análisis de regresión múltiple y análisis de componentes principales (PCA).

## 4.2 Materiales y Métodos

### 4.2.1 Análisis de datos

Los datos presentados en este capítulo incluyen los experimentos que se llevaron a cabo en marzo y octubre de 2011 y julio de 2012. Contrario a los capítulos anteriores en donde se presentaron los datos agrupados de acuerdo a los tratamientos aplicados, aquí se agruparon los datos según el nivel de estrés fisiológico inducido experimentalmente a los organismos (Tabla 4.1). Los resultados anteriores nos permitieron categorizar a los organismos de acuerdo al nivel de estrés inducido en el experimento. Para caracterizar este nivel de estrés se utilizaron los relativos de los valores de la variación de  $F_v/F_m$  y  $P_{max}$  registrada en relación a la de los organismos control. Así, corales que no mostraron una disminución de  $F_v/F_m$  en comparación al control fueron clasificados como corales no-estresados (Tabla 4.1); los corales que mostraron una significativa disminución del  $F_v/F_m$  y  $P_{max}$  pero que mantuvieron una tasa fotosintética diferente a cero se consideraron corales estresados; y los corales blanqueados fueron aquellos organismos que

han mostrado una  $P_{\max}$  no diferente a cero (Tabla 4.1), es decir que han suprimido completamente su actividad fotosintética.

**Tabla 4.1 Niveles de estrés y sus criterios. Basados en su estados de  $F_v/F_m$  y  $P_{\max}$ , las muestras experimentales fueron agrupado en no-estresados, estresados y blanqueados.**

Nivel de estrés	$F_v/F_m$	$P_{\max}$	Mes	Tratamiento
No-Estresados	= control	> 0	Marzo	28°C
	= control	> 0	Octubre	28°C + 30°C
	= control	> 0	Julio	28°C + 30°C
Estresados	< control	> 0	Marzo	30°C + 32°C
	< control	> 0	Octubre	32°C
	< control	> 0	Julio	32°C
Blanqueados	< control	$\approx 0$	Marzo	32°C
	< control	$\approx 0$	Octubre	32°C
	< control	$\approx 0$	Julio	32°C

Para calcular el efecto de la pigmentación, la densidad de simbiontes y el  $C_i$ , sobre la variación de  $a^*_{Chl a}$ ,  $a^*_{Sym}$ ,  $a^*_M$ ,  $P_{\max}$ ,  $P_{Sym}$  y  $P_M$ , se utilizaron regresiones múltiples y análisis de componentes principales (PCA).

## 4.3 Resultados

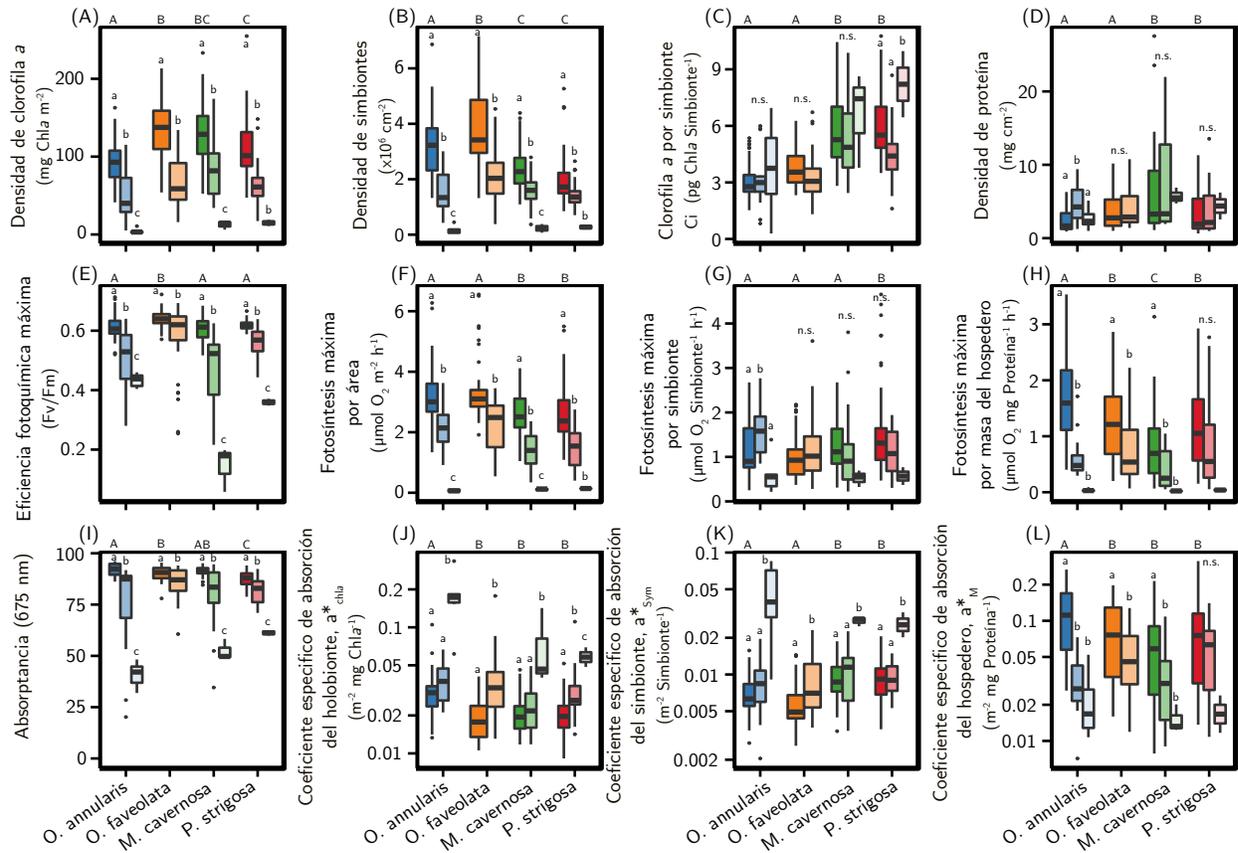
### 4.3.1 Variabilidad estructural y funcional de los corales no-estresados

Para las muestras control no estresadas, se encontraron diferencias significativas para la densidad de clorofila  $a$  entre las especies más pigmentadas (*O. annularis* y *M. cavernosa*) y las menos pigmentadas (*O. annularis*; one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ; Figura 4.1A). El coeficiente de variación (CV) de la densidad de clorofila  $a$  fue ligeramente más

alto en *P. strigosa* (CV = 43%) que en *O. annularis* (CV = 29%), *O. annularis* (CV = 28%) y *M. cavernosa* (CV = 28%). La densidad de simbiontes (Figura 4.1B) y el contenido de clorofila *a* por simbionte (Ci, Figura 4.1C) también presentaron diferencias significativas entre especies. Fueron mayores en las dos *Orbicellas spp*, mientras que *M. cavernosa* y *P. strigosa* mostraron una densidad de simbiontes significativamente más baja en esta base de datos y un Ci más alto (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). La especie con el contenido de proteínas solubles del tejido del hospedero más alto fue *M. cavernosa* ( $6 \pm 0.7$ mg proteína  $\text{cm}^{-2}$ ), mientras que *O. annularis* mostró los valores más bajos ( $2.4 \pm 0.2$ mg proteína  $\text{cm}^{-2}$ , Figura 4.1D). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteínas solubles del hospedero de las muestras no estresadas de *O. annularis*, *O. faveolata* y *P. strigosa* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p > 0.05$ ).

Por otro lado, la tasa máxima de fotosíntesis por área ( $P_{\text{max}}$ ) fue significativamente más alta en las dos *Orbicellas spp* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ; Figura 4.1F), pero la contribución de cada simbionte a la productividad fotosintética del holobionte ( $P_{\text{sym}}$ ) fue la más baja (Figura 4.1G). Para la tasa máxima de fotosíntesis por simbionte ( $P_{\text{sym}}$ ) se observó un patrón de variación similar al Ci: los valores de  $P_{\text{sym}}$  más altos se encontraron en las muestras no-estresadas de *P. strigosa* y *M. cavernosa*. Estas diferencias entre especies fueron, sin embargo, sólo significativas para *P. strigosa* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ; Figura 4.1G). La mayor tasa fotosintética normalizada al contenido de proteínas solubles del hospedero ( $P_M$ ) se encontró en *O. annularis* y la más baja en *M. cavernosa* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ; Figura 4.1H).

Con respecto a los descriptores ópticos, muestras no-estresadas de *O. annularis*, *O. faveolata* y *M. cavernosa* mostraron una capacidad de absorción de luz similar ( $A_{\text{max}} > 90\%$ ), mientras que la  $A_{\text{max}}$  más baja se determinó para *P. strigosa* ( $A_{\text{max}} = 88\%$ ; one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ; Figura 4.1I). Todas la muestras no-estresadas



**Figura 4.1 La variación entre los fenotipos no-estresados, estresados y blanqueados**

Diagrama de Box describiendo la variación de los descriptores estructurales (A-D), fotosintéticos (E-H) y ópticos (I-L) de los corales *Orbicella annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *Montastraea cavernosa* (verde) y *Pseudodiploria strigosa* (rojo). Diferencias en la tonalidad describen los fenotipos no-estresados (oscuro), estresados (claro) y blanqueados (más claro). Las cajas abarcan la variación entre el 25 y 75% de los cuartiles. La línea representa la mediana y las barras se extienden entre el 95 y 5% de los límites de confianza. Letras mayúsculas indican diferencias significativas entre especies, mientras que las letras minúsculas marcan las diferencias entre los fenotipos. La ausencia de letras minúsculas indica que no hay cambios significativos.

mostraron valores bajos para el coeficiente específico de absorción de la clorofila *a* ( $a^*_{Chla}$ ; Figura 4.1J). Se estimó el valor más alto de  $a^*_{Chla}$  en *O. annularis* (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ). Esta especie también mostró el valor más alto el coeficiente específico de absorción por unidad de masa ( $a^*_M$ ; one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ; Figura 4.1L). En contraste, los valores más altos de la absorción específica por simbiote ( $a^*_{Sym}$ ) se estimaron para *M. cavernosa* y *P. strigosa* (one-way

ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.05$ ; Figura 4.1K).

#### 4.3.2 Análisis de los componentes principales (PCA) de los holobiontes no estresados

Las muestras no-estresadas de las cuatro especies de coral investigadas fueron claramente discriminadas por el análisis de PCA (Tabla 4.2;

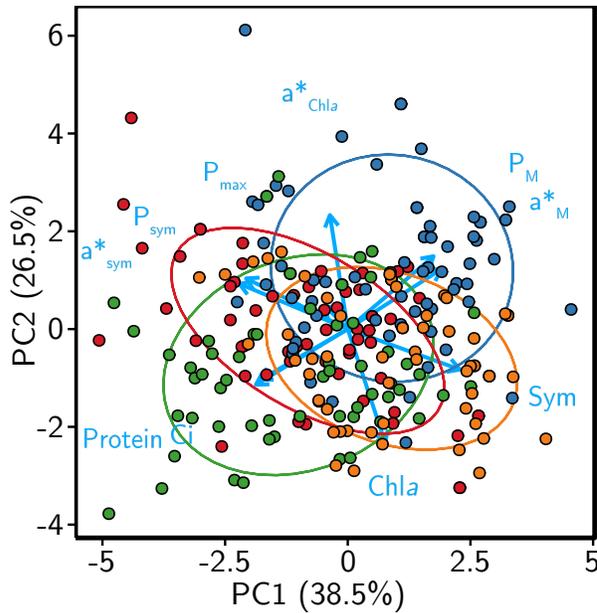
Figura 4.2). El componente principal 1 (PC1) lo determinaban cuatro rasgos funcionales ( $P_M$ ,  $P_{sym}$ ,  $a^*_M$ ,  $a^*_{sym}$ ) y tres estructurales (densidad de simbiontes,  $C_i$ , contenido de proteínas), y fue capaz de explicar 39% de la variabilidad total (Tabla 4.2). Este componente fue capaz de distinguir entre las especies capaces de albergar densidades más altas de simbiontes, ambas *Orbicellas spp*, y las especies con un contenido alto de proteína soluble en el tejido del hospedero y con mayores  $C_i$ , *P. strigosa* y *M. cavernosa*. El segundo componente (PC2) incrementó la variabilidad explicada al 66%, gracias a la contribución de los cambios de la pigmentación del holobionte (densidad de *Chla*) con una pequeña contribución de los descriptores normalizados a los simbiontes y la masa (Tabla 4.2). Este componente diferenció entre las especies más pigmentadas (*O. faveolata* y *M. cavernosa*) y menos pigmentadas (*O. annularis* y *P. strigosa*). No se encontró ninguna correlación entre este componente y la productividad fotosintética. Por último, el tercer componente (PC3) incrementó la variabilidad explicada a 80%, gracias a la contribución de  $P_{max}$ ,  $C_i$  y dos descriptores ópticos,  $a^*_M$  y  $a^*_{sym}$  (Tabla 4.2).

**Tabla 4.2 Resultados del PCA de los corales no-estresados**

Resultados del PCA de los descriptores estructurales, ópticos y fotosintéticos de los corales no-estresados de *O. annularis*, *O. faveolata*, *M. cavernosa* y *P. strigosa*.

	PC1	PC2	PC3
Clorofila <i>a</i> (mg Chl <i>a</i> m <sup>-2</sup> )	0.14	<b>-0.52</b>	0.05
Simbiontes (x10 <sup>6</sup> #simbiontes cm <sup>-2</sup> )	<b>0.43</b>	-0.19	-0.25
Ci (pg Chl <i>a</i> simbiote <sup>-1</sup> )	<b>-0.33</b>	-0.23	<b>0.40</b>
Proteína sol. del hospedero (mg cm <sup>-2</sup> )	<b>-0.35</b>	-0.26	-0.14
a* <sub>Chl<i>a</i></sub> (m <sup>2</sup> mg <sup>-1</sup> Chl <i>a</i> )	-0.07	<b>0.52</b>	-0.03
a* <sub>Sym</sub> (m <sup>2</sup> simbiote <sup>-1</sup> )	<b>-0.41</b>	0.21	0.29
a* <sub>M</sub> (m <sup>2</sup> proteína <sup>-1</sup> )	<b>0.36</b>	0.28	<b>0.34</b>
P <sub>max</sub> (μmol O <sub>2</sub> cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	-0.09	0.11	<b>-0.70</b>
P <sub>sym</sub> (μmol O <sub>2</sub> simbiote <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<b>-0.39</b>	0.23	-0.23
P <sub>M</sub> (μmol O <sub>2</sub> proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<b>0.33</b>	<b>0.34</b>	0.10
Desviación estándar	1.96	1.63	1.21
Proporción de variación	0.39	0.27	0.15
Proporción acumulativa	0.39	0.65	0.80

Valores en negrita señalan las correlaciones fuertes (loading > 0.3) entre las variables originales y los componentes principales (PC). La tabla muestra los valores de correlación de cada rasgo para los primeros tres componentes. Además, la tabla muestra la variación acumulada de cada componente.



**Figura 4.2 Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras no-estresadas**

Análisis de componentes principales (PCA) de los organismos de *Orbicella annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *Montastraea cavernosa* (verde) y *Pseudodiploria strigosa* (rojo), considerando los descriptores estructurales (clorofila a, simbiotes, Ci, proteína), ópticos ( $a^*_{Chla}$ ,  $a^*_{Sym}$ ,  $a^*_M$ ) y fotosintéticos ( $P_{max}$ ,  $P_{sym}$ ,  $P_M$ ). Flechas azules indican la correlación de los parámetros con PC1 y PC2.

#### 4.3.3 Variabilidad estructural y funcional de los corales estresados

La exposición a estrés térmico indujo en las dos *Orbicellas* y en *M. cavernosa* pérdidas significativas en el contenido de clorofila a (>90%) y en la densidad de simbiotes (>89%, one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.001$ ; Figura 4.1A,B). Los cambios documentados en *P. strigosa* fueron más pequeños, pero también significativos (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.001$ ; Figura 4.1A,B). No se observaron cambios significativos en el Ci de los simbiotes de *O. annularis*, *O. faveolata* y *M. cavernosa* expuestos al estrés térmico. Sin embargo, en *P. strigosa* se encontró una reducción del Ci de sus simbiotes en los muestras expuestas al estrés térmico, pero no en los corales blanqueados, los cuales mostraron los valores más altos en el Ci (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.001$ ; Figura 4.1D). El contenido de proteína soluble del hospedero tampoco presentó cambios significativos en las muestras estresadas de *O. faveolata*, *M. cavernosa* y *P. strigosa*, mientras que sí lo hizo en el tejido de *O. annularis* que incrementó significativamente (Figura 4.1D).

Por otro lado, la eficiencia fotoquímica máxima del PSII  $Fv/Fm$  y la fotosíntesis del holobionte ( $P_{max}$  y  $P_M$ ) disminuyeron de forma importante en todas las muestras que sufrieron estrés térmico (Figura 4.1E). Las reducciones de  $Fv/Fm$  fueron mayores en *M. cavernosa* (77%), intermedias para *P. strigosa* y *O. annularis* (30-40%) y pequeñas en *O. faveolata* (Figura 4.1E). Sólo tres especies, *O. annularis*, *M. cavernosa* y *P. strigosa* mostraron valores de  $P_{max}$  y  $P_M$  no significativamente diferentes a 0 (Figura 4.1F,H). Según el criterio definido anteriormente, se consideró que estas muestras sí habían llegado a adquirir el fenotipo blanqueado, porque eran organismos completamente disfuncionales para mantener la actividad fotosintética de la simbiosis. La única especie que no desarrolló el fenotipo blanqueado fue *O. faveolata*, aunque algunas muestras estresadas experimentalmente mostraron un  $Fv/Fm$  muy reducido (Figura 4.1F). Sin embargo, estas muestras todavía tenían una cierta actividad fotosintética, por lo que no se consideraron “blanqueadas” pues mantenían todavía una parte de su parte de su simbiosis funcional. Las tasa de fotosíntesis por simbionte ( $P_{sym}$ ) también se había reducido significativamente en los fenotipos blanqueados (Figura 4.1G).

#### 4.3.4 Asociación de variación entre los cambios en pigmentación del coral y sus propiedades ópticas

Junto a la disminución del contenido de clorofila *a* y de la densidad de simbiontes en los organismos estresados, se observó también una reducción significativa en la absorptancia (Figura 4.1I) a la vez que incrementos importantes de los coeficientes específicos de absorción ( $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{Sym}$ , Figura 4.1A,B). Las mayores disminuciones de la absorptancia se estimaron para *O. annularis* (55%), mientras que *M. cavernosa* y *P. strigosa* experimentaron pérdidas del 43% y 30%, respectivamente, de la capacidad de absorción de luz de los organismos (one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.001$ ). *O. faveolata* fue la especie que mostró las menores disminuciones en la absorptancia (7%; one-way ANOVA, Tukey HSD,  $p < 0.001$ ). Sólo algunas muestras estresadas de *O. faveolata* experimentaron disminuciones importantes ( $\approx 50\%$ ), pero estas muestras mantuvieron una actividad fotosintética significativa ( $P_{max} = 0.7 \pm 0.15$ ) por lo que no se consideraron fenotipos

blanqueados. Adicionalmente a los cambios en la absorptancia, los cambios más prominentes en los coeficientes específicos de absorción se observaron en *O. annularis*, seguido por *P. strigosa* y *M. cavernosa*, mientras que *O. faveolata* mostró la variabilidad menor en  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{Sym}$  (Figura 4.1J,K). Los organismos blanqueados mostraron los valores más altos de  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{Sym}$ , y los valores más bajos de  $a^*_M$  (Figura 4.1L).

#### 4.3.5 Análisis de los componentes principales (PCA) de los corales estresados

Los tres fenotipos analizados, corales no-estresados, estresados y blanqueados, fueron claramente discriminados por un PCA que sólo incluyó los descriptores funcionales de los corales (Tabla 4.3; Figura 4.3). El primer componente (PC1) fue capaz de explicar 39% de la variabilidad gracias a  $P_M$ ,  $a^*_M$  y  $P_{max}$ , parámetros asociados negativamente con  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{Sym}$ . El segundo componente, que incrementó la variabilidad explicada al 66% fue determinado por  $P_{sym}$  y  $P_{max}$  (Tabla 4.3). Estos resultados indican que la reducción dramática de la fotosíntesis del coral que resulta al exponerlos a estrés térmico se expresa sobre todo en la fotosíntesis por unidad de área del holobionte ( $P_{max}$ ), y en la fotosíntesis por unidad de biomasa del hospedero ( $P_M$ ), pero menos en la contribución de cada simbionte ( $P_{sym}$ ) a la producción del holobionte que puede mantenerse intacta si la simbiosis todavía es funcional. Estos cambios en la actividad fotosintética del coral están asociados a importantes incrementos de la eficiencia de absorción de luz del holobionte ( $a^*_{Chla}$ ) y de los simbiontes ( $a^*_{Sym}$ ), pero a disminuciones en la eficiencia de la retribución al hospedero de la colecta de luz ( $a^*_M$ ) que sí está, sin embargo, positivamente asociada con la fotosíntesis del holobionte (Tabla 4.3; Figura 4.3).

**Tabla 4.3 Resultados del PCA de los corales no-estresados, estresados y blanqueados**

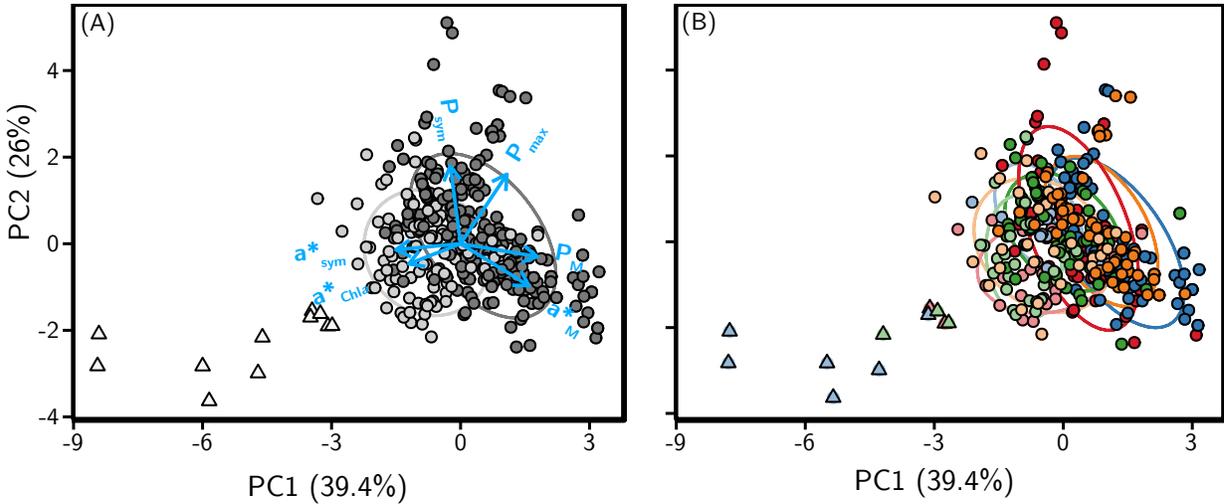
Resultados del análisis de PCA de los descriptores ópticos y funcionales de los organismos no-estresados, estresados térmicamente y blanqueados de *Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa* y *Pseudodiploria strigosa*.

	PC1	PC2	PC3
--	-----	-----	-----

$a^*_{Chla}$ ( $m^2 \text{ mg}^{-1} \text{ Chla}$ )	<b>-0.37</b>	-0.18	<b>0.56</b>
$a^*_{Sym}$ ( $m^2 \text{ simbiote}^{-1}$ )	<b>-0.46</b>	-0.05	<b>0.49</b>
$a^*_M$ ( $m^2 \text{ proteína}^{-1}$ )	<b>0.49</b>	<b>-0.36</b>	<b>0.37</b>
$P_{max}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$ )	<b>0.33</b>	<b>0.60</b>	0.13
$P_{sym}$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ simbiote}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	-0.07	<b>0.68</b>	<b>0.34</b>
$P_M$ ( $\mu\text{mol O}_2 \text{ proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	<b>0.55</b>	-0.11	<b>0.42</b>
Desviación estandard	1.54	1.25	1.14
Proporción de variación	0.39	0.26	0.22
Proporción acumulativa	0.39	0.66	0.87

---

Valores en negrita señalan las correlaciones fuertes (loading > 0.3) entre las variables originales y los componentes principales (PC). La tabla muestra los valores de correlación de cada rasgo para los primeros tres componentes. Además, la tabla muestra la variación acumulada de cada componente.



**Figura 4.3** Análisis de componentes principales (PCA) de las muestras no-estresadas, estresadas y blanqueadas

Análisis de componentes principales (PCA) de la variabilidad de los descriptores ópticos ( $a^*_{Chla}$ ,  $a^*_{Sym}$ ,  $a^*_M$ ) y foto-fisiológicos ( $P_{max}$ ,  $P_{sym}$ ,  $P_M$ ) para (A) los fenotipos de corales no-estresados (círculos gris oscuro), estresados térmicamente (círculos gris claro) y blanqueados (triángulos gris claro). Las flechas azules indican la correlación de los parámetros con los dos componentes principales PC1 y PC2. La gráfica (B) muestra la misma agrupación identificando cada una de las especies de coral con colores diferentes: *Orbicella annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *Montastraea cavernosa* (verde) y *Pseudodiploria strigosa* (rojo). Tonalidades diferentes marcan fenotipos diferentes; no-estresados (oscuro) a estresados (círculo claro), y los corales blanqueados son los triángulos.

#### 4.3.6 Variabilidad de las propiedades ópticas del holobionte

*Variabilidad de la absorptancia:*

La asociación entre la clorofila  $a$  y la densidad de simbiontes con la variación de la absorptancia se describió por medio de las siguientes ecuaciones:

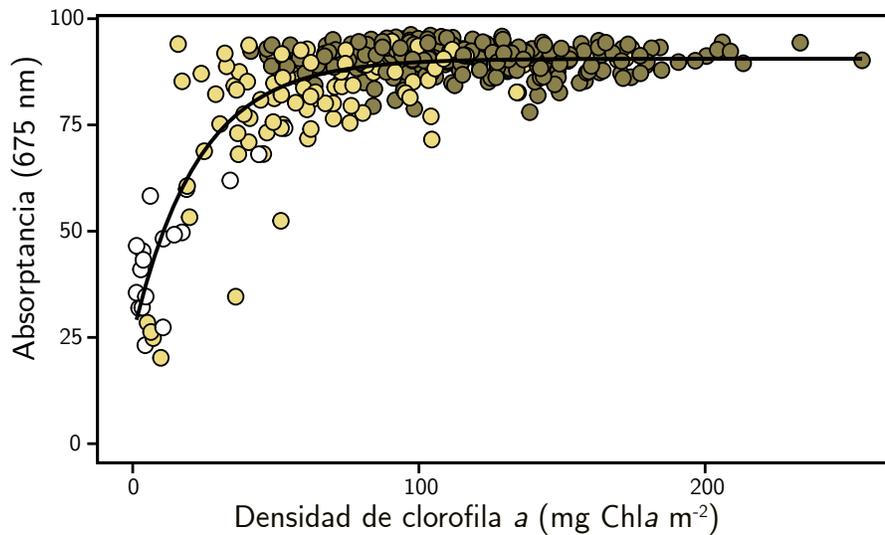
$$A = A_{max} * (1 - e^{-b*Chla}) \quad (4.1)$$

$$A = A_{max} * (1 - e^{-c*Simbiontes}) \quad (4.2)$$

en donde  $A_{max}$  es el valor máximo determinado para la absorptancia a alta pigmentación o densidad de simbiontes, y  $b$  y  $c$  son los parámetros que determinan la tasa de aumento

exponencial de la absorptancia al incrementarse la pigmentación del coral o su contenido en simbioses.

Los corales que habían desarrollado el fenotipo blanqueado fueron los que mostraron los valores menores en su pigmentación y en la absorptancia, pero este análisis también permitió detectar organismos estresados térmicamente con valores muy bajos en su absorptancia y en su pigmentación pero que no habían desarrollado todavía el fenotipo blanqueado (Figura 4.4).



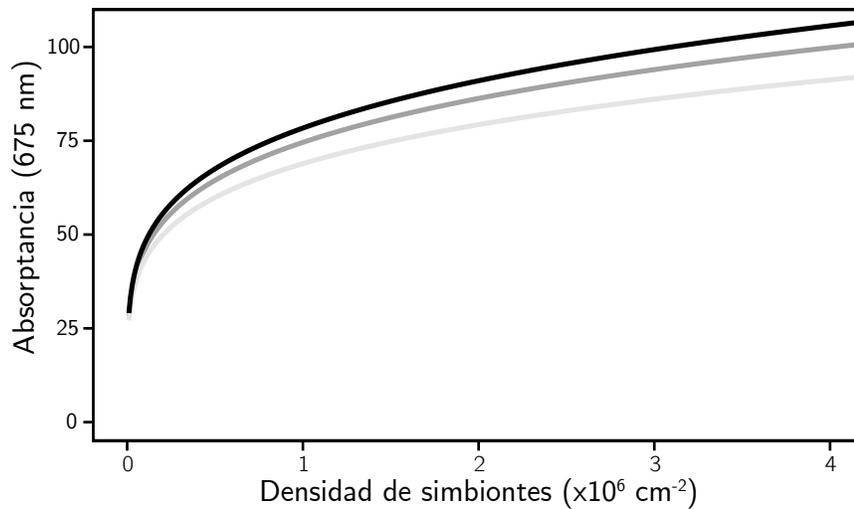
**Figura 4.4 Descripción de la asociación entre absorptancia y cambios en la densidad de clorofila a**

Se muestran los corales no estresados (círculos oscuros), estresados (círculos claros) y blanqueados (círculos blancos).

Este modelo permitió estimar también para cada especie de coral la cantidad de clorofila *a* y/o la densidad de simbioses necesaria para alcanzar el máximo valor de la absorptancia,  $A_{\max}$ . *O. faveolata* necesitó la menor pigmentación (27 mg Chla m<sup>-2</sup>), seguido por *O. annularis* (41 mg Chla m<sup>-2</sup>), *P. strigosa* (41 mg Chla m<sup>-2</sup>) y *M. cavernosa* fue la especie que necesitó la mayor pigmentación para alcanzar la máxima capacidad (80 mg Chla m<sup>-2</sup>). De forma similar, se pudo estimar con este modelo la densidad de

simbiontes mínima requerida para maximizar la absorptancia. Los resultados indicaron que *O. faveolata* ( $0.76 \times 10^6$  simbiontes  $\text{cm}^{-2}$ ) y *P. strigosa* ( $0.92 \times 10^6$  simbiontes  $\text{cm}^{-2}$ ) son las especies que requieren el menor número de simbiontes para maximizar la absorptancia; y que este número incrementa significativamente en *O. annularis* ( $1.37 \times 10^6$  simbiontes  $\text{cm}^{-2}$ ) y *M. cavernosa* ( $1.58 \times 10^6$  simbiontes  $\text{cm}^{-2}$ ).

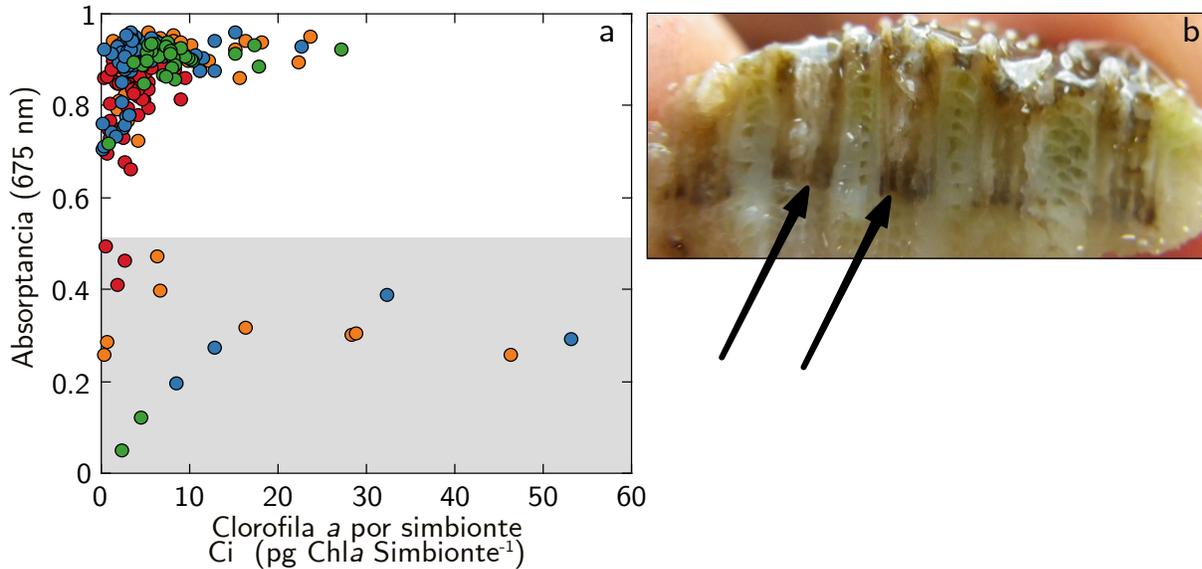
La correlación del Ci con la variación de la absorptancia fue mucho menor, aunque también se observó una asociación significativa y positiva (Tabla 4.4). Es interesante resaltar que aunque la absorptancia está más fuertemente determinada por los cambios en la densidad de células del tejido, cambios en el Ci podrían resultar en un 12% de incremento de la absorptancia, lo que se ilustra en el siguiente modelo en donde se muestra los cambios en la absorptancia con la densidad de pigmentos asumiendo tres valores constantes del Ci que comprenden la media y el 95 y 5% de los límites de confianza de la variación (Figura 4.5).



**Figura 4.5 Trayectorias diferentes de la absorptancia**

Trayectorias diferentes de la absorptancia dependiendo de la densidad de simbiontes para valores de Ci constante: Ci medio (línea gris), Ci alto (Ci medio + una desviación estándar, línea negra) y Ci bajo (Ci medio - una desviación estándar, línea gris clara).

Es interesante resaltar que los valores más altos del Ci se determinaron para organismos de las dos *Orbicellas spp* con valores de absorptancia muy bajos (<40%), que habían sido estresados experimentalmente pero que todavía mantenían la funcionalidad de la simbiosis (Figura 4.6a). Se observó en estos organismos la presencia de una mayor pigmentación en la base del cáliz de cada pólipo (Figura 4.6b).



**Figura 4.6 Variación de la absorptancia en función de los cambios en el contenido celular de pigmentos de los simbiotes (Ci)**

a) Variación de la absorptancia en función de los cambios en el contenido celular de pigmentos de los simbiotes (Ci). *Orbicella annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *Montastraea cavernosa* (morado) y *Pseudodiploria strigosa* (amarillo). Círculos blancos indican el valor del Ci y de la absorptancia de corales blanqueados. b) Imagen de un corte transversal de una *O. faveolata* en donde se muestra la variación de la pigmentación del tejido vivo y una concentración significativa de pigmentos de los simbiotes en la base del pólipo, señalada por las flechas.

*Variabilidad de los coeficientes específicos de absorción de luz:*

Los descriptores ópticos ( $a^*_{Chla}$ ,  $a^*_{Sym}$ ,  $a^*_M$ ) mostraron: (i) una asociación positiva entre  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{Sym}$ , (ii) una asociación negativa entre  $a^*_{Sym}$  y  $a^*_M$ , y (iii) ninguna correlación entre  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_M$  (Tabla 4.4). Los descriptores ópticos y estructurales presentaron también correlaciones (Tabla 4.4). Por ejemplo, la absorptancia y los coeficientes

específicos de absorción estaban asociados positivamente a la densidad de clorofila  $a$  y a la densidad de simbioses y el Ci (Tabla 4.4). Se detectó también una colinealidad negativa entre la densidad de simbioses y el Ci (Pearson  $r = -0.29$ ,  $p < 0.001$ ; Tabla 4.4). Este patrón general, sin embargo, presentó algunas desviaciones cuando se analizó la variación dentro de cada especie. Sólo en *O. annularis*, *O. faveolata* y *M. cavernosa* la variabilidad de la densidad de simbioses y el Ci se encontró significativamente asociada.

Para describir la asociación no-lineal entre los coeficientes específicos de absorción de luz y los descriptores estructurales del coral se usó una función de poder (Figura 4.7) que permite determinar el factor de escala  $b$  de la asociación alométrica  $y = a * X^b$  entre los descriptores ópticos y estructurales del coral. El análisis de regresión por mínimos cuadrados de los datos transformados log/log permiten transformar esta no-linearidad en una función lineal según la ecuación:

$$\log(y) = \log(a) + b * \log(x) \quad (4.3)$$

En la ecuación lineal,  $\log(a)$  describe el intercepto y  $b$  la pendiente lineal de los datos transformados log/log.

Dos modelos generales describen una fracción muy importante de toda la variación de  $a^*_{Chla}$  analizada, como una función de los cambios de la clorofila  $a$  o de la densidad de simbioses. El primer modelo explica 75% de la variación en  $a^*_{Chla}$  de acuerdo a la siguiente ecuación:

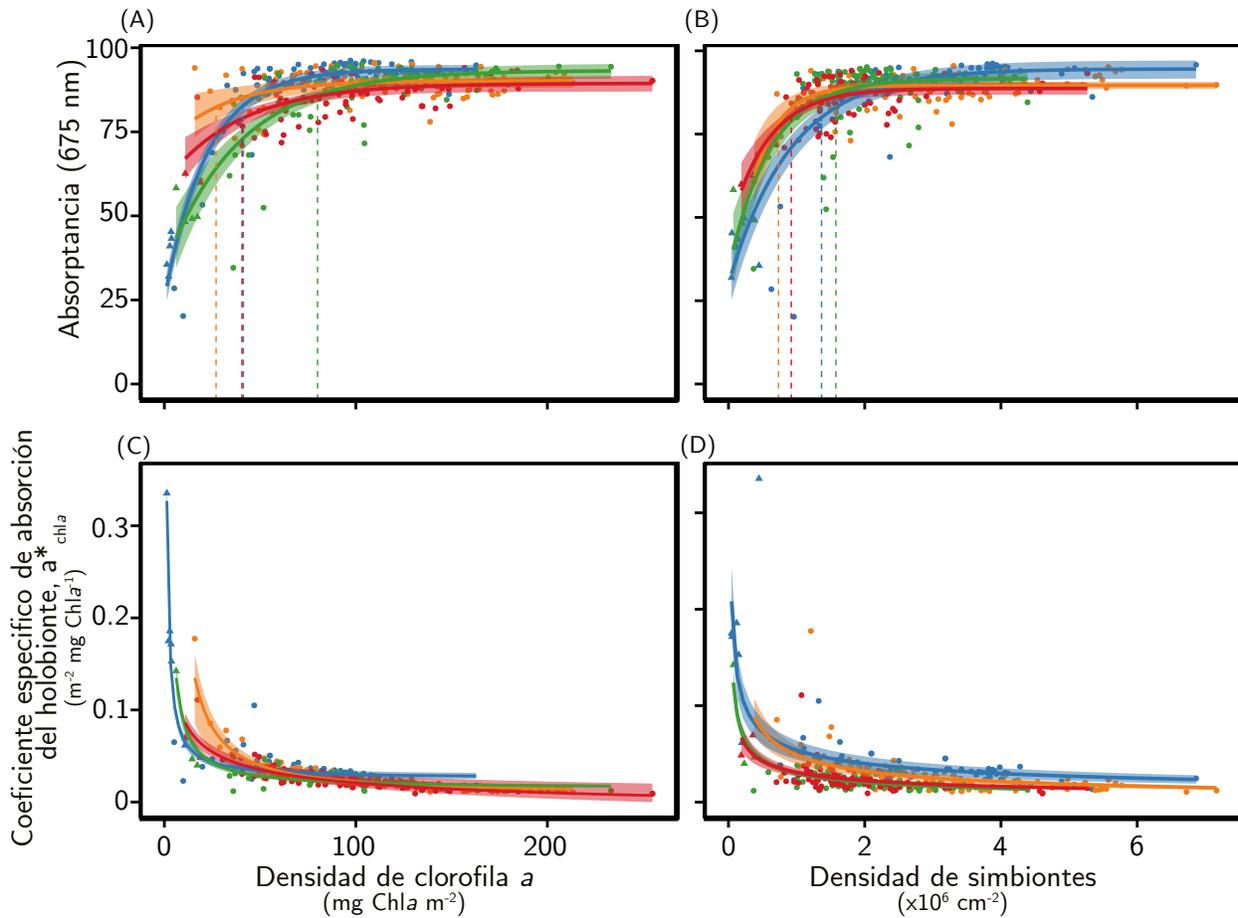
$$\log(a^*_{Chla}) = -0.39_{\pm 0.04} - 0.63_{\pm 0.02} * \log(Chla) \quad (4.4)$$

$$(R^2 = 0.75, n = 360, F = -1063.1, p < 0.001)$$

El segundo modelo fue capaz de describir 35% de la variación de  $a^*_{Chla}$  basado únicamente en los cambios de la densidad de simbioses:

$$\log(a_{\text{Chla}}^*) = -1.47_{\pm 0.04} + 0.45_{\pm 0.03} * \log(\text{Simbiontes}) \quad (4.5)$$

$(R^2 = 0.35, n = 360, F = 195.03, p < 0.001)$



**Figura 4.7 Descripción de la variación de la absorptancia y coeficiente específico de absorción de luz ( $a^*_{\text{Chla}}$ )**

Se muestra la variación de la absorptancia y coeficiente específico de absorción de luz ( $a^*_{\text{Chla}}$ ) en función de los cambios de la densidad de clorofila a (A,C) y densidad de simbioses (B,D), para *O. annularis* (azul), *O. faveolata* (naranja), *M. cavernosa* (verde) y *P. strigosa* (rojo). Líneas continuas marcan el ajuste del modelo estadístico para cada especie y las áreas sombreadas representan los intervalos de confianza del 95 y 5%. Las líneas verticales discontinuas de A y B señalan los valores que alcanzan el valor máximo de la capacidad de absorción de luz,  $A_{\text{max}}$ , para cada especie.

**Tabla 4.4 Correlación de Pearson entre los descriptores ópticos, estructurales y foto-fisiológicos.**

	Óptico				Estructural			Foto-fisiológico	
	log A	log a* <sub>Chla</sub>	log a* <sub>Sym</sub>	log a* <sub>M</sub>	log Chla	log Simbiontes	log Ci	log P <sub>max</sub>	log P <sub>Sym</sub>
log a* <sub>Chla</sub>	-0.34***								
log a* <sub>Sym</sub>	-0.24***	0.57***							
log a* <sub>M</sub>	0.38***	-0.08	-0.36***						
log Chla	0.74***	-0.87***	-0.54***	0.28***					
log Simbiontes	0.66***	-0.59***	-0.85***	0.48***	0.79***				
log Ci	0.14**	-0.44***	0.44***	-0.30***	0.35***	-0.29***			
log P <sub>max</sub>	0.67***	-0.44***	-0.46***	0.26***	0.67***	0.70***	-0.03		
log P <sub>Sym</sub>	0.1	0.14**	0.43***	-0.24***	-0.06	-0.28***	0.32***	0.49***	
log P <sub>M</sub>	0.49***	-0.28***	-0.54***	0.83***	0.48***	0.66***	-0.28***	0.70***	0.14**

Niveles de significancia: \*\*\* = 0.001, \*\* = 0.01, \* = 0.05

#### 4.3.7 Análisis de regresión múltiple

Para entender mejor la dependencia de los descriptores ópticos de los corales ( $A$  y  $a^*_{Chla}$ ) de la variación de la pigmentación del holobionte, se realizó un análisis de regresión múltiple que permite dilucidar la diferente dependencia de esta variación de los cambios en el contenido de células simbiotas y de los cambios en la pigmentación celular de los simbiotas. Este análisis fue capaz de distinguir entre los efectos directos de cada descriptor y el efecto combinado de los dos y que se expresa en la variabilidad de la absorptancia asociada a los cambios en la densidad de pigmentos. Los modelos indican que:

(i) incrementos de la densidad de simbiotas (coeficiente en negrita) resultan en incrementos mayores en la absorptancia del coral que incrementos del  $C_i$ :

$$\begin{aligned} & \log(A) \\ & = 1.77_{\pm 0.01} + \mathbf{0.26}_{\pm 0.02} * \log(\text{Simbiontes}) + 0.16_{\pm 0.02} * \log(C_i) \\ & \quad - 0.1_{\pm 0.04} * \log(\text{Simbiontes}) * \log(C_i) \\ & (R^2 = 0.57, n = 360, F = 157.58, p < 0.001) \end{aligned} \tag{4.6}$$

y, (ii) que incrementos en el  $C_i$  coeficiente en negrita resultan en reducciones mayores en la eficiencia de los pigmentos de absorber la luz que incrementos de la densidad de simbiotas:

$$\begin{aligned} & \log(a^*_{Chla}) \\ & = -0.97_{\pm 0.02} - 0.48_{0.05} * \log(\text{Simbiontes}) - \mathbf{0.74}_{\pm 0.03} * \log(C_i) \\ & \quad - 0.19_{\pm 0.08} * \log(\text{Simbiontes}) * \log(C_i) \\ & (R^2 = 0.77, n = 360, F = 393.86, p < 0.001) \end{aligned} \tag{4.7}$$

Así, corales que distribuyen su pigmentación en un número mayor de simbiotas a costo de reducir la pigmentación de cada simbiota serían capaces de coleccionar más luz ( $A$ ) y de una forma más eficiente ( $a^*_{Chla}$ ) al reducir el empaquetamiento de los pigmentos en el tejido vivo del coral. Sin embargo, al encontrarse interacciones significativas entre la

densidad de simbioses y el Ci en ambos modelos, se tiene también que concluir que a mayor pigmentación del coral la contribución de ambos parámetros para mejorar A o reducir  $a^*_{Chla}$  se reduce.

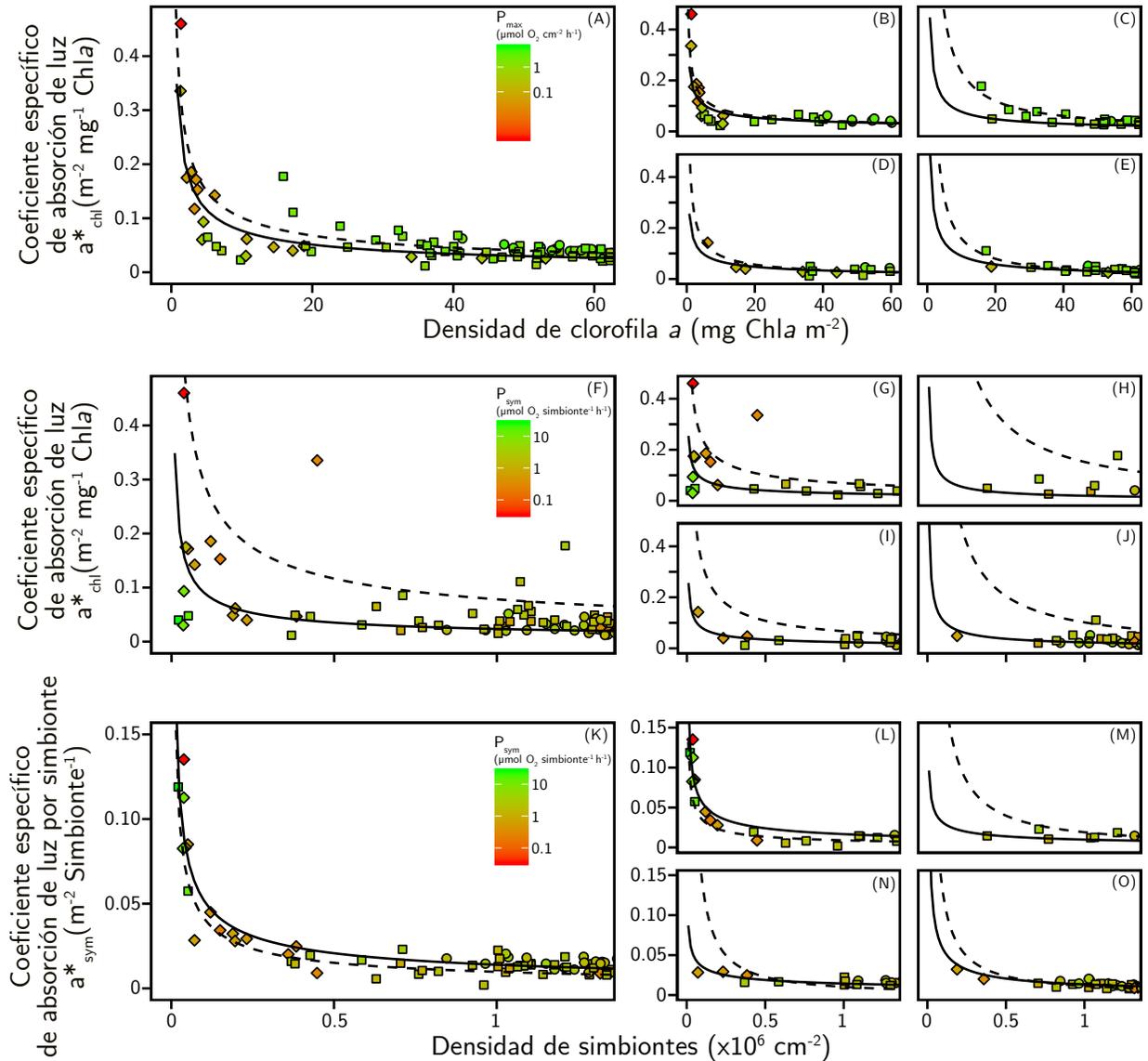
Diferencias significativas entre especies se detectaron también para este modelo general. Por ejemplo, *O. faveolata* mostró el factor de escala entre  $a^*_{Chla}$  y la densidad de clorofila *a* mayor ( $-0.89 \pm 0.04$ ), un valor significativamente más alto que el valor más pequeño estimado para *O. annularis* ( $-0.5 \pm 0.03$ ). Estos hallazgos indican que el empaquetamiento de los pigmentos dentro del tejido del coral presenta también un componente específico de cada especie muy relevante que aún necesita ser identificado y caracterizado, probablemente asociado con la morfología del esqueleto (Enríquez et al. 2017) aunque no hay que descartar la posible contribución de otros elementos estructurales.

#### 4.3.8 Asociación entre los descriptores ópticos y la tasa fotosintética del holobionte

El análisis de PCA y las correlaciones de Pearson revelaron colinealidades significativas entre estos descriptores. Los tres descriptores de la fotosíntesis ( $P_{max}$ ,  $P_{sym}$ ,  $P_M$ ) estaban fuertemente correlacionados. Se encontró también una fuerte correlación de Pearson entre  $P_{max}$  y  $P_M$ , y se observó una asociación significativa entre  $P_{max}$  y  $P_{sym}$  (Tabla 4.4). Por otro lado, también se encontraron colinealidades significativas entre las tasas de fotosíntesis del coral y los descriptores ópticos (Tabla 4.2; Tabla 4.3; Tabla 4.4;

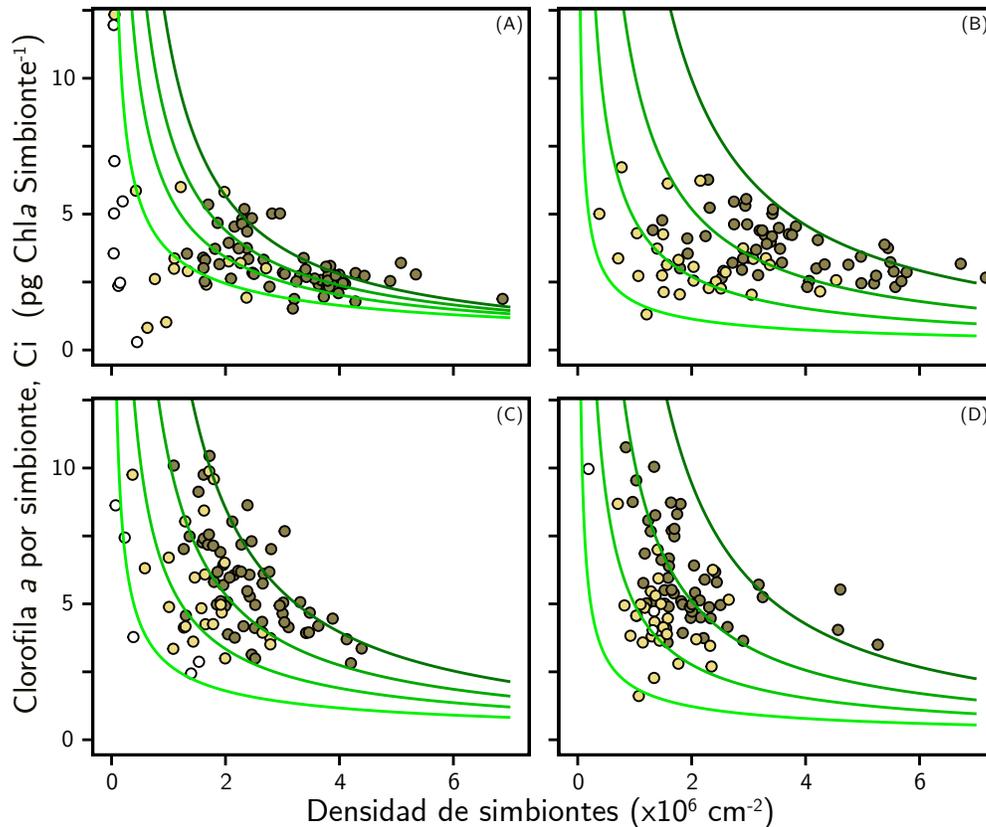
Figura 4.2; Figura 4.3). El descriptor óptico que mejor explicó la variabilidad de la capacidad fotosintética máxima de un coral fue  $a^*_M$ , mientras que  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{Sym}$  mostraron una asociación significativa pero negativa con  $P_{max}$  y  $P_M$  (Tabla 4.4; Figura 4.3). Curiosamente, incrementos en la eficiencia de absorción de luz de los simbioses ( $a^*_{Sym}$ ) se asociaron significativa y positivamente a la contribución de los simbioses a la productividad fotosintética de holobionte ( $P_{sym}$ ).

Analizando en detalle la asociación de los cambios en la pigmentación de los corales y dos de sus descriptores ópticos,  $a^*_{Chla}$  y  $a^*_{Sym}$ , con los cambios en la actividad fotosintética del holobionte, se observó que los corales pueden ajustarse de forma óptima a lo largo de un gran rango de variación en la pigmentación y en los descriptores ópticos. Este análisis también permitió detectar que sólo se observa blanqueamiento, es decir la supresión total de la fotosíntesis de los simbiontes,  $P_{sym}$ , a muy bajo contenido de simbiontes, y, por otro lado, a altos valores de  $a^*_{Sym}$  en una especie, *O. annularis* (Figura 4.8L). En las otras dos especies en las que se detectó también blanqueamiento en los experimentos, *P. strigosa* y *M. cavernosa*, la supresión total de la fotosíntesis de los simbiontes ( $P_{sym}$ ) se observó mucho antes, cuando los corales tenían todavía un número significativo de simbiontes en el tejido (Figura 4.8N,O). Todos los corales que presentaron el fenotipo blanqueado mostraron también una fuerte caída de la pigmentación ya sea por la pérdida de células o por una caída significativa en el contenido de pigmentos de los simbiontes o de los descriptores a la vez (Figura 4.9).



**Figura 4.8 Descripción de las asociaciones de variación entre la densidad de clorofila a y los coeficientes específicos de absorción**

Descripción de las asociaciones de variación entre la densidad de clorofila a sobre  $a^*_{Chla}$  (A-E), y de la densidad de simbiotes y  $a^*_{Chla}$  (F-J) y sobre  $a^*_{Sym}$  (K-O). Los gráficos describen las asociaciones generales (A, F, K) y las específicas para cada especie (derecha). Las muestras están agrupadas por su fenotipo, no-estresado (círculos), estresado (cuadrados) y blanqueados (diamantes), y se muestra la variación de  $P_{max}$  (A-E) y  $P_{sym}$  (F-O) según una escala de color en transición de valores altos (en verde) a bajos (en rojo). Las líneas describen los ajustes a dos modelos de regresión múltiple, uno que ha considerado contenidos altos del Ci (línea continua) y bajos (línea rayada) dentro del rango de variación observado para cada especie.



**Figura 4.9 Descripción de la asociación de variación entre la densidad de simbiontes y la variación de su contenido celular de clorofila a, Ci.**

Descripción de la asociación de variación entre la densidad de simbiontes y la variación de su contenido celular de clorofila a, Ci de las cuatro especies investigadas en este estudio, *Orbicella annularis* (A), *O. faveolata* (B), *Montastraea cavernosa* (C) y *Pseudodiploria strigosa* (D). El cambio de color ilustra las diferencias entre el fenotipo no-estresado (círculos más oscuros), estresado (círculos amarillos) y blanqueado (círculos blancos). Las isolíneas describen la covariación a similares valores de clorofila a, en un gradiente de mayor (línea verde más oscura) a menor densidad de clorofila a (línea verde mas clara).

En este análisis, como se ha indicado anteriormente, sólo en *O. faveolata* no se detectó una colinealidad significativa entre la variación del número de simbiontes y el Ci. Sin embargo, en esta especie, estos dos descriptores también contribuyeron de forma importante a explicar la variabilidad de  $a^*_{Chla}$ . Lo que puede derivarse de estos resultados es que podría existir una colinealidad en la variación de estos dos descriptores

que permite mantener la pigmentación de coral a un valor constante. Cambios en la pigmentación resultado de la respuesta de la simbiosis al estrés térmico expresarían diferentes “estados estables” (respuesta aclimatativa particular) de esta colinealidad entre el número de células y el contenido de pigmentos de los simbioses, que determinarían no sólo los cambios en la pigmentación del holobionte sino también la condición fisiológica del coral (fenotipo y grado de estrés), pues como se observa en este análisis también afectan directamente a la variación de la actividad fotosintética del coral y de los simbioses, además de a sus propiedades ópticas.

Para entender mejor cómo afectan diferencialmente estos dos descriptores a la eficiencia de absorción de luz del coral ( $a^*_{Chla}$ ) se realizó un análisis de rutas (path analysis) que permite distinguir entre los efectos directos e indirectos de cada descriptor sobre la variación de  $a^*_{Chla}$ , considerando los efectos de las colinealidades entre parámetros. Los resultados para cada especie son los siguientes:

***Orbicella annularis***

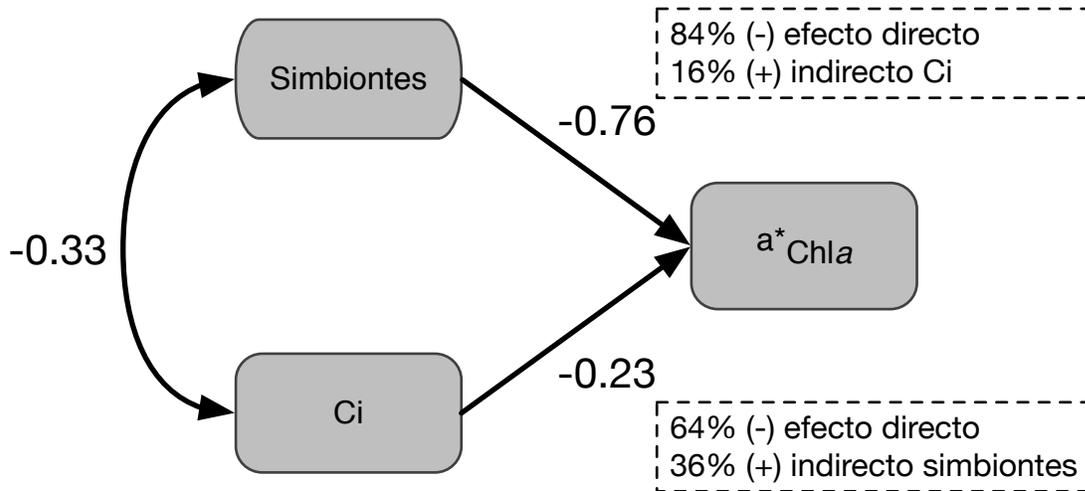
**Tabla 4.5 Correlaciones de Pearson de *O. annularis*.**

	$\log(a^*_{Chla})$	$\log(\text{simbioses})$
$\log(a^*_{Chla})$		
$\log(\text{simbioses})$	-0.76***	
$\log(Ci)$	-0.25*	-0.33***

Niveles de significancia: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

$$\log(a^*_{Chla}) = -0.95_{\pm 0.04} * \log(\text{Simbioses}) - 0.53_{\pm 0.04} * \log(Ci) \tag{4.8}$$

$$(R^2 = 0.83, n = 114, F = 286, p < 0.001)$$



**Figura 4.10 Análisis de rutas de *O. annularis***

Se muestra el análisis de rutas del modelo de regresión múltiple del efecto de la densidad de simbiotes y su  $Ci$  sobre  $a^*_{Chla}$ . Las flechas de una cabeza marcan efectos directos y la flecha de dos cabezas marca la correlación entre los dos descriptores.

***Orbicella faveolata***

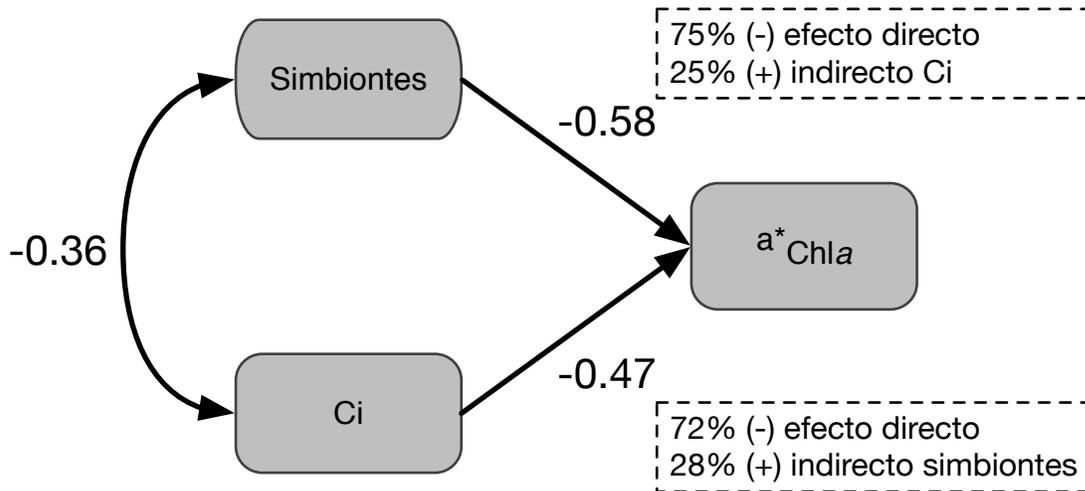
**Tabla 4.6 Correlaciones de Pearson de *O. faveolata*.**

	$\log(a^*_{Chla})$	$\log(\text{simbiotes})$
$\log(a^*_{Chla})$		
$\log(\text{simbiotes})$	-0.58***	
$\log(Ci)$	-0.47***	-0.36***

Niveles de significancia: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

$$\log(a^*_{Chla}) = -0.86_{\pm 0.03} * \log(\text{Simbiotes}) - 0.78_{\pm 0.03} * \log(Ci) \quad (4.9)$$

$$(R^2 = 0.86, n = 124, F = 397.6, p < 0.001)$$



**Figura 4.11 Análisis de rutas de *O. faveolata***

Se muestra el análisis de rutas del modelo de regresión múltiple del efecto de la densidad de simbiotes y su Ci sobre  $a^*_{Chla}$ . Las flechas de una cabeza marcan efectos directos y la flecha de dos cabezas marca la correlación entre los dos descriptores.

*Montastraea cavernosa*

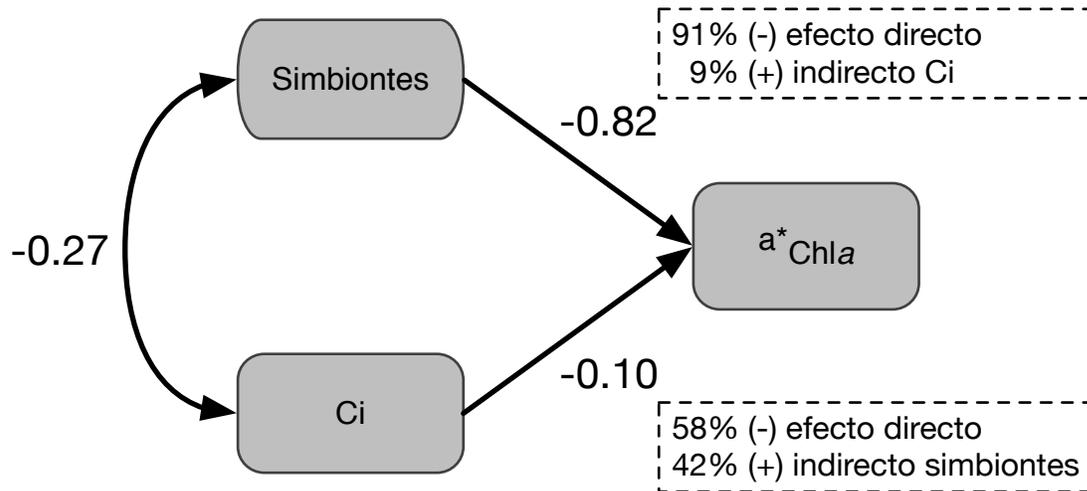
**Tabla 4.7 Correlaciones de Pearson de *M. cavernosa*.**

	$\log(a^*_{Chla})$	$\log(\text{simbiontes})$
$\log(a^*_{Chla})$		
$\log(\text{simbiontes})$	$-0.82^{***}$	
$\log(Ci)$	$-0.10$	$-0.27^{**}$

Niveles de significancia: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

$$\log(a^*_{Chla}) = -0.91_{\pm 0.04} * \log(\text{Simbiontes}) - 0.35_{\pm 0.04} * \log(Ci) \quad (4.10)$$

$$(R^2 = 0.78, n = 124, F = 220.2, p < 0.001)$$



**Figura 4.12 Análisis de rutas de *M. cavernosa***

Se muestra el análisis de rutas del modelo de regresión múltiple del efecto de la densidad de simbiotes y su  $C_i$  sobre  $a^*_{Chla}$ . Las flechas de una cabeza marcan efectos directos y la flecha de dos cabezas marca la correlación entre los dos descriptores.

*Pseudodipoloria strigosa*

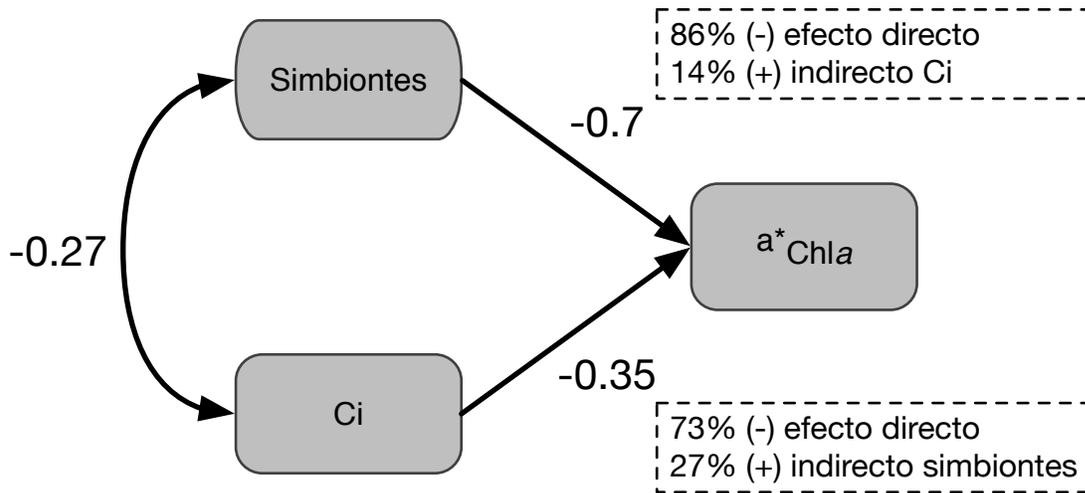
**Tabla 4.8 Correlaciones de Pearson de *P. strigosa*.**

	$\log(a^*_{Chla})$	$\log(\text{simbiontes})$
$\log(a^*_{Chla})$		
$\log(\text{simbiontes})$	$-0.7^{***}$	
$\log(C_i)$	$-0.35^{***}$	$-0.24^{**}$

Niveles de significancia: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

$$\log(a^*_{Chla}) = -0.83_{\pm 0.04} * \log(\text{Simbiontes}) - 0.55_{\pm 0.04} * \log(\text{Ci}) \quad (4.11)$$

$$(R^2 = 0.76, n = 116, F = 397.6, p < 0.001)$$



**Figura 4.13** Análisis de rutas de *P. strigosa*

Se muestra el análisis de rutas del modelo de regresión múltiple del efecto de la densidad de simbiontes y su Ci sobre  $a^*_{Chla}$ . Las flechas de una cabeza marcan efectos directos y la flecha de dos cabezas marca la correlación entre los dos descriptores.

Según estos resultados, los cambios en el número de simbiontes son los que dominan la variabilidad de  $a^*_{Chla}$  (ver coeficientes en los modelos de regresión múltiple) pero en algunas especies como *O. faveolata* los cambios en el Ci también tienen un efecto importante sobre esta variación, mientras que, en *M. cavernosa*, este efecto es el más bajo, aunque también significativo, de entre las cuatro especies analizadas.

#### 4.4 Discusión

La caracterización de las propiedades ópticas de cuatro especies de corales escleractíneos y el análisis de su dependencia de la variación de la pigmentación reveló que las tres especies con un esqueleto tipo cáliz, *Orbicella annularis*, *O. faveolata* y *Montastraea*

*cavernosa*, fueron capaces de alcanzar una capacidad máxima de absorción de luz mayor ( $A_{\max} > 90\%$ ) que la especie con una morfología meandroide del esqueleto, *Pseudodiploria strigosa* ( $A_{\max} = 88\%$ ). Estos hallazgos concuerdan con los resultados de un reciente estudio de las propiedades ópticas de los esqueletos de coral (Enríquez et al. 2017), en donde los autores concluyen que el esqueleto del morfotipo meandroide tiene una menor capacidad de aumentar el esparcimiento múltiple de la luz que el esqueleto con pólipos en forma de cáliz (Enríquez et al. 2017). Los resultados de este análisis apoyan esta conclusión considerando las pequeñas pero significativas diferencias encontradas para la capacidad máxima de la absorción de luz del holobionte de *P. strigosa*. Estas diferencias entre especies también se reflejaron en la cantidad de pigmentación y/o simbioses necesaria para alcanzar  $A_{\max}$ . *O. faveolata* fue la especie que consigue maximizar la absorción de la luz con menor pigmentación y densidad de simbioses. En contraste, *M. cavernosa* es la especie que necesita mayor pigmentación para maximizar su capacidad de absorción de luz, pero con una densidad de simbioses similar a *O. annularis*. Curiosamente, *P. strigosa*, a pesar de alcanzar una ligeramente menor  $A_{\max}$ , fue capaz de maximizar su absorción de luz con una pigmentación y una de las densidades de simbioses más bajas. Según estos hallazgos, este primer estudio comparativo de las propiedades ópticas de los corales vivos permite concluir que hay diferencias significativas entre especies en la capacidad máxima de absorción de luz del coral y también en la eficiencia con la que el holobionte colecta la energía solar, fundamental para su crecimiento y el mantenimiento de sus balances de carbono. La variabilidad interespecífica documentada confirma la extraordinaria eficiencia de los corales escleractíneos como colectores de la energía solar ya documentada previamente (Enríquez et al. 2005; Terán et al. 2010) y confirmada por Vásquez-Elizondo y Enríquez (2017). La cantidad de clorofila *a* que se requiere para alcanzar la absorción máxima de luz fue notablemente inferior, especialmente para tres especies ( $<50 \text{ mg Chl}a \text{ m}^{-2}$ ) en comparación con la que requieren las hojas de plantas terrestres ( $>200 \text{ mg Chl}a \text{ m}^{-2}$ ; ver Carter y Knapp 2001; Davis et al. 2011) o tejidos fotosintéticos de macrófitas marinas

(>100 mg Chl<sub>a</sub> m<sup>-2</sup>; ver Frost-Christensen y Sand-Jensen 1992; Enríquez et al. 1994). En intentos previos de caracterizar la capacidad de absorción de luz del coral *Stylophora pistilata*, se determinaron valores también más altos para los corales (120 mg Chl<sub>a</sub> m<sup>-2</sup>; ver Dubinsky et al. 1984; Dubinsky et al. 1990). Sin embargo, en estos análisis no se había considerado la contribución del esqueleto de coral, sino que se habían analizado las propiedades ópticas del tejido vivo extraído y sobrepuesto a un filtro, similar a los estudios ópticos del fitoplancton, y, por tanto, no se habían caracterizado realmente las propiedades ópticas de la unidad del coral-simbionte-esqueleto.

A pesar de la enorme eficiencia de los corales como colectores de luz, los resultados de este estudio indican que el “empaquetamiento de los pigmentos” (Duysens 1956) sigue afectando al tejido del coral, ya se encontró una reducción no-lineal de la eficiencia de la absorción de la luz de los pigmentos fotosintéticos,  $a^*_{Chl_a}$ , al aumentar la pigmentación del coral por unidad de área proyectada (lo que se conoce como sección transversal de pigmentos), en todas las especies caracterizadas. Estos resultados son similares a descripciones previas realizadas en estructuras fotosintéticas multicelulares (Enríquez y Sand-Jensen 2003; Enríquez y Pantoja-Reyes 2005; Enríquez et al. 2005) y en el fitoplancton (Morel y Bricaud 1981; Kirk 2010). Sin embargo, según los modelos (4.6 y (4.7), se puede también concluir que incrementos de la densidad de simbioses son más efectivos para compensar el “empaquetamiento de los pigmentos” y mejorar la absorptancia del coral que incrementos de la pigmentación del simbiote (Ci), lo que coincide con el modelo óptico de Terán et al. (2010). Estos autores usaron simulaciones de Monte Carlo en modelos 2D de esqueletos, y documentaron que cambios en el número de simbioses son más eficientes para mejorar la colecta de la luz de la estructura que cambios en la absorción específica de cada simbiote. Por lo tanto, distribuir los pigmentos fotosintéticos en una cantidad mayor de simbioses es más efectivo para aumentar la capacidad (absorptancia) y la eficiencia ( $a^*_{Chl_a}$ ) de absorción de luz del coral que incrementar la pigmentación de simbioses (Ci) y reducir su densidad para conseguir una pigmentación en el coral similar. Esta segunda opción lleva a un ajuste

estructural del coral más ineficiente para coleccionar la energía solar ( $a^*_{Chla}$  menor), pero quizá más robusto bajo niveles del estrés lumínico elevados, lo que conllevaría un beneficio funcional muy relevante durante el estrés térmico y lumínico.

El estudio comparativo presentado aquí también desveló la existencia de un componente específico del “empaquetamiento de los pigmentos” en el coral simbióticos que aún necesita ser caracterizado. Este componente tiene que estar relacionado con las propiedades ópticas del esqueleto; las propiedades ópticas de los simbioses; y con características estructurales del tejido vivo del coral como cambios en el tamaño del pólipo y en el grosor del tejido del coral, y cambios en la distribución de los simbioses dentro del tejido. Por supuesto, también hay que considerar la plasticidad de las especies para cambiar su pigmentación y su contenido de simbioses. Entre las propiedades ópticas y estructurales citadas, la variabilidad de las propiedades ópticas del esqueleto del coral, cambios en el grosor del tejido y en la distribución de los simbioses en él, y en la plasticidad de las especies para cambiar su pigmentación, su densidad de simbioses, y también el filotipo dominante del tejido, son probablemente los elementos más importantes involucrados en la regulación de las propiedades ópticas del holobionte.

#### 4.4.1 Variabilidad entre especies de coral

Con el análisis de componentes principales (PCA) se pudo describir el 80% de la variabilidad interespecífica recogida en esta base de datos que desplegaron los dos fenotipos más contrastantes del año, invierno y verano, de organismos no-estresados de las cuatro especies constructoras de los arrecifes del Caribe analizadas (

Figura 4.2). El primer componente (PC1) no distinguió entre especies más pigmentadas y menos pigmentadas, sino entre especies con la capacidad de albergar un número más alto de simbioses, las dos *Orbicellas spp.*, y las especies que tenían un contenido de simbioses menor pero más pigmentados en un tejido más grueso y, por tanto, un contenido de proteínas solubles mayor, *P. strigosa* y *M. cavernosa*. El segundo componente (PC2) es el que distinguió entre especies de coral muy pigmentadas (*O.*

*faveolata* y *M. cavernosa*) y menos pigmentadas (*O. annularis* y *P. strigosa*). Por último, el tercer componente (PC3) lo explica fundamentalmente la variación de la productividad fotosintética del holobionte ( $P_{\max}$ ). Según este análisis, los corales de tejido más delgado y de mayor capacidad para albergar un alto número de simbiontes, las dos *Orbicellas* son los que consiguen ser más eficientes para absorber la luz, pero también alcanzan mayores tasas fotosintéticas por unidad de masa del hospedero ( $a^*_M$  y  $P_M$ ). El extremo opuesto lo representaría *M. cavernosa* y *P. strigosa*, pero especialmente *M. cavernosa*, caracterizadas por un bajo retorno al hospedero de la energía colectada ( $a^*_M$ ) y de la actividad fotosintética de los simbiontes ( $P_M$ ), y que albergan una población de simbiontes menor, más pigmentada ( $C_i$ ), en tejidos y/o pólipos de mayor tamaño. Por lo tanto, la “solución evolutiva” representada por las dos *Orbicellas*, parece una simbiosis más eficiente en el retorno al hospedero de la energía solar colectada ( $a^*_M$ ) por los simbiontes y en su actividad fotosintética *in hospite* ( $P_{\text{sym}}$ ). Esta solución la representa especialmente *O. annularis*, una especie que se caracterizó por tener una de las menores pigmentaciones y el tejido más delgado, pero también la especie que presentó una de las mayores tasas de fotosíntesis del holobionte ( $P_{\max}$ ) y los valores mayores en su eficiencia de absorción de luz ( $a^*_{\text{Chl}a}$ ). La solución contraria la representarían *M. cavernosa* y *P. strigosa*, pero especialmente *M. cavernosa*, una especie que, a pesar del mayor tamaño del pólipo y su mayor contenido de proteínas solubles, construye una simbiosis menos eficiente y menos productiva en lo que respecta a la actividad fotosintética de sus simbiontes *in hospite* que se caracterizan por tener un mayor tamaño y un mayor contenido de pigmentos ( $C_i$ ).

Los resultados también indican que los holobiontes más productivos suelen presentar una eficiencia de absorción de luz más baja para ambos socios simbióticos, el hospedero ( $a^*_M$ ) y el simbionte ( $a^*_{\text{Sym}}$ ), y albergan simbiontes con un  $C_i$  más bajo (Tabla 4.2;

Figura 4.2). De acuerdo a estos resultados se podría sugerir la existencia de un compromiso evolutivo, *trade-off*, entre el incremento de la capacidad de “hospedar” un

alto número de simbioses, que permite construir una asociación simbiótica con mayor retorno de los beneficios de la simbiosis para el hospedero, y relaciones simbióticas con menores contenidos de simbioses en el tejido del hospedero y que construyen simbiosis con menores beneficios para el hospedero. La primera estrategia requiere una alta capacidad de esparcimiento de la luz en el esqueleto de coral (Enríquez et al. 2017) para contrarrestar el efecto paquete y la autosombra de los pigmentos dentro del tejido. Esto permitiría aumentar el campo lumínico local del simbiote y mejorar su actividad fotosintética, condiciones necesarias para incrementar los beneficios que le podría aportar la simbiosis al hospedero ( $P_M$  y  $a^*_M$ ). El éxito ecológico y/o evolutivo de la segunda opción no es tan obvio, aunque probablemente esté relacionado con una mayor robustez del coral a sobrevivir en condiciones subóptimas para la simbiosis. La actividad fotosintética de esta población del simbiote *in hospite* sería más dependiente de la capacidad del simbiote de maximizar la eficiencia de coleccionar la luz ( $a^*_{Sym}$ ) y de su contribución a la productividad fotosintética del holobionte ( $P_{sym}$ ).

#### 4.4.2 Variabilidad entre fenotipos

Adicionalmente a las diferencias entre especies anteriormente discutidas este estudio reveló también cambios estacionales muy significativos en la condición del coral y características contrastantes entre el fenotipo estresado y el blanqueado, que claramente se pudieron distinguir en el análisis de PCA (Figura 4.3). La variabilidad de la capacidad fotosintética máxima del holobionte ( $P_{max}$ ), asociada positivamente con  $a^*_M$  y negativamente con  $a^*_{Sym}$  y  $a^*_{Chla}$ , fueron los descriptores funcionales que pudieron explicar el 40% de la variabilidad total recogida en la base de datos que se generó a lo largo de este estudio en los tres experimentos implementados. Este análisis multivariante permitió distinguir claramente entre los fenotipos no estresados, estresados y blanqueados de las cuatro especies analizadas. Este hallazgo confirma la validez de la asunción expuesta en el capítulo 2, donde se considera al fenotipo blanqueado el que ha experimentado una supresión total de la fotosíntesis de las algas simbioses y también ha incrementado fuertemente su eficiencia de absorción de luz, tanto la de los simbioses

( $a^*_{Sym}$ ) como la del holobionte ( $a^*_{Chla}$ ). Estos dos descriptores ópticos son, sin embargo, bastante variables entre especies y entre fenotipos, y no siempre reflejan una pérdida total de actividad fotosintética de los simbiontes *in hospite*, por lo que un mejor descriptor del holobionte no-estresado parece ser  $a^*_M$ . Este descriptor óptico permite cuantificar la eficiencia del retorno para el hospedero de la energía solar absorbida por los simbiontes *in hospite* (Tabla 4.3). El segundo (PC2) y tercer (PC3) componentes de análisis, que incrementaron la variabilidad explicada al 66 y 87%, respectivamente, permitieron discriminar entre dos holobiontes no-estresados: uno que favorece aumentar la contribución fotosintética del simbionte a la productividad del holobionte ( $P_{Sym}$ ); y otro que favorece aumentar el beneficio para el hospedero ( $P_M$  y  $a^*_M$ ). La interpretación que se hace en este estudio de estos resultados es que el primer componente PC1 describe la evolución del fenotipo estresado de todas las especies hacia una condición común de blanqueamiento; mientras que los componentes PC2 y PC3 fueron capaces de distinguir entre especies y/o fenotipos estacionales de organismos no-estresados.

Otra conclusión de este análisis de acuerdo con los resultados de capítulo 3, es que la reducción de la pigmentación del coral no es suficiente para identificar un coral blanqueado. Se necesitan otros descriptores del holobionte adicionales al color o a la cantidad de pigmentos o simbiontes para reconocer una condición disfuncional de la simbiosis. Este estudio ha evidenciado que la determinación de las tasas de fotosíntesis es el método más robusto para caracterizar el estado fisiológico de la simbiosis. Sin embargo, los datos aquí presentados también muestran que los descriptores ópticos pueden ayudar a detectar un coral blanqueado (Figura 4.1). Reducciones severas de la absorptancia ( $A$ ) del coral, pero también incrementos dramáticos de la eficiencia de absorción del holobionte ( $a^*_{Chla}$ ) y de la eficiencia de absorción de los simbiontes ( $a^*_{Sym}$ ) pueden servir para diferenciar un coral estresado de una simbiosis completamente disfuncional y que, por tanto, reconocer mejor al fenotipo blanqueado.

Cambios estacionales en las propiedades ópticas de los corales, aunque no siempre en su pigmentación, podrían responder a una covariación negativa entre el número de células simbiotas y el contenido celular de pigmentos de estos simbiotas, con implicaciones relevantes sobre la condición fisiológica del coral y la variación de su actividad fotosintética (cambios estacionales en el fenotipo, ver capítulo 2) y sobre su sensibilidad al estrés térmico (ver capítulo 3 y Scheufen et al. 2017b).

Por último, la observación de una mayor pigmentación en la base de cáliz de cada pólipos en las *Orbicellas* (Figura 4.6b) sugiere la presencia de una población de simbiotas aclimatada a un ambiente local de menor disponibilidad de luz, y, por tanto, con contenidos celulares, Ci, mayores de pigmentos. Estas células serían seleccionadas durante el estrés térmico pues, en principio estaría sometidas a menor estrés lumínico, lo que explicaría el fuerte incremento del Ci en los corales estresados. La posibilidad de que existan zonas “sombreadas” en el tejido del coral, y que incluso se pudieran mantener así en condiciones de alta pérdida de simbiotas, permitiría que estas zonas pudieran actuar como “potenciales refugios” durante el estrés térmico para la recuperación de la población de simbiotas después del estrés. La capacidad de servir de refugio de estas zonas sombreadas dependerá de la capacidad de la estructura de mantener bajos niveles locales de iluminación al perder pigmentos y células.

#### 4.5 Literatura citada

- Carter GA, Knapp AK (2001) Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *American journal of botany* 88, 677-684
- Davis PA, Caylor S, Whippo CW, Hangarter RP (2011) Changes in leaf optical properties associated with light-dependent chloroplast movements. *Plant Cell Environ* 34, 2047-2059
- Dubinsky Z, Falkowski PG, Porter JW, Muscatine L (1984) Absorption and utilization of radiant energy by light- and shade-adapted colonies of the hermatypic coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 222, 203-214

- Dubinsky Z, Stambler N, Ben-Zion M, McCloskey LR, Muscatine L, Falkowski PG (1990) The effect of external nutrient resources on the optical properties and photosynthetic efficiency of *Stylophora pistillata*. Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences 239, 231-246
- Duysens LNM (1956) The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. Biochim Biophys Acta 19, 1-12
- Enríquez S, Pantoja-Reyes NI (2005) Form-function analysis of the effect of canopy morphology on leaf self-shading in the seagrass *Thalassia testudinum*. Oecologia 145, 235-243
- Enríquez S, Agustí S, Duarte CM (1994) Light absorption by marine macrophytes. Oecologia 98, 121-129
- Enríquez S, Méndez ER, Iglesias-Prieto R (2005) Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. Limnol Oceanogr 50, 1025-1032
- Enríquez S, Méndez ER, Hoegh-Guldberg O, Iglesias-Prieto R (2017) Key functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. Proc R Soc B 284, 20161667
- Enríquez S, Sand-Jensen K (2003) Variation in light absorption properties of *Mentha aquatica* L. as a function of leaf form: Implications for plant growth. Int J Plant Sci 164, 125-136
- Frost-Christensen H, Sand-Jensen K (1992) The quantum efficiency of photosynthesis in macroalgae and submerged angiosperms. Oecologia 91, 377-384
- Kirk JTO (2010) Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. Cambridge University Press, New York
- Marcelino LA, Westneat MW, Stoyneva V, Henss J, Rogers JD, Radosevich A, Turzhitsky V, Siple M, Fang A, Swain TD, Fung J, Backman V (2013) Modulation of light-enhancement to symbiotic algae by light-scattering in corals and evolutionary trends in bleaching. PLoS One 8, e61492
- Morel A, Bricaud A (1981) Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. Deep Sea Research Part A Oceanographic Research Papers 28, 1375-1393
- Scheufen T, Krämer WE, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017) Seasonal variation modulates coral sensibility to heat-stress and explains annual changes in coral productivity. Sci Rep 7, 601
- Terán E, Méndez ER, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2010) Multiple light scattering and absorption in reef-building corals. Appl Opt 49, 5032-5042
- Vásquez-Elizondo RM, Enríquez S (2017) Light Absorption in Coralline Algae (Rhodophyta): A Morphological and Functional Approach to Understanding Species Distribution in a Coral Reef Lagoon. Front Mar Sci 4, 393
- Wangpraseurt D, Larkum AW, Franklin J, Szabó M, Ralph PJ, Kühl M (2014) Lateral light transfer ensures efficient resource distribution in symbiont-bearing corals. J Exp Biol 217, 489-498

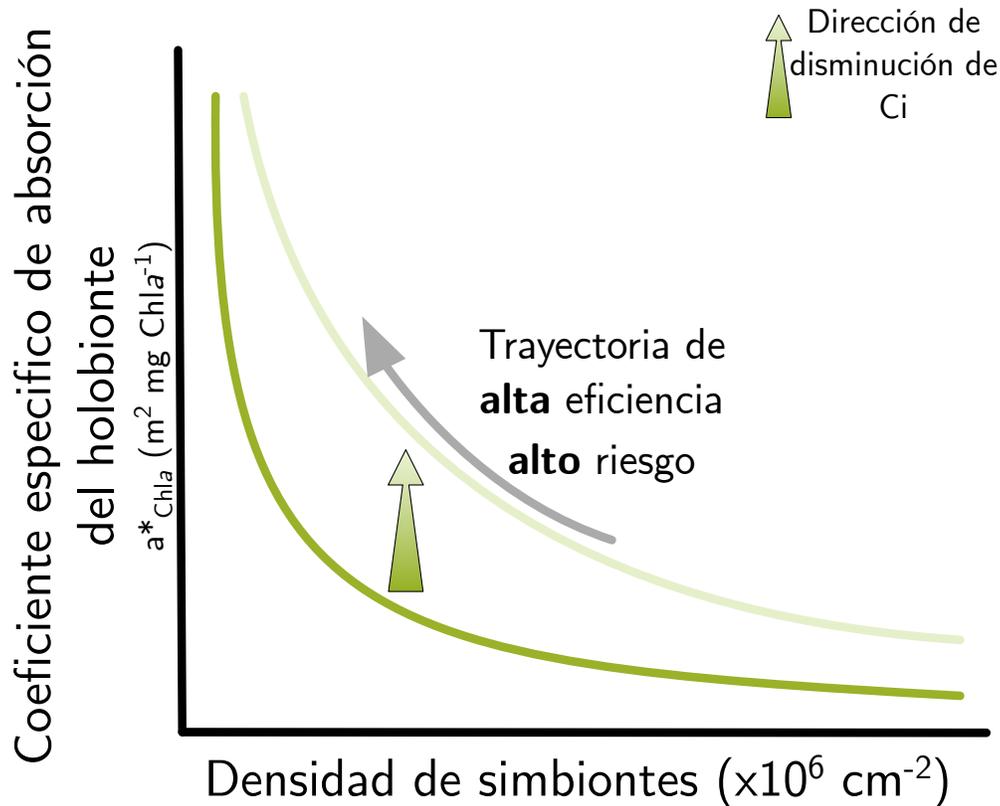
## Capítulo 5 - Conclusiones generales

---

Este estudio además de describir la diferente sensibilidad al estrés térmico de cuatro constructores arrecifales de los arrecifes de coral del Caribe al estrés térmico, *Orbicella annularis*, *O. faveolata*, *Montastraea cavernosa* y *Pseudodiploria strigosa*, y de revelar la diferente sensibilidad a la alta temperatura de dos fenotipos estacionales, en concreto, del fenotipo de invierno y verano, también señala por primera vez la importancia de distinguir en los corales simbióticos entre el fenotipo estresado y el blanqueado. Estos resultados son enormemente relevantes pues advierten del peligro de una errónea asignación de un determinado fenotipo, en la interpretación de los resultados de cualquier estudio experimental. Parte de las inconsistencias documentadas en la literatura para caracterizar la respuesta de los corales al estrés pueden ser consecuencia de limitar la identificación del fenotipo blanqueado a los cambios de color y a los cambios en  $Fv/Fm$ , otro parámetro también insuficiente para determinar cambios significativos en la actividad fotosintética de los simbiontes *in hospite*. En este estudio se propone por primera vez un diverso número de descriptores estructurales, ópticos y fisiológicos específicos de esta simbiosis y también comunes a otros organismos, para caracterizar los diferentes fenotipos y especies de coral. Se ofrece también por primera vez un análisis multivariante y alométrico que permite resaltar la importancia de cada descriptor y su poder explicativo específico. Esta aproximación resalta la importancia de identificar la información específica que ofrece cada parámetro y a la vez la utilidad para el análisis comparativo de contar con toda la información complementaria que ofrece en su conjunto la diversidad de parámetros propuesta.

Algunas de las colinealidades encontradas necesitan todavía de mayor estudio, como por ejemplo, la colinealidad entre el número de células y el contenido de pigmentos por célula, pero su expresión en los cambios estacionales de la densidad de simbiontes y del Ci (Brown et al. 1999; Fagoonee et al. 1999; Fitt et al. 2000) podrían ser una expresión de la optimización de las propiedades ópticas del holobionte con el fin de: (i) minimizar

el “empaquetamiento de los pigmentos” bajo condiciones óptimas o niveles de luz decrecientes; o (ii) mejorar la fotoprotección y la producción fotosintética al minimizar el fotodaño bajo niveles de estrés lumínico creciente. De acuerdo a esto se propone en este estudio que el fenotipo de verano de coral que se ha documentado y que se caracteriza por mantener simbiontes con mayores valores del Ci, pero menores de la densidad de simbiontes, podría ser el ajuste óptimo del holobionte al incremento estacional de la temperatura del mar y de la irradiancia en primavera. Esta condición que conlleva un incremento del campo lumínico en el interior del tejido le permite incrementar la fotosíntesis, pero también mejorar la respuesta fotoprotectiva de los simbiontes *in hospite* a condiciones crecientes de iluminación y estrés por luz. Sin embargo, incrementos demasiado grandes en el Ci en combinación con densidades de simbiontes demasiado reducidas pueden resultar en un holobionte mucho más vulnerable al estrés, especialmente lumínico y/o térmico, pues pérdidas pequeñas en el número de células o en la pigmentación de los simbiontes reduciría demasiado la pigmentación del coral y la acercaría al umbral de tolerancia de la relación simbiótica. Un punto en el contenido de pigmentos de esta simbiosis que si se traspasa conlleva una subida tan rápida y drástica de  $a^*_{Chla}$  con el consiguiente incremento del estrés lumínico para los simbiontes, que sería inmanejable fisiológicamente por el coral, por lo que marcaría la ruptura de la relación simbiótica y la expulsión de las algas. Estos cambios se muestran por medio de un modelo cuantitativo teórico derivado del análisis alométrico realizado en el capítulo 4 y que se ilustra en la Figura 5.1. En este modelo se muestra de forma más clara el efecto diferencial de los cambios en el número de simbiontes y en el Ci sobre  $a^*_{Chla}$ . A valores constantes o incluso mayores del Ci, la reducción del número de simbiontes supone un menor incremento de  $a^*_{Chla}$  que si junto a la reducción también se reduce el Ci (Figura 5.1).



**Figura 5.1 Modelo teórico del efecto del contenido celular de pigmentos,  $C_i$ , y del número de simbiotes  $a^*_{Chla}$**

La línea inferior (verde oscuro) muestra la variación de  $a^*_{Chla}$  en función de los cambios en la densidad de simbiotes y asumiendo un  $C_i$  constante de un valor alto que fue calculado a partir del promedio de la base de datos al que se sumó la desviación estándar (condición de alto valor de  $C_i$ ). La línea superior (verde claro) muestra la misma asociación de variación, pero con un valor de  $C_i$  constante bajo calculado a partir de la resta al promedio de la desviación estándar (condición de bajo valor de  $C_i$ ). La flecha verde indica el significativo incremento de  $a^*_{Chla}$  para valores similares de la densidad de simbiotes al disminuir el  $C_i$  de los simbiotes. La trayectoria que ilustra la flecha gris describe una trayectoria de mayor riesgo para la simbiosis pues la pérdida de simbiotes resulta en incrementos mucho más rápidos de  $a^*_{Chla}$  y por tanto expone a los simbiotes in hospite a condiciones de rápidos incrementos del campo lumínico local al perder células. Estas condiciones son de altísimo riesgo bajo estrés térmico y lumínico, pues conduciría con mayor probabilidad al fenotipo blanqueado.

Los valores extremadamente altos que se han encontrado para  $a^*_{Chla}$  en el fenotipo de coral blanqueado refuerzan la importancia de este descriptor, pero sobre todo su capacidad para determinar el umbral de tolerancia fisiológica o “tipping point” funcional de la

simbiosis de coral, y el por qué de la alta especificidad (variabilidad entre especies) del umbral de tolerancia al estrés térmico que se ha documentado para esta simbiosis. Cuando la pigmentación del coral se reduce hasta un determinado valor,  $a^*$  incrementa rápidamente alcanzando niveles inaceptables para mantener la fotosíntesis del simbiote funcional, pues los niveles de absorción de luz son extremadamente altos e inducen tal nivel de fotodaño y de estrés oxidativo en los simbioses, que el hospedero no puede sino deshacerse de ellos y expulsarlos. Si el cambio es tan rápido que el hospedero no le da tiempo a expulsar las algas, el impacto del estrés oxidativo puede inducir mortalidad antes incluso de que el coral se blanquee.

Al contrario que en el verano, en el invierno incrementos demasiado altos de la densidad de simbioses pueden requerir de una reducción del  $C_i$  para mejorar la penetración de la luz en el tejido y contrarrestar el “empaquetamiento de los pigmentos”. Esto permitiría iluminar suficientemente a toda la población de simbioses para optimizar su actividad fotosintética. Son simbioses con menos recursos quizás (menor  $C_i$ ) y que viven en un ambiente más sombreado (mayor número de células y menor  $a^*_{Chl a}$ ), lo que podría explicar la menor tasa fotosintética encontrada para el simbiote ( $P_{sym}$ ) y para el holobionte ( $P_{max}$ ). Este ajuste sería menos eficaz para especies de coral con esqueletos que muestran una eficiencia reducida para amplificar el esparcimiento de la luz (Enríquez et al. 2017), por lo que estas especies tendrían más limitada la variación del incremento de la población de simbioses. En resumen, durante la aclimatación del holobionte a las condiciones del verano, la reducción de la densidad de simbioses acompañada por un incremento de los recursos por simbiote (mayor  $C_i$ ) produce holobiontes más eficientes para coleccionar la energía solar ( $a^*_{Chl a}$  alta) y más productivos, pero con un riesgo más alto de blanqueamiento si se prolongan las condiciones de estrés lumínico y/o térmico. Esta condición es especialmente vulnerable como se ha indicado anteriormente, si la pérdida de simbioses no está asociada a incrementos en el  $C_i$  (Figura 5.1).

Con este modelo se puede explicar el efecto de los cambios en la densidad de simbioses y del Ci sobre la estabilidad de la simbiosis, independientemente de la posible contribución de cambios adicionales en el filotipo dominante del simbiote. La variación de la respuesta fisiológica de la población de simbioses, que permitiría incrementar la presencia de filotipos con mayor o menor capacidad de responder a condiciones de luz bajas o variables, y responder al estrés térmico o lumínico incrementado su capacidad de fotoprotección y/o de reparación de su aparato fotosintético, indudablemente jugaría también un importante papel en el mantenimiento de la estabilidad de la relación simbiótica. En este estudio, lamentablemente, no se han caracterizado los cambios en el filotipo dominante de la población de simbioses. Sin embargo, descripciones previas en la laguna arrecifal de Puerto Morelos (México) para las cuatro especies investigadas han reportado la presencia de C3d (C3e) en *M. cavernosa*; de los tipos B1 y C1 en *P. strigosa*; y C7 y D1a/*Symbiodinium trenchii* en *O. faveolata* (LaJeunesse 2002). Un estudio más detallado de Kemp et al. (2015) para colonias de *O. faveolata* creciendo el “la Bocana” de la laguna arrecifal de Puerto Morelos, reportó la presencia de los filotipos A3, B1, B17, C17, y D1a/*S. trenchii*. Con respecto a *O. annularis* LaJeunesse (2002) documentó la presencia de B1, C3 y D1a/*S. trenchii* en corales colectados en el arrecife de Lee Stocking Island en las Bahamas. Del análisis realizado en nuestro laboratorio, aunque dirigido a otros proyectos y por tanto sobre muestras no utilizadas experimentalmente en este estudio, aunque procedentes de la misma población, pues eran o bien las mismas colonias o colonias creciendo en sitios y a profundidades similares (datos no-publicados), se documentaron los filotipos A3 y B1 en *O. annularis* y A3, B17, C7 y D1a/*Symbiodinium trenchii* en *O. faveolata*. Esta variabilidad probablemente explicaría parte de la variabilidad no explicada por los simples cambios en el número de simbioses y en su contenido celular de pigmentos. Este estudio no contradice por tanto la idea que la plasticidad en la variación de la especie o filotipo dominante (LaJeunesse et al. 2018) de la población de simbioses explica parte de la variación en la sensibilidad de los corales simbióticos al estrés térmico. Es probable también que esta variación

explique parte de los cambios encontrados en su fisiología y óptica. Sin embargo, este estudio también pone en evidencia la importante contribución de la pérdida de pigmentación en el coral, y de los cambios relativos en la pérdida de simbiontes y/o en su pigmentación (Ci), con independencia de qué tipo de simbionte es el dominante, para determinar la vulnerabilidad de los corales simbióticos al estrés térmico y lumínico. Estas simples características estructurales del tejido del coral no han recibido todavía la atención que se merecen, quizás porque aún no se le ha dado la suficiente importancia al papel tan relevante que desempeñan las propiedades ópticas de los organismos fotosintéticos en la regulación de su fisiología, y en especial a las implicaciones fisiológicas en la regulación de su fisiología, y en especial las implicaciones fisiológicas tan relevantes que se derivan de las propiedades ópticas tan extraordinarias como colectores de luz de los corales escleractíneos. Unas propiedades que como se ha señalado con anterioridad, no sólo explicarían su éxito ecológico y evolutivo, sino también parte de su diversidad funcional además de su gran vulnerabilidad al estrés lumínico y térmico asociado al calentamiento global (Enríquez et al. 2005; Enríquez et al. 2017).

El análisis alométrico y experimental que se ha realizado en este estudio propone por primera vez un gran diversidad de descriptores estructurales y funcionales con un alto poder explicativo sobre la diversidad de estrategias y opciones evolutivas que se han generado a lo largo de la evolución de esta simbiosis. Además, se han descrito asociaciones de variación entre descriptores con capacidad de identificar procesos regulatorios claves en el ajuste ambiental de los corales simbióticos y en su respuesta diferencial al estrés térmico y lumínico. Se ha propuesto la existencia de umbrales fisiológicos críticos, determinados por la pigmentación total del coral y fundamentales para el mantenimiento de la estabilidad de la relación simbiótica. Se ha descrito también el diferencial efecto sobre las propiedades ópticas de los corales de los cambios en la pigmentación asociados a los cambios en el número de simbiontes o al contenido celular de estos. Este enfoque morfo-funcional está en la línea del propuesto por Madin et al. (2016), pero se diferencia de éste en que el análisis que se propone está basado en un

buen número de descriptores específicos de los corales simbióticos, pero también en otros de carácter universal y con un explicativo muy importante en ecología funcional como son los descriptores ópticos, pero lamentablemente no todavía suficientemente atendidos. En este sentido, este estudio ha permitido caracterizar dos fenotipos estacionales, uno que se desarrolla en el invierno y otro en el verano, y comunes para las cuatro especies de coral examinadas. También se ha podido determinar la diferente sensibilidad de cada fenotipo y de cada especie a un estrés térmico y lumínico similar inducido experimentalmente. Estos resultados se han publicado ya en la revista *Scientific Reports* (Scheufen et al. 2017b). La variabilidad encontrada en los descriptores estructurales y funcionales de las cuatro especies investigadas, pero sobre todo su poder explicativo de la condición fisiológica de la simbiosis soporta el potencial de este análisis morfo-funcional para entender diferencias claves entre especies, poblaciones y/o fenotipos de coral, tanto relacionadas con su ajuste ambiental como también con las ventajas y/o limitaciones que estos cambios confieren al holobionte, y a cada miembro de la asociación mutualista. Este potencial se ha analizado en profundidad en el artículo de Scheufen et al. (2017a), publicado en *Frontiers in Marine Sciences*. Los dos artículos han sido publicados en revistas Open Access, lo que les ha permitido una gran difusión y visibilidad como lo demuestra el número de lecturas, pero también el número de citas recibidas a pesar de ser tan recientes.

Una de las contribuciones más importantes de este estudio es que por primera vez se realiza un estudio comparativo de la variación de las propiedades ópticas de los corales escleractíneos, y su relación con la variación de su pigmentación y de dos de los descriptores estructurales claves que regulan esta variación. Es por tanto, una novedosa aproximación morfo-funcional aplicada por primera vez en corales con la intención de dilucidar el potencial explicativo de las propiedades ópticas sobre la fisiología fotosintética de los corales y su diferente sensibilidad al estrés térmico y lumínico. La complejidad de abordar este tipo de estudios ópticos en estructuras tan complejas como los corales escleractíneos podría explicar el retraso en el desarrollo de esta línea de

estudio, pero no justifica la escasa atención que se le ha prestado hasta ahora a una propiedad funcional fundamental de los productores primarios como es la regulación de la entrada de energía lumínica que es utilizada en fijar carbono orgánico a través de la fotosíntesis. En los corales simbióticos y mucho otros productores primarios calificadores, esta propiedad también es clave para mantener el proceso de calcificación y, por tanto, el crecimiento del esqueleto de corales como de diferentes macroalgas. Para estimular la incorporación de la determinación y análisis de estos descriptores ópticos organismos pluricelulares complejos, se ha publicado en una de las revistas que cuenta con un gran reconocimiento en fisiología vegetal como es *Photosynthesis Research* un artículo metodológico con el esfuerzo conjunto de todo el laboratorio de la Dra. Enríquez (Vásquez-Elizondo et al. 2017) que explica cómo determinar cada parámetro y da pautas sobre cómo resolver los problemas técnicos más comunes que se generan durante estas determinaciones ópticas. El estudio explica no sólo cómo producir espectros de transmisión de luz y de reflectancia de suficiente calidad, sino cómo reconocer errores claves en los espectros generados que cuestionan fuertemente la determinación de los descriptores ópticos.

El análisis óptico realizado en este estudio y la propuesta de su mayor implementación en el estudio del arrecife de coral no cuestiona la utilidad de otras aproximaciones que ya se están realizando como son las caracterizaciones a micro-escala de la variación del campo lumínico *in hospite* de los simbioses (ver Kühl et al. 1995; Wangpraseurt et al. 2012; Wangpraseurt et al. 2014b; Wangpraseurt et al. 2016; Brodersen et al. 2014). Esta aproximación es una herramienta muy útil para entender cómo varía el campo lumínico local de los simbioses en función de los cambios en la morfología de la especie, pero también de la pigmentación de tejido vivo. Con este enfoque se han documentado por ejemplo la presencia de gradientes de luz dentro del tejido de coral (Wangpraseurt et al. 2012) y transferencias laterales de la luz (Wangpraseurt et al. 2014a). Sin embargo, la extrapolación del efecto de esta variabilidad local sobre las propiedades funcionales de la estructura completa no es tan obvia, por lo que la aproximación a micro-escala es

complementaria y no puede sustituir a las determinaciones ópticas y fisiológicas de la estructura completa. Más aún, estas descripciones necesitan también de otras caracterizaciones ópticas para poder explicar la variabilidad documentada. Por ejemplo, caracterizaciones ópticas del esqueleto de coral como las documentadas por Terán et al. (2010), Marcelino et al. (2013), Enríquez et al. (2017), y Vásquez-Elizondo et al. (2017), así como caracterizaciones ópticas de los simbiositos (Iglesias-Prieto y Trench 1994; Hennige et al. 2008; Hennige et al. 2009) son claves para entender la respuesta integral de la estructura completa, como la documentada por Enríquez et al. (2005) y en este estudio, publicada ya en Scheufen et al. (2017b; 2017a). Sin embargo, las especiales características de las propiedades ópticas de los corales indican que como propiedades emergentes de la estructura completa que no son fáciles de derivar desde la simple integración de las propiedades funcionales de todas sus partes. Más estudios comparativos del tipo del realizado en el marco de esta tesis doctoral son necesarios para entender el efecto integral de los cambios en pigmentación sobre la óptica y sobre la actividad fotosintética de los corales, pero, sobre todo, la diversidad de respuestas y de características funcionales que se encuentran en la comunidad arrecifal. Nuestro estudio ha aportado por primera vez evidencias sólidas de que las propiedades ópticas de la unidad completa coral-alga-esqueleto juegan un papel central en la determinación de diferencias funcionales claves entre los corales simbióticos, y pueden explicar diferencias fundamentales en el desempeño y habilidades competitivas entre especies, poblaciones y fenotipos de coral.

## 5.1 Literatura citada

- Brodersen KE, Lichtenberg M, Ralph PJ, Kühl M, Wangpraseurt D (2014) Radiative energy budget reveals high photosynthetic efficiency in symbiont-bearing corals. *J R Soc Interface* 11, 20130997
- Brown BE, Dunne RP, Ambarsari I, Le Tissier MDA, Satapoomin U (1999) Seasonal fluctuations in environmental factors and variations in symbiotic algae and

chlorophyll pigments in four Indo-Pacific coral species. *Mar Ecol Prog Ser* 191, 53-69

- Enríquez S, Méndez ER, Iglesias-Prieto R (2005) Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. *Limnol Oceanogr* 50, 1025-1032
- Enríquez S, Méndez ER, Hoegh-Guldberg O, Iglesias-Prieto R (2017) Key functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. *Proc R Soc B* 284, 20161667
- Fagoonee I, Wilson HB, Hassell MP, Turner JR (1999) The dynamics of zooxanthellae populations: A long-term study in the field. *Science* 283, 843-845
- Fitt WK, McFarland FK, Warner ME, Chilcoat GC (2000) Seasonal patterns of tissue biomass and densities of symbiotic dinoflagellates in reef corals and relation to coral bleaching. *Limnol Oceanogr* 45, 677-685
- Hennige SJ, Suggett DJ, Warner ME, McDougall KE, Smith DJ (2009) Photobiology of Symbiodinium revisited: bio-physical and bio-optical signatures. *Coral Reefs* 28, 179-195
- Hennige SJ, Suggett DJ, Warner ME, McDougall K, Smith D (2008) Unravelling coral photoacclimation: Symbiodinium strategy and host modification. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium*
- Iglesias-Prieto R, Trench RK (1994) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Marine ecology progress series* 113, 163-175
- Kemp DW, Thornhill DJ, Rotjan RD, Iglesias-Prieto R, Fitt WK, Schmidt GW (2015) Spatially distinct and regionally endemic Symbiodinium assemblages in the threatened Caribbean reef-building coral *Orbicella faveolata*. *Coral Reefs* 34, 535-547
- Kühl M, Cohen Y, Dalsgaard T, Jørgensen BB, Revsbech NP (1995) Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleratinian corals studied with microsensors for O<sub>2</sub>, pH and light. *Mar Ecol Prog Ser* 117, 159-172
- LaJeunesse TC, Parkinson JE, Gabrielson PW, Jeong HJ, Reimer JD, Voolstra CR, Santos SR (2018) Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Curr Biol* 28, 2570-2580.e6
- LaJeunesse TC (2002) Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology* 141, 387-400
- Madin JS, Hoogenboom MO, Connolly SR, Darling ES, Falster DS, Huang D, Keith SA, Mizerek T, Pandolfi JM, Putnam HM, Baird AH (2016) A Trait-Based Approach to Advance Coral Reef Science. *Trends Ecol Evol*
- Marcelino LA, Westneat MW, Stoyneva V, Henss J, Rogers JD, Radosevich A, Turzhitsky V, Siple M, Fang A, Swain TD, Fung J, Backman V (2013) Modulation of light-enhancement to symbiotic algae by light-scattering in corals and evolutionary trends in bleaching. *PLoS One* 8, e61492

- Scheufen T, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017a) Changes in the Number of Symbionts and Symbiodinium Cell Pigmentation Modulate Differentially Coral Light Absorption and Photosynthetic Performance. *Front Mar Sci* 4, 17
- Scheufen T, Krämer WE, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017b) Seasonal variation modulates coral sensibility to heat-stress and explains annual changes in coral productivity. *Sci Rep* 7, 601
- Terán E, Méndez ER, Enríquez S, Iglesias-Prieto R (2010) Multiple light scattering and absorption in reef-building corals. *Appl Opt* 49, 5032-5042
- Vásquez-Elizondo RM, Legaria-Moreno L, Pérez-Castro MÁ, Krämer WE, Scheufen T, Iglesias-Prieto R, Enríquez S (2017) Absorptance determinations on multicellular tissues. *Photosynthesis Research* 3, 311-324
- Wangpraseurt D, Jacques SL, Petrie T, Kühl M (2016) Monte Carlo Modeling of Photon Propagation Reveals Highly Scattering Coral Tissue. *Front Plant Sci* 7, 1404
- Wangpraseurt D, Larkum AW, Franklin J, Szabó M, Ralph PJ, Kühl M (2014a) Lateral light transfer ensures efficient resource distribution in symbiont-bearing corals. *J Exp Biol* 217, 489-498
- Wangpraseurt D, Larkum AW, Ralph PJ, Kühl M (2012) Light gradients and optical microniches in coral tissues. *Front Microbiol* 3, 316
- Wangpraseurt D, Polerecky L, Larkum AWD, Ralph PJ, Nielsen DA, Pernice M, Kühl M (2014b) The in situ light microenvironment of corals. *Limnol Oceanogr* 59, 917-926

## 1 Capítulo 6 – Anexos

## 2 6.1 Anexo A

**Tabla 6.1 Valores promedios de los descriptores en el invierno**

Valores promedios  $\pm$  ES de todos los descriptores del fenotipo de invierno. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de temperatura dentro de cada especie (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$ , Tukey Post-hoc  $P < 0.05$ )

		Día 0		Día 10	
		28°C	28°C	30°C	32°C
Densidad de clorofila a (mg Chl a m <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	94 $\pm$ 22 <sup>a</sup>	85 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	69 $\pm$ 9 <sup>a/b</sup>	33 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
	<i>O. faveolata</i>	73 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 5 <sup>a</sup>	40 $\pm$ 8 <sup>b</sup>	38 $\pm$ 8 <sup>b</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	139 $\pm$ 8 <sup>a/b</sup>	181 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	142 $\pm$ 14 <sup>a/b</sup>	103 $\pm$ 2 <sup>b</sup>
	<i>P. strigosa</i>	86 $\pm$ 4 <sup>a/b</sup>	112 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	65 $\pm$ 5 <sup>b/c</sup>	47 $\pm$ 8 <sup>c</sup>
Densidad de simbioses (x10 <sup>6</sup> cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	3.31 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	2.65 $\pm$ 0.29 <sup>a/b</sup>	2.23 $\pm$ 0.33 <sup>a/b</sup>	1.25 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>
	<i>O. faveolata</i>	1.9 $\pm$ 0.29 <sup>a/b</sup>	2.46 $\pm$ 0.17 <sup>a</sup>	1.6 $\pm$ 0.21 <sup>a/b</sup>	1.39 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	2 $\pm$ 0.1	1.82 $\pm$ 0.4	1.59 $\pm$ 0.16	1.41 $\pm$ 0.13
	<i>P. strigosa</i>	1.64 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	1.74 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	1.38 $\pm$ 0.07 <sup>a/b</sup>	1.13 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>
Ci (pg Chl a Simbionte <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	2.94 $\pm$ 0.21	3.39 $\pm$ 0.41	3.14 $\pm$ 0.09	2.63 $\pm$ 0.14
	<i>O. faveolata</i>	3.94 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	3.31 $\pm$ 0.27 <sup>b/c</sup>	2.49 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	2.83 $\pm$ 0.37 <sup>b/c</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	7 $\pm$ 0.38	9.49 $\pm$ 0.63	7.73 $\pm$ 0.88	7.11 $\pm$ 0.83
	<i>P. strigosa</i>	5.66 $\pm$ 1	6.38 $\pm$ 0.76	4.69 $\pm$ 0.26	4.11 $\pm$ 0.64
Proteínas solubles por área (mg Proteína cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	3.85 $\pm$ 0.83	4.03 $\pm$ 0.72	5.6 $\pm$ 0.49	4.66 $\pm$ 1.2
	<i>O. faveolata</i>	7.9 $\pm$ 0.8	6.06 $\pm$ 1.08	5.89 $\pm$ 0.66	7.41 $\pm$ 1.16
	<i>M. cavernosa</i>	14.84 $\pm$ 2.23	13.86 $\pm$ 3.94	15.1 $\pm$ 2.38	8 $\pm$ 1.81

	<i>P. strigosa</i>	7.06 ± 0.92	7.53 ± 1.5	4.21 ± 1.14	7.63 ± 1.85
Simbiontes por masa del hospedero (#Simbiontes ng Proteína <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	0.83 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.13 <sup>a/b</sup>	0.4 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.16 <sup>b</sup>
	<i>O. faveolata</i>	0.33 ± 0.06 <sup>a/b</sup>	0.46 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.28 ± 0.04 <sup>a/b</sup>	0.2 ± 0.03 <sup>b</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.21 ± 0.04
	<i>P. strigosa</i>	0.26 ± 0.06	0.28 ± 0.06	0.43 ± 0.1	0.2 ± 0.08
P <sub>max</sub> (μmol O <sub>2</sub> cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	2.52 ± 0.16 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.21 <sup>b</sup>	2.51 ± 0.16 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.28 <sup>a</sup>
	<i>O. faveolata</i>	2.37 ± 0.3	3.4 ± 0.18	2.99 ± 0.25	2.44 ± 0.14
	<i>M. cavernosa</i>	2.16 ± 0.23	1.62 ± 0.19	1.57 ± 0.18	1.65 ± 0.14
	<i>P. strigosa</i>	2.55 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.14 <sup>a/b</sup>	1.65 ± 0.14 <sup>b/c</sup>	1.15 ± 0.34 <sup>c</sup>
P <sub>sym</sub> (pmol O <sub>2</sub> Simbionte <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	1.06 ± 0.33	1.31 ± 0.14	1.22 ± 0.17	1.53 ± 0.25
	<i>O. faveolata</i>	0.91 ± 0.11	1.43 ± 0.17	1.97 ± 0.27	2.33 ± 0.77
	<i>M. cavernosa</i>	1.08 ± 0.11	1.19 ± 0.22	1 ± 0.1	1.24 ± 0.11
	<i>P. strigosa</i>	1.65 ± 0.23	1.23 ± 0.11	1.22 ± 0.14	0.98 ± 0.32
P <sub>M</sub> (μmol O <sub>2</sub> Proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	0.81 ± 0.2	0.94 ± 0.17	0.46 ± 0.03	0.78 ± 0.11
	<i>O. faveolata</i>	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.06	0.52 ± 0.06	0.47 ± 0.17
	<i>M. cavernosa</i>	0.15 ± 0.02	0.17 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.2 ± 0.05
	<i>P. strigosa</i>	0.39 ± 0.07	0.34 ± 0.08	0.47 ± 0.07	0.21 ± 0.12

**Tabla 6.2 ANOVA de una vía del efecto de la temperatura en marzo 2011**

ANOVA de una vía del efecto de los tratamiento de temperaturas en marzo 2011 sobre los descriptores diferentes del fenotipo de invierno de las cuatro especies investigadas.

Parámetro	Especie	df	SM	F	P
Densidad de clorofila a (mg Chla m <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,16	10981.85	4.823	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	3,16	7125.535	8.611	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	3,16	15235.19	3.3	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	3,16	11705.79	9.349	<0.05
Densidad de simbiontes (x10 <sup>6</sup> cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,16	11.137	3.578	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	3,16	3.237	3.736	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	3,16	1.004	1.254	0.323
	<i>P. strigosa</i>	3,16	1.103	4.971	<0.05
Ci (pg Chla Simbionte <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,16	1.518	1.705	0.206
	<i>O. faveolata</i>	3,16	5.934	3.373	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	3,14	16.934	2.572	0.096
	<i>P. strigosa</i>	3,16	15.229	1.974	0.159
Proteínas solubles por área (mg Proteína cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,15	9.307	1.005	0.418
	<i>O. faveolata</i>	3,16	6.969	0.47	0.707
	<i>M. cavernosa</i>	3,16	167.748	1.518	0.248
	<i>P. strigosa</i>	3,16	39.123	1.335	0.298
Simbiontes por masa del hospedero (#Simbiontes ng Proteína <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,15	0.76	4.844	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	3,16	0.18	3.632	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	3,16	0.026	1.654	0.217
	<i>P. strigosa</i>	3,16	0.133	1.461	0.263
P <sub>max</sub> (μmol O <sub>2</sub> cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,14	3.684	7.371	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	3,14	1.923	2.188	0.135
	<i>M. cavernosa</i>	3,13	1.116	2.1	0.15
	<i>P. strigosa</i>	3,15	4.875	9.86	<0.05
P <sub>sym</sub> (pmol O <sub>2</sub> Simbionte <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,14	0.428	0.559	0.651
	<i>O. faveolata</i>	3,14	2.085	1.683	0.216
	<i>M. cavernosa</i>	3,13	0.135	0.54	0.663
	<i>P. strigosa</i>	3,15	1.076	1.826	0.186
P <sub>M</sub> (μmol O <sub>2</sub> Proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	3,13	0.625	1.866	0.185
	<i>O. faveolata</i>	3,14	0.045	0.414	0.746
	<i>M. cavernosa</i>	3,13	0.015	0.8	0.516
	<i>P. strigosa</i>	3,15	0.153	1.601	0.231

**Tabla 6.3 Valores promedios de los descriptores en el verano**

Valores promedios  $\pm$  ES de todos los descriptores del fenotipo de verano. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de temperatura dentro de cada especie (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$ , Tukey Post-hoc  $P < 0.05$ )

		Día 0		Día 10		Día 20		
		28°C	28°C	30°C	32°C	28°C	30°C	32°C
Densidad de clorofila a (mg Chla m <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	80 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	99 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	105 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	66 $\pm$ 30 <sup>a/b</sup>	110.01 $\pm$ 11.6 <sup>a</sup>	107.15 $\pm$ 3.17 <sup>a</sup>	29.78 $\pm$ 5.01 <sup>b</sup>
	<i>O. faveolata</i>	145 $\pm$ 4 <sup>a/b</sup>	151 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	141 $\pm$ 11 <sup>a/b</sup>	92 $\pm$ 26 <sup>b/c</sup>	169.3 $\pm$ 3.31 <sup>a</sup>	126.92 $\pm$ 4.14 <sup>a/b</sup>	49.99 $\pm$ 5.98 <sup>c</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	101 $\pm$ 4 <sup>a/c</sup>	131 $\pm$ 25 <sup>a/b</sup>	136 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	71 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	129.3 $\pm$ 4.9 <sup>a/b</sup>	123.33 $\pm$ 8.6 <sup>a/b</sup>	12.13 $\pm$ 1.29 <sup>d</sup>
	<i>P. strigosa</i>	59 $\pm$ 4 <sup>a</sup>	72 $\pm$ 5 <sup>a/b</sup>	101 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	51 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	103.7 $\pm$ 10.36 <sup>b</sup>	88.13 $\pm$ 6.55 <sup>b</sup>	10.9 $\pm$ 2.27 <sup>c</sup>
Densidad de simbioses (x10 <sup>6</sup> cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	2.03 $\pm$ 0.19 <sup>a/b</sup>	2.10 $\pm$ 0.13 <sup>a/b</sup>	2.31 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	1.13 $\pm$ 0.52 <sup>b/c</sup>	2.3 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.06 $\pm$ 0.21 <sup>a/b</sup>	0.55 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>
	<i>O. faveolata</i>	3.36 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	3.3 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	2.71 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	1.59 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	3.48 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>	2.68 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>	0.79 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	1.79 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	2.02 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.87 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	1.41 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	1.78 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>
	<i>P. strigosa</i>	1.26 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	1.51 $\pm$ 0.19 <sup>a/b</sup>	2.1 $\pm$ 0.48 <sup>b/c</sup>	1.08 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	2.12 $\pm$ 0.19 <sup>b/c</sup>	2.41 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	0.19 $\pm$ 0.03 <sup>d</sup>
Ci (pg Chla Simbionte <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	3.88 $\pm$ 0.26	4.68 $\pm$ 0.08	4.39 $\pm$ 0.5	5.76 $\pm$ 0.15	4.79 $\pm$ 0.29	5.42 $\pm$ 0.53	6.39 $\pm$ 0.61
	<i>O. faveolata</i>	4.32 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	4.66 $\pm$ 0.36 <sup>a/b</sup>	5.33 $\pm$ 0.51 <sup>a/b</sup>	5.55 $\pm$ 0.63 <sup>a/b</sup>	4.9 $\pm$ 0.23 <sup>a/b</sup>	4.76 $\pm$ 0.19 <sup>a/b</sup>	6.34 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	5.89 $\pm$ 0.61	6.5 $\pm$ 0.79	7.37 $\pm$ 0.96	5.27 $\pm$ 0.74	6.8 $\pm$ 0.24	7.06 $\pm$ 0.36	6.48 $\pm$ 0.48
	<i>P. strigosa</i>	4.8 $\pm$ 0.36	4.98 $\pm$ 0.94	5.41 $\pm$ 1.36	4.62 $\pm$ 0.47	4.93 $\pm$ 0.31	3.67 $\pm$ 0.23	6.45 $\pm$ 1
Proteínas solubles por área (mg Proteína cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	4.1 $\pm$ 0.32 <sup>a/b</sup>	3.24 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	4.5 $\pm$ 0.97 <sup>a/b</sup>	7.7 $\pm$ 1.32 <sup>c</sup>	4.36 $\pm$ 0.37 <sup>a/b</sup>	5.52 $\pm$ 0.58 <sup>a/c</sup>	3.36 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>
	<i>O. faveolata</i>	6.3 $\pm$ 0.58	7.2 $\pm$ 1.4	4.95 $\pm$ 0.98	8.72 $\pm$ 1.98	5.27 $\pm$ 0.81	6.1 $\pm$ 0.59	6.09 $\pm$ 0.28
	<i>M. cavernosa</i>	10.81 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	7.84 $\pm$ 0.87 <sup>a/b/c</sup>	8.79 $\pm$ 0.93 <sup>a/b/c</sup>	14.11 $\pm$ 0.21 <sup>d</sup>	9.22 $\pm$ 0.18 <sup>a/b</sup>	7.56 $\pm$ 0.8 <sup>b/c</sup>	6.53 $\pm$ 0.32 <sup>c</sup>
	<i>P. strigosa</i>	5.68 $\pm$ 0.6	6.17 $\pm$ 0.79	5.25 $\pm$ 0.38	6.91 $\pm$ 0.2	5.12 $\pm$ 0.73	4.86 $\pm$ 0.64	4.45 $\pm$ 0.43
Simbioses por masa del hospedero (#Simbioses ng Proteína <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	0.49 $\pm$ 0.01 <sup>a/b</sup>	0.65 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.06 <sup>a/b</sup>	0.13 $\pm$ 0.05 <sup>c</sup>	0.54 $\pm$ 0.06 <sup>a/b</sup>	0.39 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.17 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>
	<i>O. faveolata</i>	0.55 $\pm$ 0.05 <sup>a/b</sup>	0.47 $\pm$ 0.05 <sup>a/b/c</sup>	0.56 $\pm$ 0.03 <sup>a/b</sup>	0.21 $\pm$ 0.08 <sup>c/d</sup>	0.73 $\pm$ 0.12 <sup>a</sup>	0.45 $\pm$ 0.04 <sup>b/c</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	0.17 $\pm$ 0.02 <sup>a/b</sup>	0.27 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.02 <sup>b/c</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0 <sup>c</sup>

Implicaciones funcionales de la variación de la pigmentación de corales simbióticos. Scheufen T 2019

	<i>P. strigosa</i>	0.23±0.02 <sup>a/b/c</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>a/b/c/d</sup>	0.41 ± 0.1 <sup>d</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>b/c</sup>	0.46 ± 0.08 <sup>a/d</sup>	0.54 ± 0.09 <sup>d</sup>	0.05 ± 0.01 <sup>c</sup>
P <sub>max</sub> (μmol O <sub>2</sub> cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	5.25 ± 0.58 <sup>a</sup>	3.91 ± 0.39 <sup>a/b</sup>	4.21 ± 0.18 <sup>a/b</sup>	2.37 ± 1.13 <sup>b/c</sup>	3.91 ± 0.39 <sup>a/b</sup>		0.54 ± 0.33 <sup>c</sup>
	<i>O. faveolata</i>	5.71 ± 0.53 <sup>a</sup>	3.24 ± 0.14 <sup>b</sup>	5.15 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.13 ± 0.72 <sup>b/c</sup>	3.24 ± 0.14 <sup>b</sup>		0.73 ± 0.09 <sup>c</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	3.48 ± 0.09 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.47 <sup>a/b</sup>	2.73 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.09 <sup>c</sup>	3.24 ± 0.14 <sup>a/b</sup>		0.1 ± 0.03 <sup>c</sup>
	<i>P. strigosa</i>	4.5 ± 0.43 <sup>a</sup>	3.14 ± 0.27 <sup>b</sup>	3.02 ± 0 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.31 <sup>c</sup>	3.14 ± 0.27 <sup>b</sup>		0.22 ± 0.08 <sup>c</sup>
P <sub>sym</sub> (pmol O <sub>2</sub> Simbionte <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	2.57 ± 0.07	1.86 ± 0.15	1.9 ± 0.26	1.73 ± 0.63	1.75 ± 0.16		1.64 ± 1.04
	<i>O. faveolata</i>	1.72 ± 0.21	1.01 ± 0.1	1.96 ± 0.2	1.25 ± 0.28	0.94 ± 0.04		1.72 ± 0.5
	<i>M. cavernosa</i>	2.04 ± 0.22 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.13 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.65 ± 0.11 <sup>a</sup>		0.52 ± 0.11 <sup>b</sup>
	<i>P. strigosa</i>	3.69 ± 0.48 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.47 <sup>a/b</sup>	1.63 ± 0.42 <sup>b</sup>	1.34 ± 0.32 <sup>b</sup>	1.54 ± 0.15 <sup>b</sup>		1.06 ± 0.51 <sup>b</sup>
P <sub>M</sub> (μmol O <sub>2</sub> Proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	1.27 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.25 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.08 <sup>a</sup>		0.16 ± 0.08 <sup>b</sup>
	<i>O. faveolata</i>	0.95 ± 0.17 <sup>a</sup>	0.48 ± 0.07 <sup>a/b</sup>	1.1 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.11 <sup>a/b</sup>		0.13 ± 0.004 <sup>b</sup>
	<i>M. cavernosa</i>	0.32 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.006 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>		0.02 ± 0.01 <sup>b</sup>
	<i>P. strigosa</i>	0.83 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>a/b/c</sup>	0.58 ± 0.05 <sup>a/b</sup>	0.2 ± 0.04 <sup>b/c</sup>	0.68 ± 0.12 <sup>a</sup>		0.05 ± 0.02 <sup>c</sup>

**Tabla 6.4 ANOVA de una vía del efecto de la temperatura en octubre 2011**

ANOVA de una vía del efecto de los tratamiento de temperaturas en octubre 2011 sobre los descriptores diferentes del fenotipo de verano de las cuatro especies investigadas.

		df	SM	F	P
Densidad de clorofila a (mg Chla m <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	6,31	45745.05	12	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	6,34	93885.73	30.471	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	6,36	124364.9	90.22	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	6,23	32450.04	29.26	<0.05
Densidad de simbioses (x10 <sup>6</sup> cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	6,29	21.162	19.36	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	6,34	54.133	48.375	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	6,36	27.641	51.238	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	6,24	19.756	26.846	<0.05
Ci (pg Chla Simbionte <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	6,29	28.888	2.075	0.087
	<i>O. faveolata</i>	6,34	24.905	3.688	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	6,36	10.755	0.626	0.709
	<i>P. strigosa</i>	6,23	22.696	1.629	0.184
Proteínas solubles por área (mg Proteína cm <sup>-2</sup> )	<i>O. annularis</i>	6,31	58.933	8.333	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	6,34	31.351	1.976	0.097
	<i>M. cavernosa</i>	6,36	200.202	19.172	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	6,24	17.005	1.774	0.147
Simbioses por masa del hospedero (#Simbioses ng Proteína <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	6,29	1.242	20.215	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	6,34	2.04	26.34	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	6,36	0.364	31.244	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	6,24	0.997	10.156	<0.05
P <sub>max</sub> (μmol O <sub>2</sub> cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	5,15	45.332	10.102	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	5,15	56.77	24.954	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	5,16	33.296	66.304	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	5,16	41.276	28.138	<0.05
P <sub>sym</sub> (pmol O <sub>2</sub> Simbionte <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	5,14	2.126	1.054	0.426
	<i>O. faveolata</i>	5,15	3.246	3.458	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	5,16	6.572	13.41	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	5,16	19.866	6.682	<0.05
P <sub>M</sub> (μmol O <sub>2</sub> Proteína <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	<i>O. annularis</i>	5,15	3.695	14.242	<0.05
	<i>O. faveolata</i>	5,15	2.264	7.736	<0.05
	<i>M. cavernosa</i>	5,16	0.425	20.424	<0.05
	<i>P. strigosa</i>	5,16	1.57	7.927	<0.05

**Tabla 6.5 Valores promedios Fv/Fm**

Valores promedios  $\pm$  ES de Fv/Fm de la respuesta al estrés térmico en el invierno y verano. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de temperatura dentro de cada especie (ANOVA de una vía,  $P < 0.05$ , Tukey Post-hoc  $P < 0.05$ ).

		Marzo				Octubre			
		<i>O. annularis</i>	<i>O. faveolata</i>	<i>M. cavernosa</i>	<i>P. strigosa</i>	<i>O. annularis</i>	<i>O. faveolata</i>	<i>M. cavernosa</i>	<i>P. strigosa</i>
Día 0	28°C	0.61 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.64 $\pm$ 0.01 <sup>a/b/c</sup>	0.66 $\pm$ 0.01 <sup>a/b</sup>	0.64 $\pm$ 0.001 <sup>a/b</sup>	0.62 $\pm$ 0.01 <sup>a/b</sup>
Día 6	28°C					0.63 $\pm$ 0.01 <sup>a/b/c</sup>	0.65 $\pm$ 0.01 <sup>a/b/c</sup>	0.62 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.61 $\pm$ 0.01 <sup>a/b</sup>
	30°C					0.61 $\pm$ 0.01 <sup>b/c</sup>	0.62 $\pm$ 0.001 <sup>b/c</sup>	0.59 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.58 $\pm$ 0.01 <sup>b/c</sup>
	32°C					0.53 $\pm$ 0.02 <sup>d/e</sup>	0.54 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>
Día 10	28°C	0.58 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.01 <sup>a/b</sup>	0.62 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.62 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.68 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.69 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.67 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
	30°C	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.59 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.57 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.59 $\pm$ 0.001 <sup>c</sup>	0.65 $\pm$ 0.01 <sup>a/b</sup>	0.67 $\pm$ 0.01 <sup>a/b</sup>	0.63 $\pm$ 0.001 <sup>a/b</sup>	0.63 $\pm$ 0.001 <sup>a/b</sup>
	32°C	0.4 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.47 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.53 $\pm$ 0.001 <sup>d</sup>	0.59 $\pm$ 0.02 <sup>c/d</sup>	0.59 $\pm$ 0.03 <sup>c/d</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.55 $\pm$ 0.01 <sup>c/d</sup>
Día 20	28°C					0.64 $\pm$ 0.01 <sup>a/b/c</sup>	0.65 $\pm$ 0.01 <sup>a/b/c</sup>	0.63 $\pm$ 0.001 <sup>a/b</sup>	0.61 $\pm$ 0.001 <sup>a/b</sup>
	30°C								
	32°C					0.5 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.48 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup>	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	0.35 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup>

**Tabla 6.6 ANOVA de dos vías de la variación de Fv/Fm en marzo y octubre**

		Marzo				Octubre			
		Sum Sq	Df	F value	P	Sum Sq	Df	F value	P
<i>O. annularis</i>	Intercepto	0.109	1	41.752	<0.01	0.174	1	54.632	<0.01
	Día	0.145	1	55.73	<0.01	0.056	1	17.569	<0.01
	Temperatura	0.002	1	0.704	0.403	0.014	1	4.356	<0.05
	Día x Temperatura	0.0175	1	67.183	<0.01	0.062	1	19.573	<0.01
	Residuales	0.381	146			0.554	174		
<i>O. faveolata</i>	Intercepto	0.099	1	37.64	<0.01	0.2	1	48.506	<0.01
	Día	0.111	1	42.108	<0.01	0.104	1	25.182	<0.01
	Temperatura	0.0001	1	0.052	0.82	0.011	1	2.672	0.104
	Día x Temperatura	0.131	1	49.634	<0.01	0.119	1	28.868	<0.01
	Residuales	0.383	145			0.882	214		
<i>M. cavernosa</i>	Intercepto	0.123	1	94.076	<0.01	0.089	1	29.176	<0.01
	Día	0.19	1	145.386	<0.01	0.829	1	272.657	<0.01
	Temperatura	0.002	1	1.477	0.226	0.003	1	0.898	0.344
	Día x Temperatura	0.226	1	172.219	<0.01	0.938	1	308.746	<0.01
	Residuales	0.191	146			0.69	227		
<i>P. strigosa</i>	Intercepto	0.102	1	743.094	<0.01	0.079	1	56.957	<0.01
	Día	0.033	1	243.96	<0.01	0.101	1	73.272	<0.01
	Temperatura	0.0004	1	2.98	0.086	0.003	1	1.87	0.174
	Día x Temperatura	0.041	1	297.866	<0.01	0.114	1	82.097	<0.01
	Residuales	0.02	146			0.144	104		