



UNIVERSIDAD DEL MAR

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

USO DE *Cassiopea cf. xamachana* PARA EVALUAR LOS EFECTOS DE
LA TEMPERATURA y pH EN INTERACCIONES CNIDARIO-
SYMBIODINIACEAE

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS: ECOLOGÍA MARINA

PRESENTA

Biol. Mar. Gloria Lorena Velásquez Mejía

DIRECTOR

Dr. Rolando Cardeña López

CODIRECTORA

Dra. Tania Islas Flores

Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2022

RESUMEN

Las interacciones simbióticas entre cnidario-Symbiodiniaceae son susceptibles a factores estresantes como el incremento de la temperatura y la acidificación en el océano, lo cual puede tener como consecuencia una disociación de la simbiosis que puede resultar letal para los organismos. Dada su importancia ecológica los corales formadores de arrecifes han sido el grupo de cnidarios más estudiado, no obstante, trabajar con ellos en laboratorio presenta ciertas desventajas por lo que se ha propuesto a la medusa invertida *Cassiopea* cf. *xamachana* como modelo para estudiar las interacciones con *Symbiodinium*, que debido a su ciclo de vida es fácil de manejar y cultivar en condiciones de laboratorio, además entabla una endosimbiosis con *Symbiodinium microadriaticum*. Con base en esto, se probó el efecto de distintas combinaciones de temperaturas (29, 32 y 34 °C) y pH (8.2, 7.5 y 7.2) en la reinfección de pólipos blanqueados de *C.* cf. *xamachana* con células frescas de *S. microadriaticum*, esperando encontrar una menor cantidad de endosimbionte a una mayor temperatura y menor pH. Primeramente se utilizaron tres métodos (incremento de temperatura, mentol y monosacáridos) y se seleccionó el más eficaz para blanquear 576 pólipos, además, se aislaron células frescas de *S. microadriaticum* que fueron utilizadas para la reinfección bajo las combinaciones de temperatura y pH. Durante estos ensayos, la densidad de simbiontes se cuantificó usando un microscopio de epifluorescencia. Las micrografías, el Modelo Predictivo Multicapa y un análisis de correlación evidenciaron la presencia de endosimbiontes en todos los tratamientos, con condiciones óptimas para obtener una mayor densidad a 29 °C y pH 8.2. Las observaciones mostraron que a medida que incrementa la temperatura y disminuye el pH, la densidad disminuye. Los pólipos presentan una tolerancia a estos factores estresantes, como sucede en otras medusas, lo contrario sucede en los corales formadores de arrecifes que son menos tolerantes. Por tanto, el potencial de *C.* cf. *xamachana*, para realizar inferencias sobre interacciones simbióticas, se restringiría a especies que habitan aguas poco profundas donde el hábitat es similar al de *C.* cf. *xamachana*. No obstante, *C.* cf. *xamachana* se mostró como un modelo muy adecuado para analizar interacciones simbióticas con *Symbiodinium*, permitiendo un monitoreo cuantitativo de la desestabilización y restablecimiento de la simbiosis.

DEDICATORIA

A mi adorada madre Gloria y hermana Alba por ser las personas mas importantes en mi vida así como las que mas admiro, aunque no estemos cerca no hay día que no piense en ustedes.

Con mucho amor...

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Maestría.

Dra. Tania Islas Flores por compartir sus conocimientos y permitirme elaborar mi tema de tesis con ella, muchas gracias por todo.

Dr. Rolando Cardeña López por haber sido parte fundamental durante mi formación académica.

Dr. Marco Antonio Villanueva Méndez por haberme permitido desarrollar el diseño experimental en su laboratorio (Biología Celular y Molecular de Plantas y Organismos Marinos, Instituto de Ciencias del Mar y Limología, Puerto Morelos.

A mis revisores la Dra. Mónica Marcela Galicia Jiménez, Dr. Juan Manuel Villa Hernández el Dr. Francisco Benitez Villalobos por las observaciones brindadas en el presente trabajo.

Dr. Pedro Cervantes Hernández por su apoyo en el procesamiento de los datos.

A mis compañeros de la maestría, especialmente a las chicas.

A Daniel Ortega Rosas por su apoyo y compañía.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO.....	1
2.1 Simbiosis.....	1
2.2 Biología de <i>Symbiodinium</i>	2
2.3 Disociación de la simbiosis.....	3
2.3.1 Incremento de la temperatura y disminución del pH	4
2.3.2 Tolerancia de los cnidarios y endosimbiontes al estrés	7
2.3.3. Inducción de la disociación de la simbiosis mediante experimentos de laboratorio	10
2.3.3.1 Uso de mentol	10
2.3.3.2 Uso de monosacáridos	10
2.4 Importancia de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae.....	11
2.4.1 Importancia de los corales y las limitaciones para su uso en experimentos de laboratorio	12
2.5 Biología de <i>Cassiopea</i> cf. <i>xamachana</i>	13
3. ANTECEDENTES.....	15
4. JUSTIFICACIÓN	16
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS	17
6. OBJETIVOS	17
6.1 Generales.....	17
6.2 Particulares.....	18
7. MATERIALES Y MÉTODOS	18
7.1 Blanqueamiento de pólipos de <i>C. cf. xamachana</i>	18
7.1.1 Tratamiento con incremento de temperatura	18
7.1.2 Tratamiento con mentol	19
7.1.3 Tratamiento con monosacáridos	19
7.2 Aislamiento de células de <i>S. microadriaticum</i> para reinfección de pólipos	20
7.3 Reinfección de los pólipos blanqueados bajo las diferentes combinaciones de temperatura y pH.....	20
7.4 Análisis de datos	21

7.4.1 Red Neuronal	22
8. RESULTADOS Y DISCUSION	24
8.1 Blanqueamiento de pólipos de <i>C. cf. xamachana</i>	24
8.1.1 Tratamiento con aumento de temperatura.....	24
8.1.2 Tratamiento con mentol	27
8.1.3 Tratamiento con monosacáridos	28
8.2 Reinfeción de pólipos de <i>C. cf. xamachana</i>	31
9. CONCLUSIONES	43
10. REFERENCIAS.....	44
11. ANEXOS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo de vida de <i>Cassiopea</i> sp. y adquisición de <i>Symbiodinium</i>	15
Figura 2.- Diseño experimental con las diferentes combinaciones de temperatura y pH.	21
Figura 3.- Diagrama de la metodología utilizada para aislar los píxeles blancos (fluorescencia) en el programa ImagenJ.	22
Figura 4.- Modelo lineal de clasificación neuronal.	23
Figura 5.- Estereomicrografías de pólipos tratados a 37 °C.	25
Figura 6. - Análisis microscópico para determinar el blanqueamiento inducido por mentol y mezcla de sacáridos, por microscopía óptica.	30
Figura 7.- Reinfeción de pólipos blanqueados con monosacáridos a 29 °C y pH 8.2.	32
Figura 8.- Promedios de densidad de endosimbiontes en respuesta a los tratamientos de reinfeción a 29, 32 y 34 °C.	33
Figura 9.- Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfeción de pólipos blanqueados de <i>C. cf. xamachana</i> con <i>S. microadriaticum</i> a 29 °C y bajo el gradiente de pH evaluado.	34
Figura 10.- Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfeción de pólipos blanqueados de <i>C. cf. xamachana</i> con <i>S. microadriaticum</i> a 32 °C y bajo el gradiente de pH evaluado.	35
Figura 11.- Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfeción de pólipos blanqueados de <i>C. cf. xamachana</i> con <i>S. microadriaticum</i> a 34 °C y bajo el gradiente de pH evaluado.	36
Figura 12.- Tendencias en la P(D) para <i>S. microadriaticum</i> , en función de los gradientes experimentales de temperatura y pH.	37

1. INTRODUCCIÓN

La simbiosis cnidario-dinoflagelado representa gran importancia biológica debido a que esta sustenta al ecosistema más biodiverso del mundo, los arrecifes de coral. Además de ser focos de alta biodiversidad, los arrecifes proporcionan otros beneficios al ser barreras naturales contra huracanes, atracciones turísticas, y formadores de arenas blancas, entre otras. Desafortunadamente, en las últimas décadas se ha observado el incremento de eventos de blanqueamiento coralino, ocasionado principalmente por el incremento de la temperatura y disminución del pH como consecuencia de las actividades antropogénicas. Este blanqueamiento ha provocado la pérdida de grandes áreas de arrecife donde, se ha observado una elevada disminución de biodiversidad, además, de que las costas son más susceptibles ante huracanes y elevadas marejadas. Esto ha llevado al estudio de diversas especies de corales y sus endosimbiontes, microalgas dinoflageladas del género *Symbiodinium* que entablan una simbiosis mutualista. Es decir, ambos se proporcionan nutrientes, así como protección que les permite sobrevivir, no obstante, ante un evento de blanqueamiento las células de *Symbiodinium* son expulsadas o pierden su pigmento provocando, que el hospedero disminuya su tamaño, sea más susceptible a enfermedades e inclusive la muerte. Pese a esta importancia, el estudiar los corales presenta inconvenientes por, lo que se han propuesto otras especies de cnidarios como modelo de estudio, por ejemplo, la medusa del género *Cassiopea* que presenta un fácil manejo en laboratorio y al igual que los corales entabla una endosimbiosis con *Symbiodinium*. Una vez que las medusas de *Cassiopea* son blanqueadas disminuyen su tamaño, enferman o mueren, por lo que en el presente trabajo se utilizaron y blanquearon pólipos de esta medusa para simular efectos combinados de distintas temperaturas y pH posterior a su blanqueamiento.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Simbiosis

La simbiosis es la asociación entre dos o más organismos de diferentes especies, esta puede ser permanente cuando los organismos siempre se encuentran asociados, o bien ser de larga duración. Los organismos involucrados en la simbiosis pueden

beneficiarse, ser dañados, o no ser afectados por dicha asociación (Paracer & Ahmadjian 2000).

Los tipos de simbiosis que se pueden encontrar en la naturaleza son: el comensalismo, cuando un organismo se beneficia sin afectar al otro; el mutualismo, en el que ambos organismos se benefician; y el parasitismo en la que un organismo recibe nutrientes a expensas del otro. Un ejemplo de mutualismo es el caso de la simbiosis entre las especies de algas dinoflageladas pertenecientes a la familia Symbiodiniaceae, y cnidarios como corales, anémonas de mar, hidrocorales y medusas. En esta simbiosis mutualista los endosimbiontes transfieren productos fotosintéticos a sus hospederos para cumplir sus necesidades lo, que les permite sobrevivir a ambientes oligotróficos, mientras que el hospedero le proporciona protección y otros nutrientes (Paracer & Ahmadjian 2000, Newkirk *et al.* 2018).

2.2 Biología de *Symbiodinium*

La familia Symbiodiniaceae es un grupo de microalgas dinoflageladas unicelulares fototróficas de color café-amarillento, pertenecen al orden Suessiales y clase Dinophyceae. Históricamente la clasificación del género ha sido controversial dado que son organismos morfológicamente crípticos y morfológicamente similares, llevando muchas veces a nombrarlas erróneamente (Pochon & Gates 2010, LaJeunesse *et al.* 2018).

Recientemente, se llevó a cabo una revisión sistemática de Symbiodiniaceae que proporcionó evidencia de un género divergente y altamente diverso. Considerando datos moleculares, morfológicos, fisiológicos y ecológicos, se propuso que los “clados” del evolutivamente divergente *Symbiodinium* son equivalentes a géneros en la familia Symbiodiniaceae (LaJeunesse *et al.* 2018). Entre estos géneros se encuentran: *Symbiodinium*, *Cladocopium*, *Fugacium*, *Breviolum*, *Durusdinium*, *Gerakladinium*, *Efrenium*; cuyas diferencias están dadas principalmente por las adaptaciones evolutivas que les han permitido habitar distintas regiones, así como entablar simbiosis con diferentes grupos de organismos (LaJeunesse 2017, LaJeunesse *et al.* 2018), entre los que se encuentran los grupos de invertebrados marinos como molusca, platelmintos, porifera, protista, foraminífera y cnidarios (Stat *et al.* 2006, Pochon & Gates 2010). Para efectos prácticos, en la presente tesis se mencionara *Symbiodinium* para referirse a la familia Symbiodiniaceae.

Su reproducción es asexual mediante división celular que da origen a copias clonales de los organismos (Thornhill *et al.* 2017). No obstante, algunos estudios genéticos han evidenciado la existencia de recombinaciones alélicas que sugieren la existencia de reproducción sexual, sobre todo en su estadio de vida libre, dado que cuando se encuentran en estado simbiótico esta recombinación puede afectar la relación con su hospedero (Chi *et al.* 2014, Gierz *et al.* 2017).

En cuanto a su alimentación son organismos mixotróficos, en vida libre son heterótrofos y se alimentan principalmente de diversas bacterias y clases de microalgas (Schnepf & Elbrächter 1992, Jeong *et al.* 2014); mientras que cuando se encuentran entablando una simbiosis, son autótrofos y obtienen los nutrientes a partir de la fotosíntesis, transfiriendo gran parte del carbono (C) a su hospedero, también les transfieren nitrógeno (N) y fósforo (P) que obtienen de fuentes inorgánicas del medio (Kopp *et al.* 2013, Grover *et al.* 2003).

Symbiodinium puede ser adquirido por los hospederos de dos maneras: por transmisión vertical (herencia materna) o transmisión horizontal (adquisición del ambiente), siendo esta última predominante en los corales y medusas (Karako *et al.* 2004, Baird *et al.* 2009). Las células de *Symbiodinium* adquiridas del ambiente entran en contacto con el hospedero por ingestión; una vez dentro del hospedero, *Symbiodinium* es llevado al citoplasma de las células de la gastrodermis de los cnidarios por endocitosis formando el simbiosoma, esta es la razón por la que las células de *Symbiodinium* se encuentran rodeadas por un complejo de membranas de origen algal, más una membrana externa derivada del hospedero (Davy *et al.* 2012). Es importante mencionar que cuando *Symbiodinium* no se encuentra dentro del hospedero, es decir en su fase móvil, desarrolla un flagelo (Karako *et al.* 2004).

2.3 Disociación de la simbiosis

La simbiosis entre Cnidario-Symbiodiniaceae se puede ver afectada por diversos factores estresantes como el aumento de la temperatura, la irradiancia, la acidificación del océano (disminución en el pH), o las enfermedades inducidas por patógenos. Estas alteraciones se relacionan ampliamente con la pérdida de *Symbiodinium*, es decir, la disociación de la simbiosis o la pérdida de pigmentos en *Symbiodinium*, proceso mejor conocido como blanqueamiento (Loram *et al.* 2007, Venn *et al.* 2008, Ganot *et al.* 2011, Fisher *et al.* 2012, Newkirk *et al.* 2018). El término blanqueamiento muchas

veces es confundido con un estado aposimbiótico, en el cual el hospedero ha expulsado todas las células del simbiote como consecuencia de diversos tipos de estrés (Jeon 1977, Wang *et al.* 2012, Lehnert *et al.* 2014, Matthews *et al.* 2016). Mientras que en el blanqueamiento, se puede expulsar gran parte del endosimbionte o bien blanquearse como consecuencia de la pérdida de la pigmentación del simbiote, lo que le da una apariencia blanca pero aún podría conservar parte de la población del endosimbionte y no se puede considerar aposimbiótico.

Entre los mecanismos de expulsión del endosimbionte se encuentran:

- Degradación *in situ*, es la degradación de *Symbiodinium* dentro de las células del hospedero, puede ser causada por la elevada producción de ROS (por sus siglas en inglés: Reactive Oxygen Species). Otra forma es la degradación del simbiote por parte del hospedero, y es un mecanismo utilizado por los cnidarios para regular la población de endosimbiontes (Titlyanov *et al.* 1996, Fujise *et al.* 2014).
- Apoptosis es la muerte celular programada, inducida por la liberación de moléculas de las mitocondrias entre las que se encuentra el citocromo c oxidasa que activará las caspasas, esto puede ser provocado por estímulos del huésped o patógenos microbianos, dicho fenómeno se presenta en cnidarios blanqueados (Strychar *et al.* 2004, Weis 2008, Stambler 2011, Dunn *et al.* 2012).
- Exocitosis, comienza cuando aumentan las concentraciones de Ca^{2+} intracelular (Silverthorn 2008), este mecanismo se ha observado en la anémona *Aiptasia pulchella* en la cual se observaron endosimbiontes entrando y saliendo de sus células (Steen & Muscatine 1987).
- Desprendimiento de la célula huésped, este fenómeno se ha reportado en anémonas y corales blanqueados a bajas y altas temperaturas (Gates *et al.* 1992), este mecanismo puede ser consecuencia de la apoptosis (Weis 2008).
- Necrosis, es el resultado de un daño físico o químico en el que las células del simbiote liberan sustancias tóxicas y enzimas líticas que pueden resultar perjudiciales para el hospedero (Strychar *et al.* 2004).

2.3.1 Incremento de la temperatura y disminución del pH

El creciente incremento de la temperatura y la acidificación en el océano como consecuencia de las actividades antropogénicas traen consigo efectos negativos en la

función y estructura de los ecosistemas marinos (Harley *et al.* 2006). Este es un grave problema, por lo que se han realizado proyecciones para el mar Caribe a futuro que indican que la temperatura incrementará entre 4 y 5 °C (Harley *et al.* 2006, Doney *et al.* 2009, Castillo *et al.* 2018). En muchos organismos estos cambios de temperatura y pH afectan su función dentro del ecosistema e inclusive les pueden ocasionar la muerte. Por ejemplo, diversos grupos de cnidarios como los corales se ven afectados cuando la temperatura aumenta y el pH disminuye ya que esto induce la disociación del endosimbionte, por lo tanto, hay una disminución en la tasa de calcificación, que es altamente dependiente del pH; y en muchas ocasiones cuando el estrés se prolonga, estos mueren (Harley *et al.* 2006).

Las elevadas temperaturas provocan un estrés que afecta las estructuras en muchos de los organismos, así como sus procesos biológicos debido a que en ellos existen límites óptimos y térmicos establecidos que varían de acuerdo con la especie (Somero 2002). En los endosimbiontes este estrés afecta los parámetros fisiológicos como la fotosíntesis, el metabolismo y crecimiento (McGinty *et al.* 2012), que se ve reflejado en una elevada producción de ROS, este puede ser producido por los cloroplastos, las mitocondrias y los peroxisomas, son moléculas del subproducto de la fotosíntesis y respiración celular con propiedades altamente reactivas que en elevadas concentraciones pueden mutar el DNA, desnaturalizar proteínas, así como oxidar los lípidos, proteínas y pigmentos; además regula otros procesos como la apoptosis y la necrosis celular de diversos organismos (Lesser 2006, Weis 2008, McGinty *et al.* 2012, Albright 2018).

El incremento de ROS se debe a la alteración que sufre el aparato fotosintético, el cual tiene como consecuencia una acumulación de electrones que reaccionan con moléculas de O₂, como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻) (Downs *et al.* 2002). El incremento de ROS puede dañar el fotosistema II (PSII) mediante la degradación oxidativa de la proteína D1, afectando los procesos de fijación del C (Warner *et al.* 1999, Lupinková & Komenda 2004, Lesser 2006).

En *Symbiodinium* se ha observado que la producción y cantidad de ROS depende de la especie (McGinty *et al.* 2012, Wietheger *et al.* 2018). También se ha documentado que existe daño celular en los hospederos, y que expulsan al endosimbionte cuando aumenta la producción de ROS teniendo como resultado el blanqueamiento. Dicho blanqueamiento se debe a la susceptibilidad de los lípidos de la membrana de los

tilacoides, específicamente con los elementos que regulan las enzimas que intervienen en la desaturación de ácidos grasos específicos (Tchernov *et al.* 2004).

Así mismo, el incremento de la temperatura y una elevada irradiancia pueden ocasionar una fotoinhibición que daña el PSII (Hennige *et al.* 2011, Fisher *et al.* 2012, Pospíšil 2016), comenzando con la degradación de la proteína D1 (Warner *et al.* 1999), daño en la enzima rubisco y en los tilacoides teniendo como resultado la inactivación de la producción de ATP y NADPH (Weis 2008).

Es importante hacer énfasis en que la temperatura y la salinidad son propiedades oceanográficas que junto con las concentraciones de especies de carbono inorgánico juegan un papel crucial en la regulación del pH, específicamente la disminución de este como consecuencia del ingreso de altas concentraciones de dióxido de carbono (CO_2 (aq)) al océano. El agua marina contiene la reserva más importante de CO_2 disuelto (cuatro veces más que en la atmósfera), y la temperatura del agua afecta su disolución, por lo que aguas frías disuelven mayor cantidad de CO_2 y agua más templada se satura con menor cantidad del gas (Bádenas & Aurell 1999). El CO_2 ocasiona un incremento de iones hidrogeno (H^+) que se añaden a cualquier base para formar ácido carbónico (H_2CO_3) y sus productos de disociación, bicarbonato (HCO_3^-) y carbonato (CO_3^{2-}). Además, reduce las concentraciones de iones carbonato (CO_3^{2-}) y por ende el nivel de saturación de carbonato de calcio (CaCO_3) (Dickson 1984, Orr *et al.* 2005, Board & National Research Council 2010).

Por otra parte, el aumento del CO_2 altera los balances químicos fundamentales del océano estimando que globalmente disminuya entre 0.3 y 0.5 unidades en los próximos 100 años (Harley *et al.* 2006, Doney *et al.* 2009, McNicholl *et al.* 2020), debido a que se ha predicho que el CO_2 disuelto aumentará en los océanos tropicales de 200 a 250 %, y los iones carbonato (CO_3^{2-}) disminuirán de 35 a 50% teniendo como consecuencia una saturación en el agua de mar (Ω) (Orr *et al.* 2005).

Dicha saturación afecta principalmente el crecimiento y calcificación de los organismos formadores de estructuras de carbonato CaCO_3 , daño que se ve reflejado en la erosión de sus estructuras pudiendo repercutir en la distribución y abundancia de estas especies (Guinotte & Fabry 2008, Davy *et al.* 2012, Millero 2016).

Otro factor que se ha reportado en últimos años e influye en los cambios del pH es la llegada de grandes cantidades de las macroalgas pelágicas *Sargassum fluitans* y *S. natans* en costas y arrecifes del Mar Caribe, estas se acumulan en grandes cantidades

en las costas en la cual se degradan a productos orgánicos en descomposición, ocasionando que las aguas costeras se vuelvan turbias con una coloración marrón que afecta la movilidad de las larvas del coral *Acropora palmata* (Antonio-Martínez *et al.* 2020). Como consecuencia, las aguas presentaron una reducción de luz, oxígeno y pH el cual varió entre 6.9-9.1 siendo los valores más bajos cerca de la costa (Van Tussenbroek *et al.* 2017). Otra consecuencia del arribazón de sargazo es la alta mortalidad de peces, crustáceos y equinodermos debido a la hipoxia por la presencia de sulfuro que se produce con su descomposición; no obstante, también los corales se pueden ver afectados por dichos cambios (Rodríguez-Martínez *et al.* 2019). En la costa del Caribe se ha registrado que el pH en condiciones normales es de 8.1 y disminuye hasta 7.2 en zonas con sargazo en descomposición en las playas de Puerto Morelos, Quintana Roo (comunicación personal).

En estudios de laboratorio para simular los efectos de la acidificación y ajustar los gradientes de pH se ha utilizado Tris-HCl (tris(hidroximetil)aminometano), los resultados obtenidos son similares a los inducidos por el CO₂, sin embargo el daño ocasionado en los organismos es más severo con el CO₂ (Xu *et al.* 2020).

2.3.2 Tolerancia de los cnidarios y endosimbiontes al estrés

Existen diversas especies de cnidarios capaces de tolerar el estrés ocasionado por el incremento de la temperatura, estos organismos han resistido la mortandad ocasionada por la disociación de la simbiosis tanto a nivel local, regional así como en diversas partes del mundo. Se ha reportado que los endosimbiontes de *Siderastrea radianes* son resistentes al incremento de la temperatura dado que tienen la capacidad de disipar y reflejar la energía de excitación mediante vías no fotoquímicas, esto permite proteger al fotosistema obteniendo una mayor resistencia al blanqueamiento (Warner *et al.* 1996, Howells *et al.* 2016).

A nivel molecular se pueden expresar los genes que codifican a las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés: Heat Shock Protein) que le permite sobrevivir en condiciones de estrés, por ejemplo, el incremento de la temperatura. Las HSP tienen la capacidad de proteger a las células de la necrosis o la apoptosis ocasionada por el estrés; entre sus funciones están en el plegamiento, despliegue, degradación y transporte de proteínas (Feder & Hofmann 1999, Jäättelä 1999).

La expresión de HSP ha sido más estudiada en corales, se ha reportado que ante un choque térmico se expresan los genes HSP 32, HSP 60, HSP 70, HSP 90, cada uno se

expresa diferente de acuerdo con las fluctuaciones de temperatura que se presentan *in vivo* o *in situ*, así como de la especie, tanto del hospedero como del huésped. La expresión de estos genes ha permitido que diversas especies de corales sobrevivan ante un incremento ocasionado por el calentamiento global (Brown *et al.* 2002, Seveso *et al.* 2018, 2020). Por ejemplo, el coral *Acropora millepora* fue sometido a un choque térmico de 32° C y se expresaron los genes HSP 70 y HSP 90, la expresión del primero sugiere que puede ser utilizado como biomarcador de estrés, mientras que el segundo aunque redujo su expresión puede estar induciendo la expresión de otros genes sensibles al calor y aclimatación (Rosic *et al.* 2011). Estos genes también se expresan cuando los endosimbiontes del coral *Siderastrea siderea* son expuestos a elevadas temperaturas (Davies *et al.* 2018).

En relación con la expresión de genes como respuesta al estrés térmico se ha documentado que estos se expresan en latitudes medias donde las temperaturas suelen ser elevadas, así mismo en estas latitudes se ha reportado que las cepas más tolerantes de *Symbiodinium* corresponden al clado C, esto puede indicar una adaptación genética al incremento de temperatura por parte del hospedero y del huésped (Wicks *et al.* 2010, Barfield *et al.* 2018). También se ha demostrado que las cepas de *Symbiodinium* presentan diferente tolerancia a elevadas temperaturas y que incluso han sobrevivido cuando se someten a este tipo de estrés (Newkirk *et al.* 2020).

Del mismo modo las enzimas antioxidantes también evitan el daño ocasionado por el estrés producido por el incremento de la temperatura y la luz, entre las enzimas involucradas se encuentran la superóxido dismutasa (SOD) de cobre / zinc, SOD de manganeso, SOD de hierro, y ascorbato peroxidasa y catalasas, que evitan el daño celular posterior a la producción de ROS (Coles & Brown 2003, Howells *et al.* 2016). En los endosimbiontes del coral *Goniastrea aspera* que habita en aguas poco profundas se ha observado la expresión de enzimas antioxidantes principalmente SOD de Zn, proteínas de choque térmico HSP 60, HSP 70 así como, una mayor recuperación del PSII que puede estar influenciada por la expresión de las proteínas y enzimas, esto le confiere una resistencia a la radiación permitiéndole una mayor capacidad para adaptarse a elevadas temperaturas (Brown *et al.* 2002).

Respecto a la tolerancia en cnidarios y sus endosimbiontes, se ha reportado que algunas especies de *Symbiodinium* juegan un rol importante al conferir distintos umbrales térmicos a sus hospederos lo que permite una mayor adaptación al medio, sin embargo no todas las especies presentan esta tolerancia (Oliver & Palumbi 2011).

En los corales se ha observado que diversas especies son capaces de tolerar elevadas temperaturas; corales que habitan en Samoa Americana han tolerado hasta 34.5 °C sin presentar blanqueamiento, dicha característica también ha sido observada en otros organismos que habitan en aguas poco profundas (Craig *et al.* 2001). En el golfo Pérsico el coral *Platygyra daedalea* que habita aguas poco profundas ha sobrevivido temperaturas entre 33 y 36 °C, tanto en su etapa larvaria como adulta, debido a su potencial para amortiguar el estrés oxidante (Howells *et al.* 2016).

Por otra parte, en cuanto al estrés ocasionado por el pH se ha observado que las éfiras (*Aurelia aurita*) y los pólipos (*Carukia barnesi*) de medusas son capaces de tolerar un pH de 7.6 y 7.7 respectivamente, también presentan una reducción en su tamaño y movilidad, estas características también fueron observadas en pólipos de *Alatina mordens* a un pH de 7.6 (Klein *et al.* 2014, Tills *et al.* 2016, Boco *et al.* 2019). La medusa *Aurelia coerulea* también tolera un bajo pH (7.3) dado que se demostró que sus larvas plánulas presentan una elevada tasa de asentamiento, por lo que el pH no es un factor que influya en su supervivencia y es considerada una especie ganadora ante la acidificación del océano (Dong & Sun 2018).

La expresión de genes también se ha reportado a un bajo pH (7.6). La anémona *Anemonia viridis* toleró este bajo pH. No presentó blanqueamiento y se expresaron genes relacionados con la inmunidad innata, metabolismo de lípidos, señalización celular, estrés oxidativo, apoptosis y fagocitosis, dentro de estos destacó la reducción de la expresión de la anhidrasa carbónica (AC) (Urbarova *et al.* 2019). Algo similar sucede a un pH de 6 en gametofitos de la macroalga *Saccharina japonica* que mostró una inhibición de la actividad externa de esta enzima, mientras que la actividad interna incremento (Bi *et al.* 2020). También se ha reportado que a un pH de 7.7 pólipos de la medusa *Carukia barnesi* incrementaron su tasa de respiración y la producción de metabolitos como glutamato, acetato, betaína, metilguanidina, lisina, sarcosina, glicina (Boco *et al.* 2019).

A un pH de 7.6 en pólipos de la medusa *Cassiopea* spp. sus endosimbiontes reducen su tasa de fotorrespiración cuando el CO₂ incrementa, poniendo en evidencia que *Symbiodinium* puede mejorar la tolerancia de otros huéspedes cnidarios no calcificantes, por lo que al presentar una mayor cantidad de endosimbiontes las probabilidades de sobrevivir y adaptarse al medio incrementan (Klein *et al.* 2017). A este mismo pH y en la misma medusa se observó que la disminución del pH no afecta la densidad de sus endosimbiontes por lo que se les considera una especie tolerante a

bajos valores de pH, aumentando así su potencial de especie invasora (Weeks *et al.* 2019), cabe mencionar que en ambos experimentos se utilizó un pH de 8.2 como control.

2.3.3. Inducción de la disociación de la simbiosis mediante experimentos de laboratorio

Debido a las consecuencias que representan la disociación de la simbiosis se han realizado diversas investigaciones de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, con el fin de comprender cuales son los mecanismos de acción que están involucrados. A continuación se mencionan algunos métodos utilizados.

2.3.3.1 Uso de mentol

El mentol ha sido efectivo para inducir blanqueamiento en cnidarios (Wang *et al.* 2012, Dani *et al.* 2016, Matthews *et al.* 2016). Sin embargo, su mecanismo de acción no está muy estudiado debido a que originalmente se utilizó como anestésico en cnidarios y el blanqueamiento se observó como efecto secundario (Moore 1989). El mentol es un terpeno cíclico que cuando se pone en contacto con la piel o mucosas provoca una sensación de frío o calor, que es ocasionada por el aumento en la concentración de Ca^{2+} en un conjunto de membranas neuronales (Eccles 1994, Okazawa *et al.* 2000). Este aumento de Ca^{2+} puede desencadenar una excitotoxicidad celular (Silverthorn 2008), que se puede reflejar en la expulsión del endosimbionte (Okazawa *et al.* 2000).

También se ha reportado que una dosis de 0.19 mM ocasiona daños al PSII, el cual varía con la especie tanto del huésped como del hospedero. Por ejemplo, tratamiento con mentol a corales de la especie *Isopora palifera* mostraban actividad fotosintética, mientras que *Stylophora pistillata* no mostraba actividad (Wang *et al.* 2012); en los endosimbiontes también se ha observado que el daño es diferente para cada clado o especie (Wang *et al.* 2017).

2.3.3.2 Uso de monosacáridos

Los monosacáridos como el carbono orgánico disuelto lábil (COD) ocasionan en corales efectos similares a los provocados por estrés térmico, debido a que existen mecanismos que afectan el rendimiento de la eficiencia fotosintética (Wiedenmann *et al.* 2013, D'Angelo & Wiedenmann 2014, Pogoreutz *et al.* 2017).

El COD induce la desestabilización de la simbiosis mediante la estimulación de la fijación de N₂, dicha fijación es realizada que va a ser una fuente de nutrientes importante para *Symbiodinium* (Shashar *et al.* 1994, Kline *et al.* 2006, Pogoreutz *et al.* 2017). Además, el C suministrado puede ser una fuente de energía para el metabolismo y proliferación de los diazótrofos asociados al holobionte (Pogoreutz *et al.* 2016).

Una excesiva proliferación de diazótrofos producirá un exceso de N, el cual es perjudicial para los cnidarios, sobre todo para *Symbiodinium* dado que induce el crecimiento y altera el control que ejerce el hospedero. El exceso de N también produce una limitación de fósforo (P) que se ve reflejado en una disminución en la función del PSII; además, cuando la concentración de N es limitada las poblaciones de *Symbiodinium* son reguladas, así como la translocación de fotosintatos al hospedero (Pogoreutz *et al.* 2017, Xiang *et al.* 2020). En contraste también se ha observado que el daño en el fotosistema no es significativo y que la producción de ROS no es necesaria para iniciar una cadena de blanqueamiento, por lo que la expulsión de endosimbiontes se puede atribuir a la retención de fotosintatos (Pogoreutz *et al.* 2016). Otra consecuencia es la retención de C fijo llevada a cabo por *Symbiodinium* ocasionando que el hospedero agote sus reservas energéticas llevándolo a una limitación de CO₂ en las reacciones fotosintéticas de *Symbiodinium* (Pogoreutz *et al.* 2017, Lapointe *et al.* 2019).

En relación al COD se ha reportado que la glucosa promueve la proliferación de bacterias fijadoras de N, además, su uso incrementa la capacidad de fijación del N (Li *et al.* 2019). Otro efecto de la glucosa es la pérdida de pigmentación y la disminución de la eficiencia en el PSII de *Symbiodinium*, estos daños fueron gradualmente reversibles y se atribuyeron a la regulación postranscripcional de la expresión de genes nucleares encargados de codificar proteínas involucradas en la fotosíntesis y el almacenamiento de carbón (Xiang *et al.* 2018).

2.4 Importancia de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae

Las asociaciones simbióticas cnidario-Symbiodiniaceae son comunes en las regiones tropicales donde las temperaturas son cálidas y predominan los cnidarios. Entre las clases incluidas dentro del phylum cnidaria se encuentran: Anthozoa (corales y anémonas), Hydrozoa (hidras), Cubozoa (cubomedusas) y Scyphozoa (medusas);

siendo la clase Anthozoa con la mayoría de las especies de corales y anémonas que tienden a entablar una simbiosis con una o más especies de *Symbiodinium*. Estas asociaciones varían de acuerdo con la ubicación geográfica y las características físicas del medio como irradiación, temperatura y profundidad (Brusca & Brusca 2003, Thornhill *et al.* 2006, Pérez 2013). Además, esta especificidad se puede deber a que *Symbiodinium* produce macromoléculas que son compatibles con hospederos específicos (Karako *et al.* 2004).

Entre las ventajas de esta simbiosis, *Symbiodinium* aporta productos fotosintéticos al metabolismo, crecimiento y supervivencia de los cnidarios, sobre todo en ambientes pobres en nutrientes (oligotróficos). Mientras que los cnidarios proporcionan a sus endosimbiontes nutrientes a partir de los productos de desecho, y una posición adecuada en la columna de agua que le permite al simbiote tener acceso a la luz (Davy *et al.* 2012). Los cnidarios que entablan una simbiosis con *Symbiodinium* presentan una elevada actividad de la AC, así como transportadores específicos de iones bicarbonatos que les permite soportar la fijación del carbono fotosintético (Venn *et al.* 2008).

La simbiosis que entabla *Symbiodinium* con los corales es de suma importancia por la gran cantidad de biodiversidad de organismos marinos que albergan. Los corales que forman arrecifes se encuentran en zonas que son consideradas improductivas en el océano debido a que son oligotróficas, es decir, con pocos nutrientes (Walker & Wood 2005), pese a estas condiciones los corales han logrado sobrevivir ya que gran parte de los nutrientes los obtiene de *Symbiodinium* (Loram *et al.* 2007, Ganot *et al.* 2011, Newkirk *et al.* 2018).

2.4.1 Importancia de los corales y las limitaciones para su uso en experimentos de laboratorio

Los arrecifes de corales escleractinios son de suma importancia dentro de los ecosistemas marinos, como ya se mencionó, en ellos habitan una fracción sustancial de biodiversidad de suma importancia en la pesquería de subsistencia, no obstante, estos hábitats no son abundantes y se encuentran en menos del 4% de las aguas oceánicas (Walker & Wood 2005).

En los últimos años el creciente aumento de la temperatura ha inducido eventos masivos de blanqueamiento coralino, que es el resultado de la disociación de la simbiosis. La pérdida del endosimbionte ocasiona daños fisiológicos, que al ser

repetitivos o de larga duración provocan que los pólipos se encojan por falta de nutrientes, finalmente ocasionando la muerte de los corales, lo que se ve reflejado en el blanqueamiento de extensas áreas (Hughes *et al.* 2017).

Pese a la importancia que presentan los corales, y del enfoque en su protección y restauración, su uso en laboratorio para estudiar la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae, su respuesta al estrés por el aumento de la temperatura, a la irradiancia y al pH, representa diversas dificultades. Por ejemplo, el estado de protección legal en que se encuentran limita el acceso a colectas; además, se caracterizan por su lento crecimiento, sus cortos y limitados periodos de reproducción anuales, y por su difícil manejo y cultivo en laboratorio. Todo lo anterior aunado a la dificultad para observar sus células íntegras en microscopio ya que se componen de CaCO₃ (Cabrales-Arellano 2017, Newkirk *et al.* 2018).

Para hacer frente a estas dificultades se utilizan otros modelos en el estudio de la interacción cnidario-Symbiodiniaceae; por ejemplo, la anémona *A. viridis*, hidrozoo (*Hydra viridis*) o la medusa invertida *Cassiopea* sp. que es cada vez más utilizada para realizar estudios en laboratorio. Algunos autores como Ohdera *et al.* (2018) y Newkirk *et al.* (2018) proponen su uso como modelo de estudio de la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae. A pesar de que *C. cf. xamachana* se encuentra filogenéticamente distante de los corales escleractinios, presenta ciertas ventajas que la hacen un buen modelo de estudio de la simbiosis, tales como su fácil cultivo, reproducción, y manejo en laboratorio, por lo que ha sido utilizada para estudios con enfoques bioquímicos, moleculares y transcriptómicos (Cabrales-Arellano 2017, Newkirk *et al.* 2018).

2.5 Biología de *C. cf. xamachana*

Entre los cnidarios que presentan una simbiosis con *Symbiodinium* se encuentra la medusa invertida o de mangle *C. cf. xamachana*, que se distribuye en zonas costeras arenosas de baja profundidad, generalmente asociadas a mangle en todo el mundo (Holland *et al.* 2004). En México, su distribución se limita en todo el Mar Caribe hasta el extremo sur de Florida, habitando generalmente sustratos de fondos blandos, como son los arenosos o fangosos, y en manglares donde se encuentra adherida al sustrato mediante su campana (Fitt & Costley 1998).

La reproducción de las medusas adultas de *Cassiopea* spp. se lleva a cabo de manera sexual, mientras que en los pólipos es asexual. Como se puede observar, su ciclo de vida es complejo e implica un estadio medusoide y uno de pólipo (escifistoma) (Fig. 1). Estos organismos son dioicos, por lo que durante la reproducción sexual la hembra libera óvulos que son fecundados por el esperma del macho. Una vez que se lleva a cabo la fecundación, los cigotos se transportan a los tentáculos en forma de nódulos que son depositados en el centro de la hembra donde se desarrollarán en larvas plánulas. Entonces las plánulas emergen y nadan hasta encontrar un sustrato para adherirse y adquirir la capacidad de llevar a cabo la metamorfosis. En esta fase la plánula desarrolla la boca y adquiere al simbiote por ingestión, antes o durante el asentamiento (Fitt & Costley 1998, Sachs & Wilcox 2006).

El proceso de metamorfosis de la plánula da lugar a un pólipo con tentáculos llamado escifistoma que, en caso de no haber adquirido al simbiote en la etapa de larva, es aposimbiótico. Durante esta fase, y bajo ciertas condiciones ambientales, se lleva a cabo un proceso denominado estrobilación, en la cual el escifistoma sufre cambios morfológicos tales como la retracción de los tentáculos, aplanamiento del cáliz, y liberación de las éfiras, a partir de las cuales se desarrollarán nuevas medusas. Además de la estrobilación, los pólipos llevan a cabo reproducción asexual por gemación, mediante la cual liberan “gemas” tipo plánulas que también se asientan y llevan a cabo metamorfosis para producir pólipos. En esta fase *Symbiodinium* se puede adquirir mediante transmisión vertical, o bien se pueden obtener a partir del agua de mar circundante o del alimento a temperaturas mayores a 20 °C (Fitt & Costley 1998, Sachs & Wilcox 2006).

Experimentalmente se ha reportado que estas medusas en fase adulta y pólipo presentan una tolerancia a elevadas temperaturas, por ejemplo algunos pólipos de Florida toleran temperaturas hasta 34 °C; sin embargo redujeron su tamaño. También se han probado temperaturas de 36 y 38 °C, pero, los organismos comenzaron a desintegrarse (Fitt & Costley 1998), de igual forma se ha reportado que los pólipos toleran temperaturas de 32 y 34 °C (Newkirk *et al.* 2020).

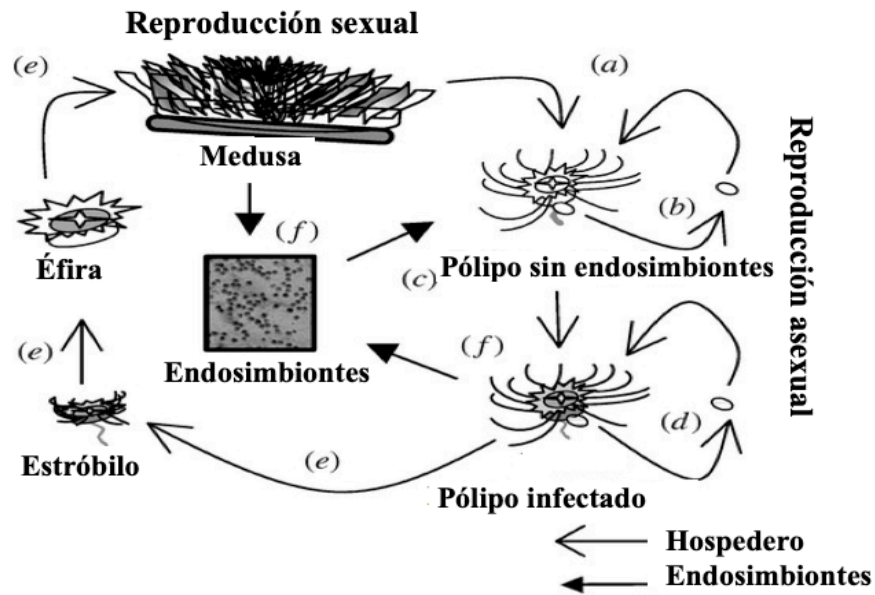


Figura 1.- Ciclo de vida de *Cassiopea* sp. y adquisición de *Symbiodinium*: Una vez fecundados los gametos a) Se liberan las larvas plánulas que se dispersan, se asientan, y llevan a cabo una metamorfosis para dar lugar a un pólipo no colonizado por el simbiote. b) Los pólipos sin endosimbiontes se reproducen asexualmente mediante gemación liberando “gemas” tipo plánulas que también llevan a cabo metamorfosis para dar lugar a un pólipo. c) Los pólipos son colonizados por el simbiote. d) Una vez que los pólipos son colonizados transfieren al simbiote verticalmente a sus descendientes clonales. e) Los pólipos colonizados sufren una segunda metamorfosis llamada estrobilación, con la cual dan lugar a una éfira. f) Las medusas y pólipos infectados liberan endosimbiontes al ambiente y c) pueden ser fuentes de nuevas recolonizaciones (Sachs & Wilcox 2006).

3. ANTECEDENTES

La interacción cnidario-Symbiodiniaceae juega un papel importante dentro de los ecosistemas marinos, y debido al estado de amenaza en la que se encuentran por la contaminación y el cambio climático, es urgente que se desarrollen mayores áreas y herramientas de investigación enfocadas a su protección. No obstante, y aun frente a cambios constantes en la calidad del agua y la temperatura, son pocos los trabajos realizados en laboratorio en los cuales se estudie el blanqueamiento tomando en cuenta enfoques de cambios de pH previstos a futuro en el océano. Por otra parte, se ha demostrado que temperaturas mayores a 30 °C inducen la disociación o bien disminuyen la densidad del simbiote en algunos cnidarios (Strychar *et al.* 2005, Fisher *et al.* 2012, Newkirk *et al.* 2018).

Con base en lo anterior, se han realizado experimentos en los cuales, mediante un choque térmico se induce la disociación de la simbiosis. Entre los trabajos realizados están el de Strychar *et al.* (2005), en el cual, al incrementar la temperatura se indujo la

disociación simbiótica en tres especies de corales, determinando que no todas las especies son vulnerables a la misma temperatura, ya que unas tienden a tolerar temperaturas más elevadas que otras.

Entre los trabajos enfocados en *C. cf. xamachana* podemos encontrar a: McGill & Pomory (2008), quienes indujeron el blanqueamiento en medusas de esta especie mediante un choque térmico de 34 °C por un periodo de seis días. Otro trabajo es el de Newkirk *et al.* (2018), en el cual se enfocaron en inducir la disociación simbiótica en pólipos de dicha especie, mediante un choque térmico de 35 °C. Posteriormente, los pólipos aposimbióticos fueron recolonizados con *Symbiodinium* “clado” A y su densidad se cuantificó mediante microscopía de fluorescencia.

Otros métodos utilizados para inducir el blanqueamiento en los cnidarios son el mentol y los sacáridos. Por ejemplo, se suministró bajas concentraciones (0.19 mM) de mentol en pólipos de la anémona *Aiptasia* spp. evidenciando un blanqueamiento en cuatro semanas (Matthews *et al.* 2016). También, se ha suministrado diferentes concentraciones de mentol (0.19, 0.38 y 0.58 mM) en los corales *Isopora palifera* y *Stylophora pistillata* mostrando que existe una dependencia con la dosis y la densidad del simbiote, teniendo una menor densidad a 0.58 mM (Wang *et al.* 2012). Por otra parte, el uso de monosacáridos ha demostrado que el estrés que producen es similar al ocasionado por los cambios de temperatura y se han realizado experimentos en el coral *Pocillopora verrucosa*, demostrando que en 28 días habían perdido aproximadamente el 60% de sus endosimbiontes y que aumentó la proliferación de bacterias fijadoras de N (Pogoreutz *et al.* 2017).

4. JUSTIFICACIÓN

El incremento de la temperatura y la disminución del pH en el océano como consecuencia de las actividades antropogénicas resultan perjudiciales para diversos organismos marinos, como es el caso de los cnidarios, entre los cuales destacan los corales constructores de arrecifes que se ven afectados por la disociación de la simbiosis, no obstante trabajar con corales vivos en laboratorio presenta ciertas desventajas. Con base en esto, se utilizó a *C. cf. xamachana* como modelo de estudio para evaluar el efecto de la temperatura y pH ante escenarios futuros previstos como consecuencias de las fluctuaciones de pH y temperatura ocasionados por los cambios ambientales. Estas medusas presentan ciertas ventajas como modelo de estudio de la

simbiosis dado que se puede cultivar fácilmente en laboratorio, y su ciclo de vida puede ser controlado; además, comparte características con los corales, por ejemplo, son altamente dependientes de su simbiosis con *Symbiodinium*, y al inducir la disociación de la simbiosis reducen su tamaño y mueren en pocas semanas.

Estas características hacen a *C. cf. xamachana* un buen modelo de estudio de la simbiosis, y permitirá evaluar el efecto que tiene la temperatura (32 y 34 °C) y el pH (7.50 y 7.20) en la interacción *Cassiopea*-Symbiodiniaceae. Las temperaturas utilizadas fueron propuestas con base en las predicciones que se han realizado a futuro en el Mar Caribe la cual varía anualmente en un rango de 21 a 32.2 °C y en escenarios futuros se estima que la temperatura aumentará de 3 a 5 °C; mientras que el pH disminuirá entre 0.3 y 0.5 unidades (Harley *et al.* 2006, Doney *et al.* 2009, Rojas-Higuera & Pabón-Caicedo 2015). Además, en la costa del Caribe se ha registrado que el pH disminuye hasta 7.2 en zonas con sargazo en descomposición en las playas de Puerto Morelos, Quintana Roo (comunicación personal).

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

¿*C. cf. xamachana* puede ser utilizada como modelo para evaluar su asociación con *Symbiodinium* ante variaciones de temperatura y pH?

Las fluctuaciones ambientales que sufre el planeta actualmente, como el aumento de la temperatura y disminución del pH, conllevan a que los organismos marinos se vean afectados. Por lo tanto, se espera que el modelo simbiótico de estudio de *Cassiopea*-Symbiodiniaceae sea útil para observar los cambios en la densidad de *S. microadriaticum* adquirido por reinfección en pólipos blanqueados cuando se modifique la temperatura y pH del medio. Se espera que en los pólipos expuestos a las temperaturas más elevadas y un bajo pH se vea afectado el establecimiento de la simbiosis, y que presenten una menor densidad de *S. microadriaticum*.

6. OBJETIVOS

6.1 Generales

Evaluar el efecto de la combinación de distintos valores de temperaturas y pH en la reinfección de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana* por el simbiote algal *S. microadriaticum*.

6.2 Particulares

- Seleccionar un método eficiente para la obtención de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana*.
- Monitorear la densidad de *S. microadriaticum* durante los distintos tratamientos de blanqueo de los pólipos mediante el uso de microscopía.
- Recolonizar los pólipos blanqueados con *S. microadriaticum* bajo diferentes combinaciones de temperatura y pH.
- Cuantificar la abundancia del simbionte *S. microadriaticum* en los pólipos reinfectados.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Los pólipos de *C. cf. xamachana* fueron proporcionados por el acuario del Parque Xcaret en Quintana Roo, se mantuvieron a 25 °C en oscuridad y con agua de mar filtrada o FSW (Por sus siglas en inglés: Filtered Sea Water) hasta su uso experimental.

7.1 Blanqueamiento de pólipos de *C. cf. xamachana*

Se probaron tres metodologías para inducir el blanqueamiento de los pólipos de *C. cf. xamachana*. Con el fin de observar los cambios en la coloración y determinar si existe una disociación simbiótica, los pólipos se examinaron con un microscopio de epifluorescencia (Axioskop 40 Zeiss) al final de cada semana y/o tratamiento.

Una vez que se determinó el método más eficaz de blanqueamiento, se seleccionaron 576 pólipos y se sometieron al tratamiento correspondiente para obtener pólipos blanqueados.

7.1.1 Tratamiento con incremento de temperatura

El incremento de la temperatura es una técnica eficaz para inducir el blanqueamiento, en el presente trabajo se modificó el protocolo descrito por Newkirk *et al.* (2018). Los pólipos fueron colocados en placas de 6 pozos, 5 pólipos en cada pozo con 5 ml de FSW (0.22 µm). Posteriormente durante dos semanas se mantuvieron bajo diferentes condiciones de temperatura para inducir el blanqueamiento, y en cada una de estas

condiciones las gemas fueron retiradas diariamente, y el agua se cambió cada dos días.

Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: Se incrementó la temperatura de 25 a 36.5 °C manteniendo dos grupos uno sin alimento y otro con alimento (nauplios de *Artemia salina*). Una semana después la temperatura se incrementó a 37 °C y se mantuvieron en diferentes condiciones, con un ciclo de luz/oscuridad 12:12 h, luz constante y completa oscuridad (envueltos en papel aluminio), en cada uno de estos entornos se mantuvieron tratamientos con y sin suministro de alimento. Una vez concluidas dos semanas para cada una de las condiciones mencionadas, los organismos se observaron en un microscopio de epifluorescencia, los que no se encontraban blanqueados se mantuvieron en tratamiento una semana más y se observaron de nuevo al microscopio.

7.1.2 Tratamiento con mentol

Se siguió el protocolo descrito por Matthews *et al.* (2016), durante una semana se aplicaron tres tratamientos más el control; para cada tratamiento se colocaron tres pólipos en un pozo (de una microplaca de 6 pozos) con 5 ml de FSW, a cada pozo se le agregó 1.5 µL de mentol y su concentración final fue de 0.19 mM.

Cada tratamiento consistió en diferentes condiciones; durante cuatro días se expusieron a total oscuridad (26 y 37 °C), luz constante (37 °C), un ciclo de luz/oscuridad 12:12 h (26 °C) con cambios diarios de agua y sin alimento.

7.1.3 Tratamiento con monosacáridos

Para este ensayo se modificó el protocolo descrito por Pogoreutz *et al.* (2017), se utilizó una mezcla de 10 mg/L de monosacáridos (4.14 mg/L D-Glucosa, 3.54 mg/L D-Galactosa y 2.25 mg/L Manitol) en FSW. Se colocaron 5 pólipos en cada pozo de dos placas de 6 pozos, se adicionaron 5 ml de la mezcla de monosacáridos realizando cambios diarios durante una semana. Una placa de tratamiento se mantuvo en oscuridad y la otra en luz constante a 26 °C. Concluida la semana se observaron en un microscopio de epifluorescencia. Cuando se observó contaminación bacteriana, se añadió a cada pozo con pólipos 100 µg/ml de Ampicilina, lo cual permitió mantener a los pólipos libres de patógenos durante el tratamiento.

7.2 Aislamiento de células de *S. microadriaticum* para reinfeción de pólipos

Las células frescas de *S. microadriaticum* fueron aisladas de tentáculos de medusas adultas, los cuales fueron cortados cuidadosamente. Cada tentáculo fue colocado en un homogeneizador de cristal, se agregó FSW y se maceró; el macerado se vertió en microtubos y se centrifugó a 3,000 x g durante 5 min, se desechó el sobrenadante y con una micropipeta se extrajo parte del tejido de la medusa. Enseguida la pastilla formada fue resuspendida nuevamente en FSW y el procedimiento se realizó dos veces más o hasta eliminar la mayor cantidad de tejido de medusa. Una vez que la pastilla estaba lista se resuspendió en FSW y las células se contabilizaron en una cámara de Neubauer.

7.3 Reinfeción de los pólipos blanqueados bajo las diferentes combinaciones de temperatura y pH

Con la finalidad de analizar las combinaciones de condiciones estresantes ante el incremento de temperatura y disminución del pH, se realizó un diseño experimental que constó de nueve tratamientos con pólipos blanqueados (con reinfeción añadiendo *S. microadriaticum*) con sus respectivos controles (sin añadir *S. microadriaticum*) ambos con una réplica. Los tratamientos y controles se sometieron a diferentes combinaciones de temperaturas (29, 32 y 34 °C) y valores de pH (8.20, 7.50 y 7.20) tomando como testigo los tratamientos con una temperatura de 29 °C y un pH de 8.20 (Fig. 2). Los pólipos fueron observados en el microscopio de epifluorescencia y colectados los días 2, 4, 8 y 16 del tratamiento, con el fin de monitorear la reinfeción y dar tiempo a que los endosimbiontes se reprodujeran. Cabe mencionar que para llevar a cabo el seguimiento de la densidad del endosimbionte se tomó un pólipo al azar de cada tratamiento, control y sus réplicas, además, en el día cero se tomaron pólipos blanqueados que sirvieron de referencia para el monitoreo.

Se colocaron cuatro pólipos blanqueados en cada uno de los pozos los cuales contenían FSW con su respectivo valor de pH, que fue ajustado utilizando Tris-HCl para acidificarla o Tris base para neutralizarlo, cuyo ajuste se realizó con un potenciómetro (CORNING 430 pH Meter).

Los pólipos fueron reinfectados (tratamientos) con células de *S. microadriaticum* (2.725×10^3 cel/mL) previamente aisladas de tentáculos de medusas. Las células se suministraron con nauplios de *A. salina*. En el caso de los controles los pólipos sólo se

alimentaron con nauplios de *A. salina*, con el fin de contrastar la eficiencia de reinfección, tanto en los tratamientos como en los controles. Los restos de los nauplios fueron retirados y el FSW se cambió a las 24 hrs, los días siguientes se cambió el FSW y se alimentaron cada dos días hasta concluir el experimento.

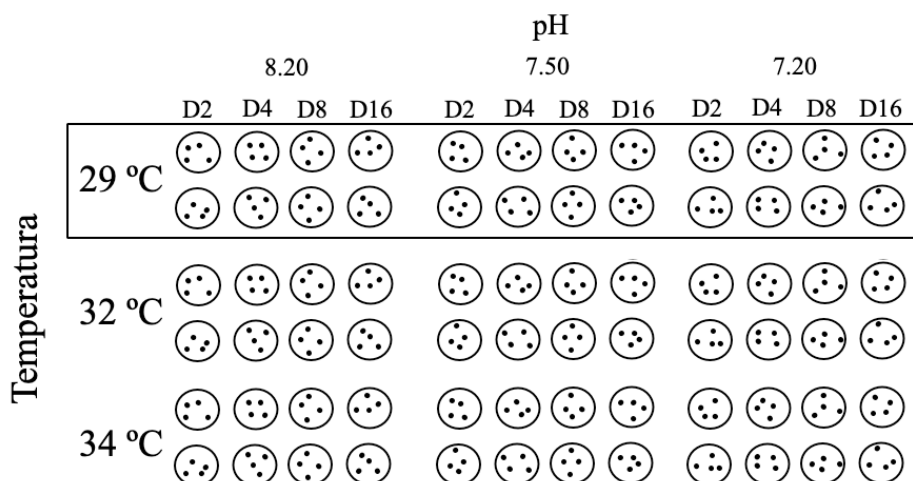


Figura 2.- Diseño experimental con las diferentes combinaciones de temperatura y pH. Se muestran los tratamientos y sus réplicas, así como el día en que fueron realizadas las colectas (D2, D4, D8, D16). Este mismo diseño se aplicó en los controles teniendo un total de 18 unidades experimentales y 576 pólipos blanqueados. El rectángulo indica los tratamientos utilizados como testigos.

7.4 Análisis de datos

A partir de las micrografías obtenidas de la observación con microscopio de epifluorescencia, se realizó una edición digital con el programa ImageJ. La edición consistió en aislar los píxeles blancos que representan la autofluorescencia de los endosimbiontes. Las imágenes fueron transformadas a 8-bit (blanco y negro), posteriormente los píxeles blancos fueron aislados manualmente utilizando el complemento Threshold que permite al usuario establecer dos umbrales (blanco y negro). Dentro del programa se obtuvo un histograma de las frecuencias de píxeles blancos y negros, finalmente se guardaron los datos de los píxeles blancos (endosimbiontes) (Fig. 3).

Con los datos obtenidos de la densidad de píxeles blancos se calculó el promedio de los tratamientos y réplicas, a partir de este se realizaron histogramas los cuales permitieron observar las diferencias entre los tratamientos. Posteriormente, se elaboró una matriz de datos y se realizó un análisis de redes neuronales con el programa STATISTICA® versión 7.0, esto con el fin de determinar cuál es la variable que influye más en la diferencia de densidad del simbiote.

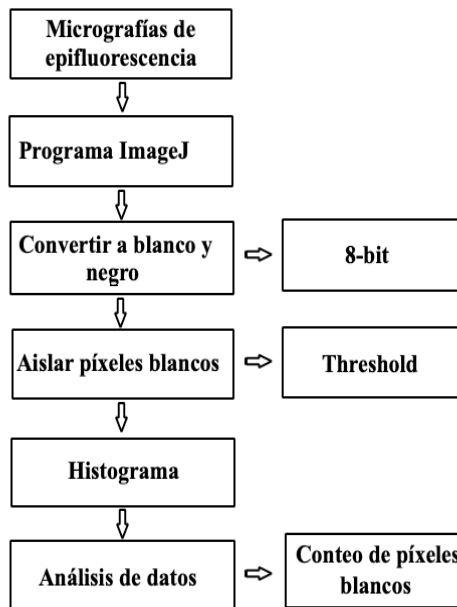


Figura 3.- Diagrama de la metodología utilizada para aislar los píxeles blancos (fluorescencia) en el programa ImagenJ.

7.4.1 Red Neuronal

Con la matriz de los datos cualitativos estructurada (Anexo I) sobre los cambios en la densidad de *S. microadriaticum* (D en valores de píxeles entre 0 y 255), en función de gradientes experimentales de temperatura (29, 32 y 34 °C) y pH (8.20, 7.50 y 7.20), se implementó un modelo de predicción por Red Neuronal (Haykin 1999). Para este caso, la D es la variable dependiente, los gradientes de temperatura y pH son los gradientes independientes. La Red Neuronal se implementó en el programa STATISTICA® versión 7.0. Para un grupo de resultados por desplegar (predicción lineal, predicción lineal multicapa y predicción radial), se decidió usar el tercer tipo de resultado, para resolver el efecto de los gradientes de temperatura (29, 32 y 34°C) y el pH (8.20, 7.50 y 7.20) sobre D. Este último se nombró Modelo Predictivo Multicapa (MPM), la información de entrada fueron los registros de los gradientes de temperatura y pH; mientras que las salidas fueron la predicciones probabilísticas, nombradas P(D) (Fig. 4).

El MPM, está constituido por *i* ecuaciones lineales (en los espacios sinápticos) y por *i* ecuaciones “no lineales” (en las capas de activación). Las funciones sinápticas y de activación fueron elegidas por el software STATISTICA® versión 7.0.

Los promedios $P(D)$ para cada uno de los gradientes de temperatura y pH, se utilizaron para construir una nueva estructura matricial, con la que se implementó el Análisis de Correlación Múltiple. Esto último se realizó en el programa STATISTICA® Versión 7.0.

Para obtener mayor información y un enfoque gráfico diferente sobre estos resultados, se aplicó el MPM que fue implementado con tres capas de activación utilizando los registros de temperatura y pH (llamadas aquí r_i variables) como la información de entrada. Un modelo lineal [$P(1) = a_i + b_i \cdot (r_i)$] fue utilizado para activar a la primera capa. Entre la capa de activación mencionada y la segunda capa, se utilizó un modelo lineal como señal de sináptica [$S(1) = c_i + d_i \cdot P(1)$] y para activar la segunda capa, se utilizó un modelo exponencial [$P(2) = (e^{-S1})$]. Entre la segunda y tercer capa, se utilizó un modelo lineal [$S(2) = e_i + f_i \cdot P(2)$] como señal sináptica y, para activar a la tercer capa, se utilizó un modelo lineal [$P(3) = a_i + b_i \cdot (s_2)$]. Finalmente, con esta última capa se calcularon las predicciones probabilísticas de $P(D)$.

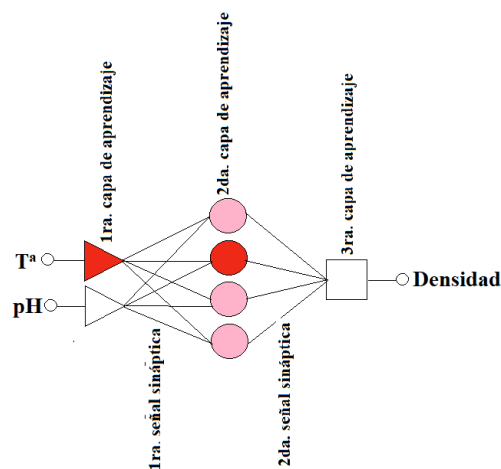


Figura 4.- Modelo lineal de clasificación neuronal. Los primeros círculos indican la información de entrada (gradientes de temperatura y pH), los triángulos, círculos (rosas y rojo) y cuadrado indican las capas de aprendizaje mientras que el último círculo indica la señal de salida las cuales son las predicciones probabilísticas.

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Blanqueamiento de pólipos de *C. cf. xamachana*

Existen diversos métodos para inducir cnidarios blanqueados o aposimbióticos, sin embargo, cada uno de estos métodos actúa diferente en cada especie, por ejemplo, en tiempo, concentración o tasa de mortalidad, entre otros. A continuación, se describirán los resultados y discusiones de los métodos utilizados para inducir el blanqueamiento de 576 pólipos de *C. cf. xamachana*.

8.1.1 Tratamiento con aumento de temperatura

Utilizando la metodología modificada de Newkirk *et al.* (2018), se observó que la temperatura de 36.5 y 37°C no indujo un blanqueamiento total (Fig. 5). Esta baja eficiencia de blanqueamiento puede atribuirse principalmente a la aclimatación previa de los pólipos, o bien porque en su hábitat natural pueden soportar elevadas temperaturas cuando baja la marea (McGill & Pomory 2008), dicha tolerancia también se ha observado en el coral *Goniastrea aspera* (Brown *et al.* 2002), esto indica que ciertas especies de cnidarios tienden a soportar el estrés térmico.

Además, las medusas *Casiopea* sp. habitan en zonas tropicales donde las temperaturas son más altas llegando a alcanzar los 32 °C como sucede en el Mar Caribe (Coles & Brown 2003, Castillo *et al.* 2018), o zonas donde la temperatura ha aumentado de 30-33 °C (Glynn 1991). Asimismo, organismos de la misma especie, pero geográficamente separados responden de manera diferente a los mismos estímulos, ya que en Florida, Keys Newkirk *et al.* (2018) obtuvieron pólipos completamente blanqueados a una menor temperatura (35.5 °C) que la utilizada en este trabajo; además, al igual que nosotros ellos mantuvieron sus pólipos a 25 °C.

No obstante, en otros cnidarios la temperatura ha sido un método eficaz para obtener organismos aposimbióticos (Fujise *et al.* 2014), aunque también se ha observado una mínima permanencia de células del endosimbionte (Weis 2008, Mansfield *et al.* 2017) en corales escleractinios (*Acropora selago* y *Acropora muricata*) estas células pueden permanecer en el tejido e incluso ser fotosintéticamente competentes a 27 y 30 °C (Fujise *et al.* 2014). Esto permite observar que independientemente de la especie de cnidario o de endosimbionte un estrés térmico altera la asociación simbiótica.

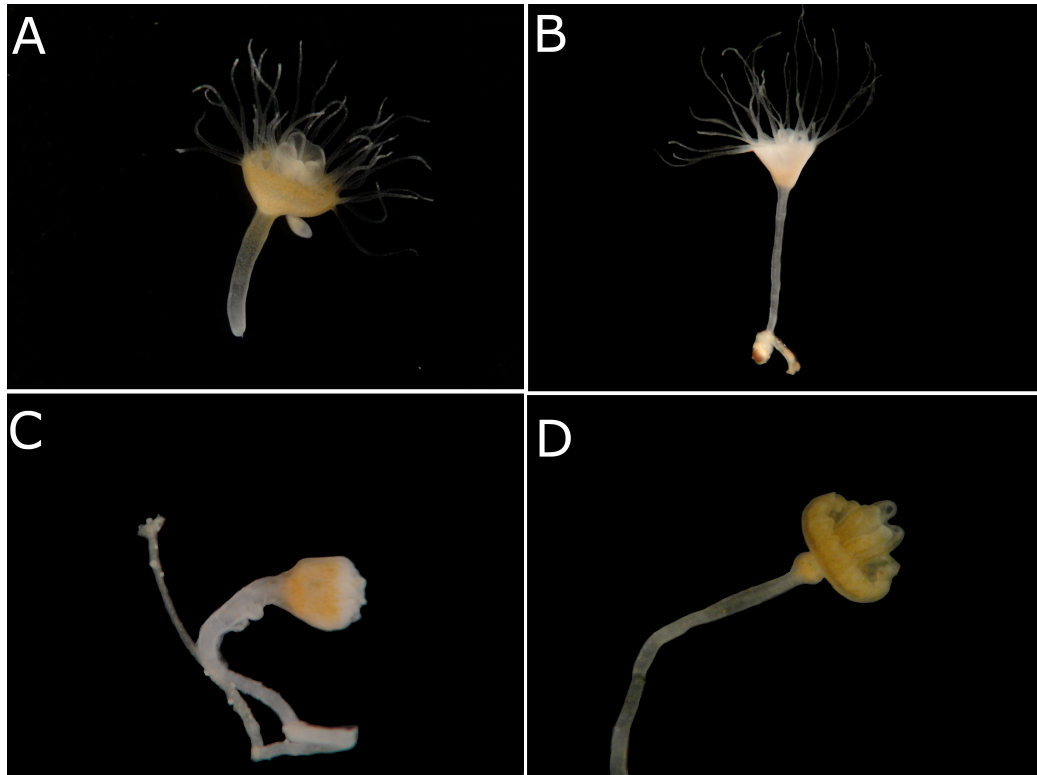


Figura 5.- Estereomicrografías de pólipos tratados a 37 °C: **A.** Pólipo al comienzo del experimento, se encuentra en proceso de reproducción y está liberando una gema (flecha), además presenta un mayor tamaño comparada con las demás imágenes, así como una coloración marrón; **B.** Ejemplo de la coloración rosa pálido en pólipos alimentados con nauplios y en ausencia de luz, se puede observar una ligera reducción de tamaño, la cual no es representativa; **C.** Pólipo final del tratamiento, se observa en color marrón ya que no hubo pérdida de endosimbiontes, y los tentáculos están retraídos; **D.** Comienzo de la estrobilación la intensa coloración marrón indica una abundante cantidad de endosimbiontes, nótese cómo los tentáculos se retraen y la cavidad oral se hace más prominente, al cabo de una semana se transformará en una éfira.

Respecto a *S. microadriaticum* se ha documentado que el incremento de la temperatura ocasiona daños en el PSII, entre otras respuestas de estrés, llevando a un blanqueamiento de los hospederos (Warner *et al.* 1999, Hennige *et al.* 2011, McGinty *et al.* 2012, Fisher 2012, Pospíšil 2016). En este ensayo de exposición a altas temperaturas, no se observó blanqueamiento, por lo que se puede suponer que las células de *S. microadriaticum* no sufrieron un severo daño en el PSII, mostrando mayor resistencia al estrés térmico (36.5 y 37 °C). La tolerancia observada también puede ser un efecto de la adaptación de los endosimbiontes, dado que se ha reportado que en corales tienen la capacidad de fotoreparación, es decir, toleran el estrés térmico (Hennige *et al.* 2011); además, *Symbiodinium* puede disipar y reflejar la energía de excitación mediante vías no fotoquímicas, en las cual los centros de reacción del PSII se vuelve fotoquímicamente inactivos, apagan y disminuyen la fluorescencia confiriéndole un grado de protección a los endosimbiontes (Warner *et al.* 1996, Howells *et al.* 2016), lo que les permite sobrevivir y habitar zonas con una elevada

temperatura e irradiancia. La presencia de endosimbiontes en los pólipos de *C. cf. xamachana* es un indicativo de que a 37 °C el PSII no fue afectado de forma significativa, y que la producción de ROS en estas condiciones podría no ser suficiente para expulsar las células de *S. microadriaticum*.

En contraste, se ha observado que a 30 °C cultivos de *Symbiodinium* han disminuido su densidad a partir del día cuatro, además se vio afectada su eficiencia fotosintética (Gierz *et al.* 2017), por esta razón distintas cepas de *Symbiodinium* presentan diversas tolerancias a los cambios de temperatura que ante un incremento de la temperatura en el océano puede resultar en ventaja para *Symbiodinium* y su hospedero.

Por otra parte, en el tratamiento con alta temperatura en pólipos de *C. cf. xamachana*, se observó alrededor del cuarto día, una reducción en su tamaño y en sus tentáculos, este proceso es común en *Cassiopea* cuando es sometida a este tipo de estrés. La reducción en los tentáculos impide que puedan alimentarse, llevándolos a la inanición y una posterior pérdida de tamaño (Fitt & Costley 1998, McGill & Pomory 2008). Además a 36.5 y 37 °C el 40% de los organismos comenzaron a estrobar (Fig. 5), indicando así, la presencia de endosimbiontes que son fundamentales para dar comienzo a la estrobilación (Hofmann & Kremer 1981).

En cuanto a los organismos que fueron alimentados en condiciones de luz y oscuridad, se observó que tomaron una coloración rosa, mientras que los que no fueron alimentados presentaron una coloración más blanca. La coloración rosa se debe al aporte de carotenoides por parte de los nauplios de artemia, se ha documentado que los nauplios aportan estos pigmentos en la coloración de algunos peces (Uribe *et al.* 2018, Seidgar *et al.* 2019). Sin embargo, e independientemente de si fueron o no alimentados, los pólipos aún presentaban células de *S. microadriaticum* por lo que no se consideraron blanqueados, mientras que la coloración blanca de los pólipos que no se alimentaron se debe a la falta de carotenoides y no a la ausencia de endosimbiontes.

En cuanto al efecto de la luz en este ensayo, no se observó que influyera en la pérdida de endosimbiontes como ha sucedido en otros cnidarios; además, los pólipos de *C. cf. xamachana* han sobrevivido a una elevada irradiancia pero las probabilidades de que prosperen son pocas, la resistencia observada puede indicar que efectivamente los pólipos toleran la luz o que esta no es suficientemente alta como para expulsar las células de *S. microadriaticum*. No obstante, también se ha reportado la pérdida de endosimbiontes en ausencia de luz, por ejemplo, la anémona *A. pulchella* presentó una

pérdida progresiva de endosimbiontes en condiciones de oscuridad y sin alimento (Steen & Muscatine 1987), esto sugiere que aunque no hubo una fotoinhibición del PSII, el endosimbionte si es dependiente de la luz en estas anémonas. Así mismo, también sería importante analizar el daño en las mitocondrias de los endosimbiontes, ya que ante el estrés se pueden encontrar en distintas etapas de degradación dentro de una misma célula (Dunn *et al.* 2012).

Estos resultados indican que los pólipos de *C. cf. xamachana* utilizados en este trabajo, bajo las condiciones antes mencionadas, no son afectados por las temperaturas de 36.5 y 37 °C respecto a su población de endosimbiontes, pero si hubo efecto en los pólipos, ya que redujeron su tamaño y comenzaron a estrobilar. Estos resultados permiten corroborar que estas medusas presentan una mayor tolerancia a elevadas temperaturas y las interacciones con su endosimbionte son similares a las de otros cnidarios, como ya se mencionó la tolerancia es variable de acuerdo a la especie de endosimbionte y cnidario así como de su ubicación geográfica.

8.1.2 Tratamiento con mentol

El uso de mentol ha mostrado ser efectivo en inducir blanqueamiento en otros cnidarios (Wang *et al.* 2012, Matthews *et al.* 2016, Dani *et al.* 2016); sin embargo, no fue efectivo para inducir el blanqueamiento bajo las condiciones utilizadas en este estudio ya que los pólipos de *C. cf. xamachana* murieron al cuarto día incluso con la concentración mínima usada en estudios previos (19 mM). El mentol provoca una sensación de frío o calor, que es ocasionada por el aumento en la concentración de Ca^{2+} (Eccles 1994, Okazawa *et al.* 2000), este aumento puede desencadenar una exocitosis celular (Silverthorn 2008), que se puede reflejar en la expulsión del simbiote (Okazawa *et al.* 2000).

Además, se ha reportado que el mentol ocasiona un daño al PSII, el cual varía con la especie tanto del huésped como del hospedero (Wang *et al.* 2012). En los endosimbiontes también se ha observado que el daño es diferente para cada clado o especie (Wang *et al.* 2017). Es de esperar que exista una variación en cuanto a la respuesta de los organismos a las distintas concentraciones de mentol utilizadas así como el tiempo de exposición dado que cada organismo actúa de diferente forma.

Por otra parte, durante el corto periodo del experimento no se observaron cambios en coloración o tamaño, y no se observó la presencia de mucus; sin embargo, en anémonas se ha observado la secreción de mucus con células de *Symbiodinium* sp.

(Dani *et al.* 2016), el cual es secretado como un mecanismo de defensa (Jatkar 2008), aunque también puede ser una respuesta al incremento de la concentración de Ca^{2+} .

Hasta ahora se ha demostrado que bajas dosis de mentol y el reposo de los organismos durante el tratamiento es eficiente para inducir el blanqueamiento en corales y anémonas (Wang *et al.* 2012, Matthews *et al.* 2016, Dani *et al.* 2016, Mansfield *et al.* 2017). La ineffectividad de este tratamiento en el presente trabajo se puede atribuir a que para los pólipos de *C. cf. xamachana* la concentración de mentol fue tóxica, en trabajos posteriores se recomienda utilizar dosis más bajas y dejar reposar unas horas durante el tratamiento.

8.1.3 Tratamiento con monosacáridos

Comparado con los tratamientos anteriores, el uso de monosacáridos demostró alta eficacia al blanquear los pólipos en siete días (Fig. 6). Este método también, ha sido eficaz en el blanqueamiento de corales, en los cuales se observó la pérdida del 60 % de *Symbiodinium*, así como, un leve daño en el PSII, no obstante, este no fue suficiente para ser comparable con el daño ocasionado por estrés térmico (Pogoreutz *et al.* 2017). Si bien este blanqueamiento no es similar al ocasionado por la temperatura (con respecto a los eventos bioquímicos que se inducen), nos permitió obtener pólipos blanqueados y viables en poco tiempo para el experimento de reinfección; sin embargo, es probable que la glucosa haya interferido con la pérdida de pigmentación en las células de *Symbiodinium* (Xiang *et al.* 2018), y que los pólipos de *C. cf. xamachana* hayan conservado células de *S. microadriaticum* que no fueron posible observar con la microscopía de epifluorescencia. En un futuro, se recomienda analizar mediante técnicas moleculares la presencia de los endosimbiontes dado que si pierden su pigmentación no pueden ser detectados mediante el uso de microscopía de epifluorescencia.

El efecto de los monosacáridos en la desestabilización de la simbiosis ha sido poco estudiado y se ha reportado que se relaciona con el enriquecimiento de nutrientes ó eutrofización como consecuencia del incremento de C (Wiedenmann *et al.* 2013, D'Angelo & Wiedenmann 2014), esto tiene como consecuencia un aumento en la proliferación de diazótrofos encargados de fijar N_2 y generar N biológicamente disponible para el endosimbionte (Shashar *et al.* 1994, Kline *et al.* 2006, Pogoreutz *et al.* 2017). Por lo que es posible que en los pólipos de *C. cf. xamachana* se haya producido una excesiva proliferación de diazótrofos y por ende un exceso de N el cual

tiene efecto en *Symbiodinium* ya que su replicación en el hospedero es controlada por el acceso al N. La limitación de N por parte del hospedero repercute en la población de *Symbiodinium* ya que el aumento en su población es proporcional a la cantidad de N. Otra consecuencia es una limitación de P que afecta el funcionamiento del PSII (Pogoreutz *et al.* 2017, Xiang *et al.* 2020). Esto sugiere que el tratamiento con monosacáridos podría estar interfiriendo el aumento de la población de *S. microadriaticum* mediante el control al acceso a N y P por parte de los pólipos de *C. cf. xamachana*, para controlar el crecimiento de la población de endosimbiontes; otra posibilidad es que los pólipos hayan degradado las células del endosimbionte (Titlyanov *et al.* 1996) y como consecuencia se blanquearon. Además, aunque no sea significativo, puede que se haya ocasionado un leve daño en el PSII por lo que se deben de realizar más estudios, ya que es posible que el daño sea ocasionado por la retención de fotosintatos, o por la producción de ROS. El daño en el PSII es gradualmente reversible (Xiang *et al.* 2018), por lo que posterior al tratamiento tanto los pólipos de *C. cf. xamachana* y sus endosimbiontes se pueden recuperar.

También se observó que los pólipos redujeron su tamaño al tercer día, así como una notoria producción de mucus; esta producción se asocia a la defensa contra la proliferación de microorganismos patógenos dentro de los cuales se encuentran cepas virulentas, dicha proliferación aumenta con la alta disponibilidad de DOC. Así mismo el mucus se asocia a la liberación de *Symbiodinium* durante el blanqueamiento, ya que se ha encontrado endosimbiontes en el mucus de la anémona *A. pallida* (Dani *et al.* 2016). La producción de mucus por parte de los pólipos de *C. cf. xamachana* puede ser un indicador de la expulsión de las células de *S. microadriaticum*.

Dicha producción de mucus también puede ser atribuida a la activación del sistema de defensa que actúa como una barrera física ante patógenos y protege el epitelio, tal como sucede en otros cnidarios, como los corales (Jatkar 2008); empero, esta actividad protectora actúa diferente para cada especie, y varía también en el contenido y diversidad de bacterias o virus (Brown & Bythell 2005, Cárdenas *et al.* 2018).

Otro factor que puede inducir la producción de mucus es el exceso de C generado a partir de los monosacáridos dado que este es excretado en el mucus (Dubinsky & Jokiel 1994) por lo que los organismos que se mantuvieron sanos durante el tratamiento puede que solo hayan excretado el exceso de C.

Resultados similares han sido reportados en corales que fueron tratados con monosacáridos como fuente de C (Kuntz *et al.* 2005, Kline *et al.* 2006, Cardenas *et al.*

2018); tal como en el presente trabajo, también se observó que los pólipos se infectaron con patógenos, por lo que se les suministró ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$ final) a cada pozo que mostraba signos de crecimiento bacteriano, los pólipos presentaron una notable mejoría al segundo día. Los organismos recuperados de la infección por bacterias se dejaron reposar una semana más para que se recuperaran y fueron utilizados en los tratamientos de reinfección, mientras que los organismos sanos solo se les dejó reposar un par de días más. Cabe destacar que la alimentación se suspendió debido a que los restos de nauplios quedaban adheridos en el mucus de los pólipos. Estos resultados permiten corroborar que un exceso de nutrientes en los cnidarios puede inducir el blanqueamiento, en consecuencia el efecto de la contaminación antropogénica, como las aguas residuales, plaguicidas, fertilizantes, entre otros, juegan un rol importante en la inducción del blanqueamiento de los corales. Por tanto, el tratamiento con la mezcla de monosacáridos fue el tratamiento que permitió obtener pólipos blanqueados en siete días de manera reproducible, y que se utilizó para obtener los pólipos blanqueados para llevar a cabo los ensayos de reinfección con *S. microadriaticum*.

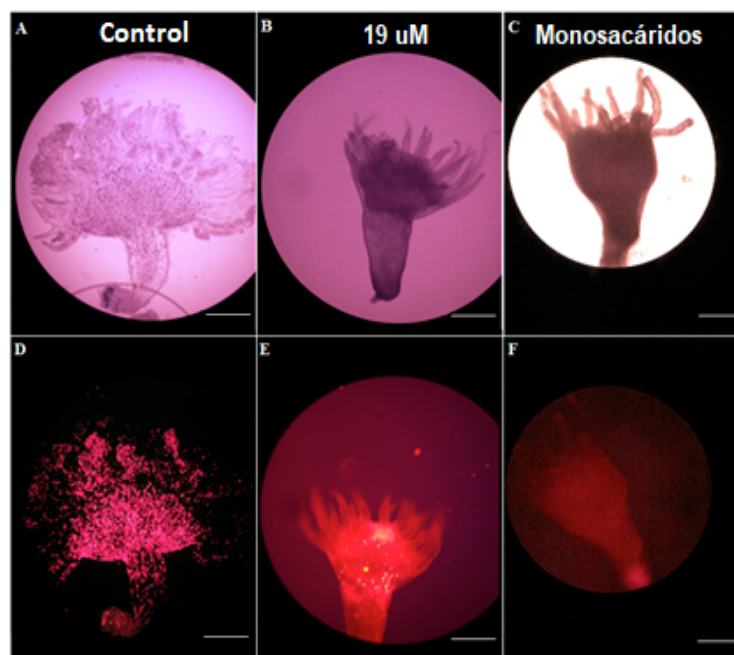


Figura 6. - Análisis microscópico para determinar el blanqueamiento inducido por mentol y mezcla de sacáridos, por microscopía óptica (A-C) y epifluorescencia (D-F). Los endosimbiontes se observan como puntos rojos, brillantes (D-F) o zonas oscuras (A-C), como es mejor apreciado en el pólipo utilizado como control (A y D). En el pólipo tratado con mentol a 19 μM solo se observan endosimbiontes en la epifluorescencia (E) y el tratado con monosacáridos no muestra evidencia de endosimbiontes (C y F). La barra indica la escala de 200 μm .

En contraste se ha observado que medusas adultas de *C. cf. xamachana* consumen fuentes orgánicas de N en áreas cercanas a poblaciones humanas, este exceso de nutrientes les ha permitido aumentar su tamaño y población (Freeman *et al.* 2016). Caso contrario sucedió en los pólipos, quienes redujeron su tamaño, liberaron gemas con bordes irregulares y fueron más susceptibles a enfermedades. Esto permite ver cómo a lo largo de su desarrollo existen diversos mecanismos que se pueden activar o desactivar permitiéndoles sobrevivir a diversas condiciones del medio, además, se corrobora que los pólipos de dicha medusa son más susceptibles que los adultos.

8.2 Reinfeción de pólipos de *C. cf. xamachana*

A diferencia del trabajo de Newkirk *et al.* (2018) nosotros realizamos una combinación de temperatura y pH cuyos resultados demuestran que las elevadas temperaturas y un bajo pH afectan el restablecimiento de la simbiosis. La reinfeción de los pólipos se realizó exitosamente para todas las combinaciones, se observaron y tomaron micrografías del día cero, dos, cuatro, ocho y dieciséis post infección. En todas las combinaciones no se observó la presencia de endosimbiontes en el día cero (pólipos blanqueados), comenzaron a mostrar una notable recuperación en la población de simbionte a partir del cuarto día a una temperatura de 29 °C; y a partir del día 2, a 32 y 34 °C. Cabe mencionar que después de un evento de blanqueamiento, en muchos de los hospederos puede permanecer una cantidad indetectable de células de *Symbiodinium* que pueden ser el inóculo para comenzar a repoblar al huésped (Stambler 2011). Por ello el tratamiento con monosacáridos probablemente no induce la obtención de pólipos aposimbióticos, pero sí de pólipos blanqueados, en los cuales puede haber una pequeña población no detectable de *S. microadriaticum* que perdió sus pigmentos. También se puede deber a que como ya se mencionó la glucosa influye en la pérdida de pigmentación, en consecuencia es posible que durante la reinfeción las células blanqueadas de los endosimbiontes remanentes en el hospedero pudieron haber recuperado su pigmentación.

El aislamiento de píxeles blancos en las micrografías evidenció que en los controles la densidad debida al simbionte fue nula, o despreciable durante todo el experimento respecto a las densidades encontradas en los tratamientos (Fig. 7), por esta razón se omitió su análisis. Este análisis indica que la reinfeción después del blanqueamiento inducido con la mezcla de monosacáridos se da por la adquisición de endosimbiontes

y no por la recuperación de los que hubiesen permanecido blanqueados en los pólipos. Esto permite corroborar la eficacia de la reinfeción mediante la adquisición horizontal de los endosimbiontes así como la viabilidad de las células de *S. microadriaticum* aisladas en fresco. La capacidad de reinfeción puede presentar ciertas ventajas, como formar asociaciones más competitivas que le permitan obtener más posibilidades de supervivencia ante cambios en el medio, por ejemplo, tolerancia al estrés térmico (Karako *et al.* 2004).

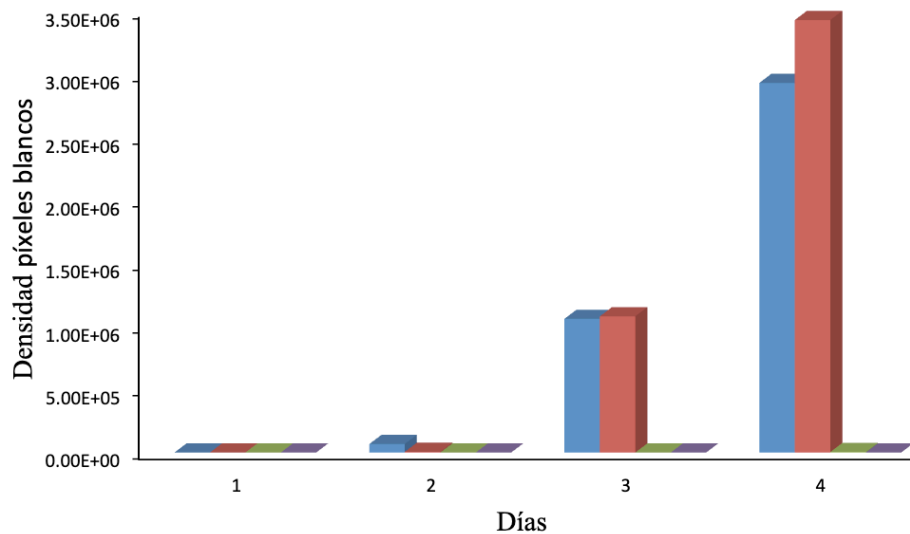


Figura 7.- Reinfeción de pólipos blanqueados con monosacáridos a 29 °C y pH 8.2. Ejemplo de la nula densidad de píxeles que representan los endosimbiontes observados en el control. Cada par de barras contiguas representan réplicas del tratamiento de reinfeción (azul y rojo) o del control de reinfeción sin simbionte añadido (verde y violeta).

La reinfeción posterior a un evento de blanqueamiento es crucial para la sobrevivencia de los cnidarios, sin embargo, después de estos eventos las condiciones del océano pueden ser inestables y tener variaciones en la temperatura y pH que puede afectar el restablecimiento de la simbiosis. Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten mejorar nuestro conocimiento sobre el efecto que estas variables tienen en la readquisición de los endosimbiontes por pólipos blanqueados, lo cual permite comprender mejor estos mecanismos en otros cnidarios

El promedio obtenido de los tratamientos (Fig. 8) demostró que la mayoría de los tratamientos la tendencia de reinfeción fue ascendente. Este comportamiento también se ha observado en corales donde su periodo de reinfeción fue de 3 a 7 días (Thornhill *et al.* 2006). Estos resultados concuerdan con lo observado en los experimentos de blanqueamiento a 32 y 34 °C dado que presentaban endosimbiontes a

partir del día 2, mientras que a 29 °C la densidad comenzó a incrementar en el día 4. Por el contrario, se ha reportado que en la reinfeksi3n de p3lipos de an3monas blanqueadas con mentol las c3lulas de simbiote crecen lentamente durante las primeras dos semanas, y m3s r3pido a partir de la cuarta semana (Matthews *et al.* 2016). La diferencia en cuanto al tiempo de recuperaci3n de *S. microadriaticum* puede atribuirse a que tanto el hu3sped como el hospedero son especies diferentes y sus reacciones no son iguales ante los distintos tipos de estr3s.

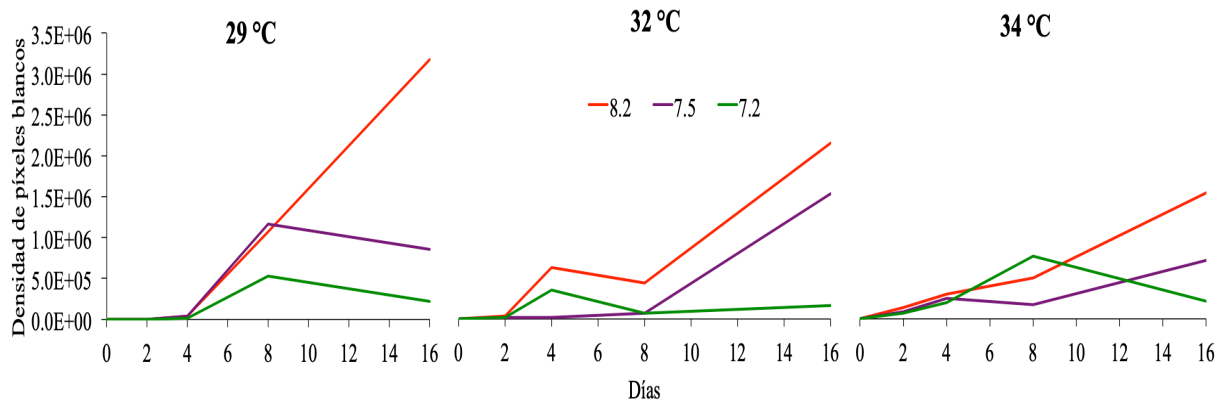


Figura 8.- Promedios de densidad de píxeles que representan los endosimbiontes en respuesta a los tratamientos de reinfeksi3n a 29, 32 y 34 °C. A 29 °C se observan las mayores densidades de simbiote para todos los tratamientos. Las densidades menores se observaron a 34 °C y pH 7.2.

Las micrografías de microscopía óptica y de epifluorescencia muestran el promedio de reinfeksi3n (Fig. 9-11, Anexo II-IV) corroborando así la presencia o ausencia de *S. microadriaticum* para cada tratamiento. Estos datos muestran que la mayor densidad de endosimbiontes se observa a 29 °C. La presencia de endosimbiontes en todos los tratamientos permite corroborar la tolerancia de *C. cf. xamachana* y *S. microadriaticum* a elevadas temperaturas y distinto pH.

Los resultados para la P(D) se muestran en la Figura 12. La P(D) se incrementó a un pH de 8.20 y una temperatura de 29 °C. La P(D) decrece con la disminuci3n del pH de 7.50 a 7.20 y al aumento de la temperatura de 30 a 32 °C. Se concluye que las primeras condiciones experimentales mencionadas son las óptimas para incrementar la P(D).

El Análisis de Correlaci3n Múltiple se muestra en la Tabla I. La P(D) evidenci3 efectos de correlaci3n inversos cuando los gradientes de temperatura y pH descendieron; lo inverso se registr3 de manera directa, cuando los gradientes ascendieron. Demostrando así que cuando la temperatura aumenta y el pH disminuye existe una menor densidad de endosimbiontes y viceversa.

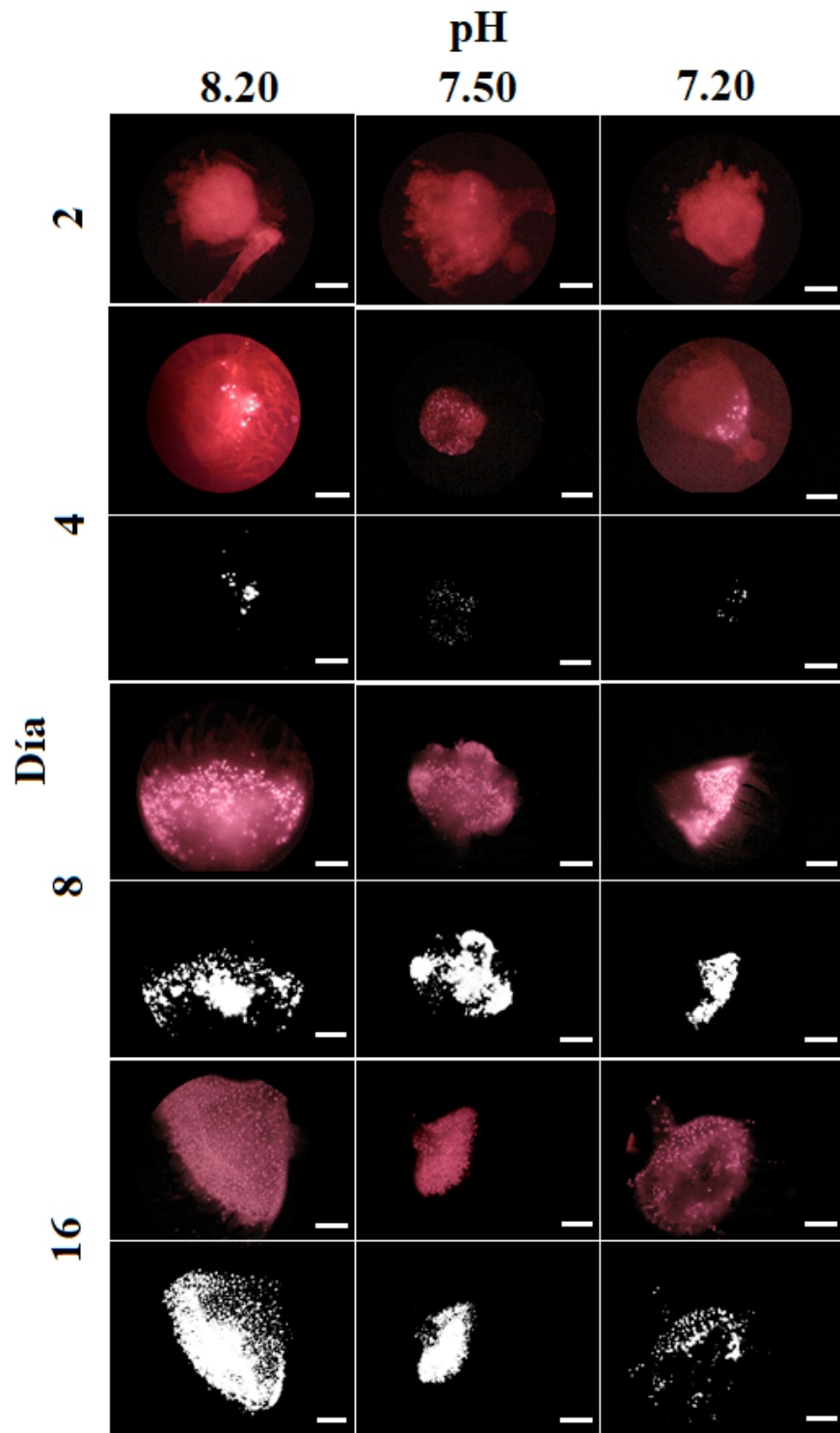


Figura 9.- Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfección de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana* con *S. microadriaticum* a 29 °C y bajo el gradiente de pH evaluado. Las imágenes en blanco y negro muestran el aislamiento de píxeles fluorescentes (endosimbiontes). En las imágenes del día 2 no se realizó un aislamiento de píxeles ya que no presentaron endosimbiontes. La mayor densidad de endosimbiontes se observó a un pH de 8.20. La barra mide 200 μm .

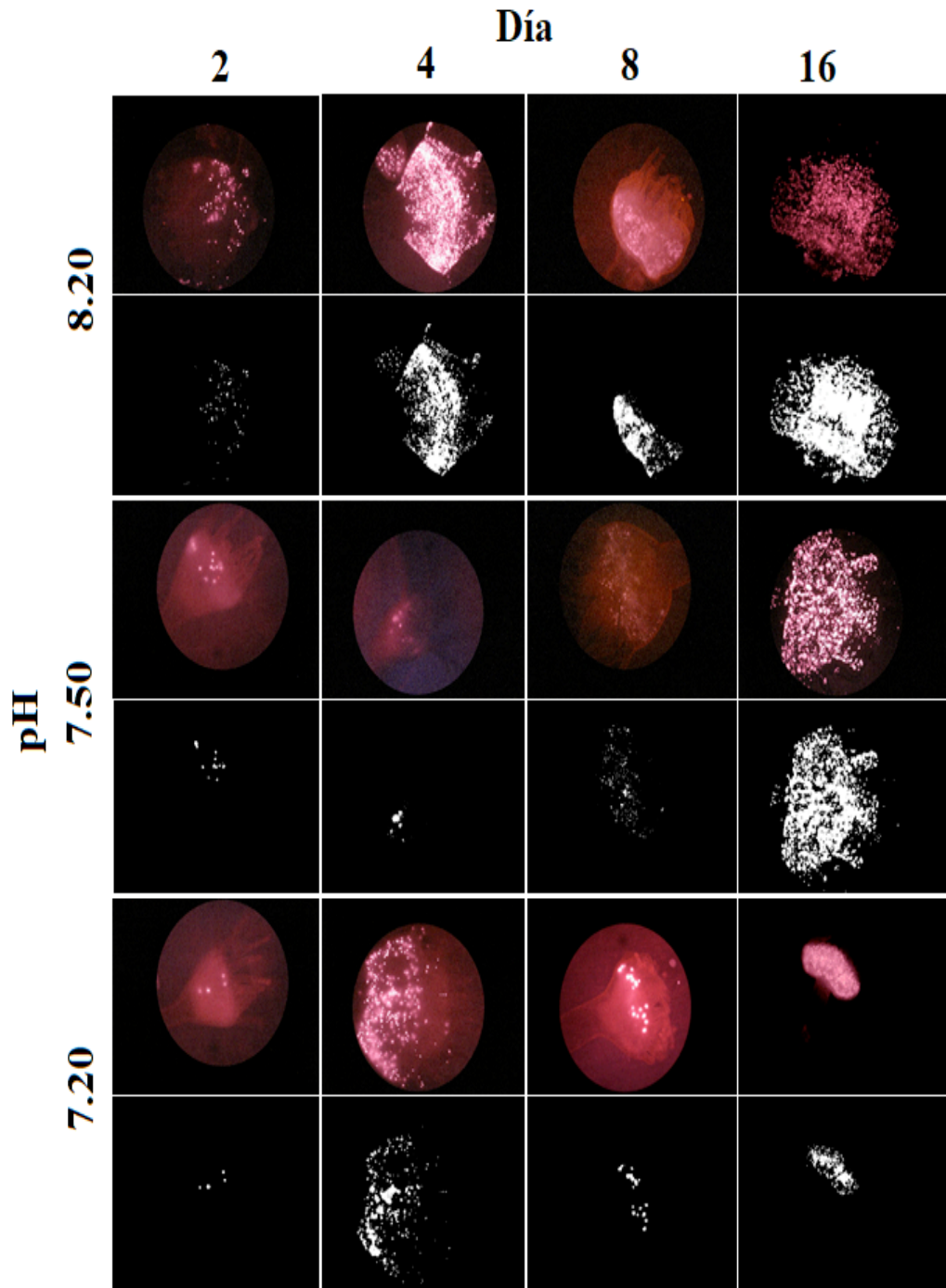


Figura 10.- Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfección de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana* con *S. microadriaticum* a 32 °C y bajo el gradiente de pH evaluado. Las imágenes en blanco y negro muestran el aislamiento de píxeles fluorescentes (endosimbiontes). En todos los casos la densidad comienza a aumentar en el segundo día, al concluir el experimento en el día 16 el pH de 8.20 y 7.50 presentaron una mayor densidad de endosimbiontes, caso contrario sucedió a pH de 7.20. La barra mide 200 μ m.

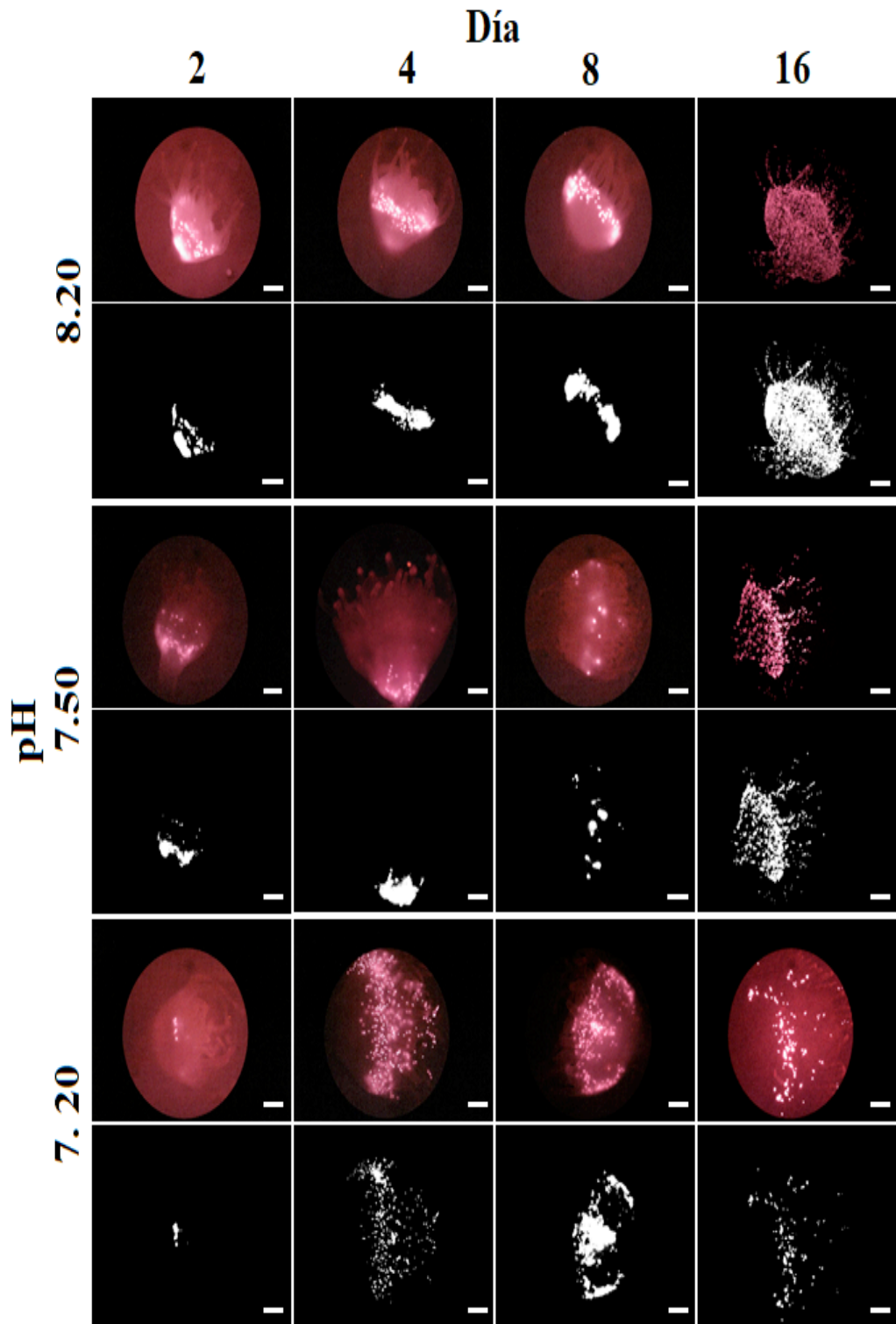


Figura 11.- Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfección de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana* con *S. microadriaticum* a 34 °C y bajo el gradiente de pH evaluado. Las imágenes en blanco y negro muestran el aislamiento de píxeles fluorescentes (endosimbiontes). Al finalizar el experimento se observó una mayor densidad de endosimbiontes a un pH de 8.20 y una menor densidad a un pH de 7.20. La barra mide 200 μ m.

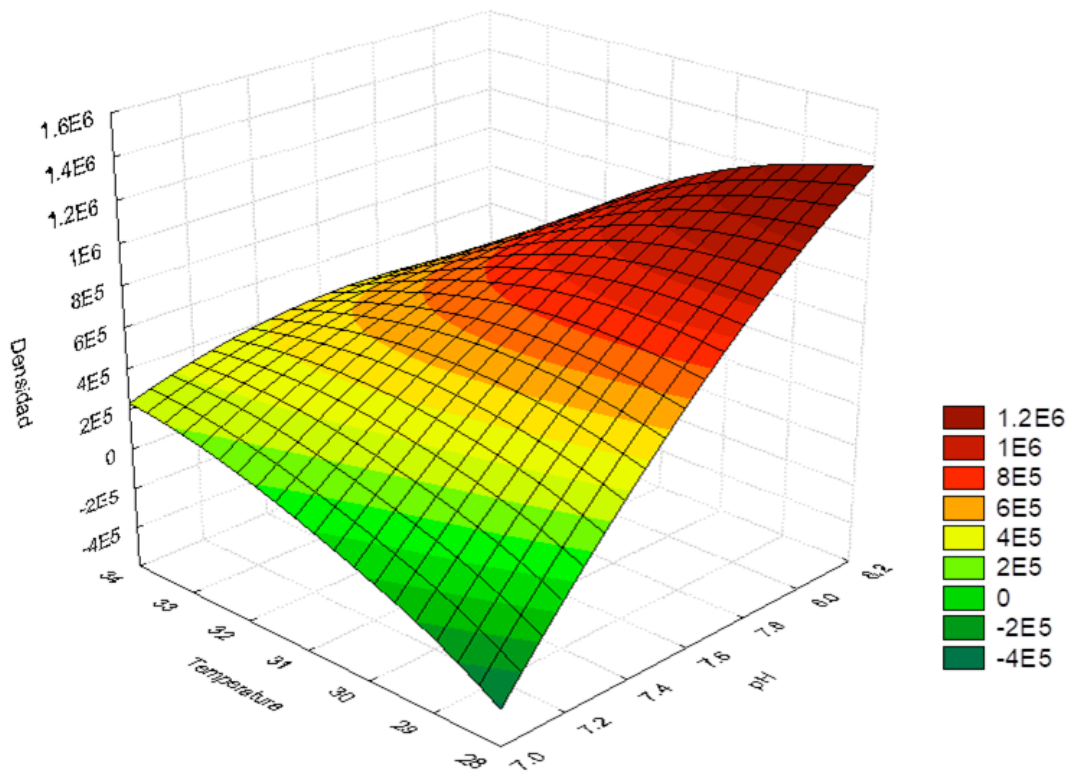


Figura 12.- Tendencias en la P(D) para *S. microadriaticum*, en función de los gradientes experimentales de temperatura y pH. Los colores representan la densidad esperada de endosimbiontes, expresado en forma relativa como cantidad de píxeles blancos.

Tabla I. Correlaciones múltiples entre la P(D) de *S. microadriaticum* y los gradientes experimentales de temperatura y pH.

	pH	Temperatura	Densidad
pH	1.00	0.00	0.75
Temperatura	0.00	1.00	-0.46
Densidad	0.75	-0.46	1.00

Los pólipos de *C. cf xamachana* presentaron una tolerancia a las temperaturas utilizadas, como ya se mencionó en cnidarios esta tolerancia varía con la especie, por eso hay cnidarios con poca tolerancia a cambios menos pronunciados en la temperatura, por ejemplo, corales de *Montastrea faveolata* y *M. franksi* que habitan frente a las costas de Florida, y que se blanquearon cuando la temperatura del mar incrementó a 30 °C (Warner *et al.* 1999). Este cambio de temperatura es menor al que se expusieron los pólipos en este estudio (36.5 y 37 °C); sin embargo, no indujo el blanqueamiento, aunque sí se observó un efecto en el tamaño de los pólipos y sus tentáculos, esta tolerancia puede atribuirse al tipo de hábitat ya que se encuentran en

aguas poco profundas en las que se acumula la radiación solar e incrementan su temperatura (Klein *et al.* 2016). Por ejemplo, en Chelem, un puerto de Yucatán, en verano se ha reportado la presencia de pólipos y medusas de *C. cf xamachana* a temperaturas de hasta 32.9 °C (comunicado personal); es de esperar que la temperatura incrementa cuando disminuye la marea a lo largo del día por ello los resultados obtenidos en este ensayo demuestran una posible adaptación a temperaturas más elevadas.

Respecto a otros trabajos realizados con medusas *Cassiopea*, de igual forma se ha reportado que toleran elevadas temperaturas; por ejemplo, pólipos de *C. cf. xamachana* resisten hasta 34 °C e igualmente presentan disminución en el tamaño de sus tentáculos (Fitt & Costley 1998). Así mismo, se ha documentado que pólipos de esta especie fueron blanqueados y reinfectados con distintas cepas de endosimbiontes a temperaturas de 32 y 34 °C (Newkirk *et al.* 2020). Con base en estos resultados y los obtenidos del ensayo se recomienda realizar experimentos en los cuales los pólipos sean sometidos por tiempo más prolongado a estas temperaturas, con el fin de observar si pueden prosperar ante este estrés.

La tolerancia adquirida a altas temperaturas se puede atribuir a la expresión de HSPs por parte de los pólipos, ya que estas proteínas cambian el balance de las proteínas desnaturalizadas y agregadas a proteínas ordenadas y correctamente plegadas (conformación funcional), particularmente cuando la estructura de las proteínas se ve comprometida por un choque térmico o estrés oxidante (Tang *et al.* 2005). Las HSPs también podrían expresarse en pólipos de *C. cf. xamachana* dado que se ha reportado su expresión en corales, lo que les ha permitido sobrevivir al incremento de temperatura (Brown *et al.* 2002, Rosic *et al.* 2011, Seveso *et al.* 2018, 2020). Además a elevadas temperaturas y latitudes medias también se ha documentado que las HSPs se expresan en distintas cepas de *Symbiodinium* (Wicks *et al.* 2010, Barfield *et al.* 2018), es posible que si los pólipos de *C. cf. xamachana* y sus endosimbiontes están expresando estas proteínas, las posibilidades de sobrevivir y adaptarse a temperaturas por encima de 34 °C incrementen, lo cual resultaría ventajoso para estos organismos. Caso similar ha sucedido en otros cnidarios como, los corales que habitan en aguas poco profundas como *P. daedalea* en el mar del golfo Pérsico, que tienen la capacidad de amortiguar el estrés oxidante por lo que ha sobrevivido a temperaturas entre 33 y 36 °C.

En cuanto a las respuestas de los endosimbiontes, al aumentar la temperatura estos incrementan la producción de ROS ocasionando un daño en el PSII (Lesser 2006, Lupínková & Komenda 2004), y los niveles de ROS producidos dependen de la especie (McGinty *et al.* 2012, Wietheger *et al.* 2018). Por ejemplo, en *Symbiodinium* clado A tolera hasta 30 °C y no se ve afectada la producción de ROS, mientras que en otros clados se produjo una mayor cantidad de ROS en respuesta a esa temperatura (McGinty *et al.* 2012). En el hospedero esto tiene como consecuencia daños a nivel celular (Tchernov *et al.* 2004). Dado que en el ensayo realizado, el restablecimiento de la simbiosis ocurrió exitosamente para todos los ensayos (con temperaturas y pHs diferentes), se infiere que la producción de ROS no fue suficiente elevada como para ocasionar un daño en el PSII, o bien el sistema antioxidativo (enzimas como la SOD de cobre / zinc , SOD de manganeso, SOD de hierro, peroxidasa de ascorbato y catalasa), evitó el daño celular posterior al incremento de ROS (Coles & Brown 2003, Howells *et al.* 2016). Se requiere de mayores estudios para confirmar que existe un daño el PSII; así como del análisis de la actividad de las enzimas antioxidantes mencionadas en *Symbiodinium* (Tchernov *et al.* 2004). También se ha observado que cuando existe un daño en el PSII la proteína D1 se degrada y afecta los procesos de fijación del C (Warner *et al.* 1999), para esto se debe evaluar su integridad.

En relación al uso de los pólipos de *C. cf. xamachana* como modelo para el estudio de la simbiosis cnidario-dinoflagelado se debe tener en cuenta que los distintos hospederos y sus endosimbiontes presentan diferentes tolerancias a elevadas temperaturas, salinidad, pH, hábitats distintos, por lo que para hacer una comparación de las respuestas que presentan los organismos particulares a los estímulos deben tomarse en cuenta estas variables. Por ejemplo, la tasa fotosintética de las distintas especies de *Symbiodinium* cambia en el mismo hospedero u otros cnidarios en respuesta al estrés por calor. Esto indica una clara capacidad de adaptación al aumento de temperatura mediante el intercambio en la composición de endosimbiontes, sobre todo los resistentes a las elevadas temperaturas que son adquiridos mediante una transmisión horizontal posterior a un evento de blanqueamiento (Hidaka 2016).

En conjunto, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la temperatura a 34 °C no es suficiente para afectar el establecimiento de la simbiosis entre *C. cf. xamachana* y *S. microadriaticum*, pero este estrés aunado a otro, como el cambio de pH pueden tener un efecto aditivo negativo en la reinfeción.

Actualmente se ha reportado que el pH está disminuyendo en el océano debido al aumento del CO₂ y a otras actividades como el arribo y descomposición de sargazo, el derrame de aguas contaminadas y químicos, etc. (Harley *et al.* 2006, Doney *et al.* 2009, Van Tussenbroek *et al.* 2017). Aunque en el experimento realizado no utilizamos bombas de CO₂ para ajustar el pH, también se ha utilizado Tris-HCl para probar los efectos de la acidificación en *Mytilus edulis* (Sun *et al.* 2017), en ese trabajo encontraron que no existen diferencias significativas entre el uso de CO₂ y Tris-HCl dado que la producción de ROS se indujo en ambos (Sun *et al.* 2017), por lo que el uso de Tris-HCl es un método eficaz para probar los efectos del pH. Sin embargo, sí se determinó que la acidificación por CO₂ tuvo efectos destructivos más severos en los hemocitos de *M. edulis* que el HCl al mismo nivel de pH, sugiriendo que el CO₂ estresa a las células en vías distintas al incremento de H⁺. Los autores propusieron un mecanismo de respuesta a la acidificación, en el cual la disminución del pH induce la sobreproducción de ROS, lo que daña a los hemocitos y disminuye la fagocitosis. Con base en estos resultados se infiere que la producción de ROS se indujo en *S. microadriaticum* pero no suficiente como para impedir el restablecimiento de la simbiosis, y de haber utilizado CO₂ puede que a un pH de 7.2 la densidad hubiese sido menor a la reportada.

Así mismo Xu *et al.* (2020) también analizaron los efectos de la acidificación con CO₂ y Tris-HCl en *M. edulis*, determinando que la actividad ciliar de las branquias redujo su tasa de filtrado cuando fueron expuestos a un pH de 7.1 regulado con CO₂, acompañado por un aumento en la productividad de ROS. Estos datos coinciden con un posible mecanismo en el cual el pH disminuyó la reinfección de los pólipos debido a que la fagocitosis de los endosimbiontes pudo haber sido afectada por altas concentraciones de ROS; por lo que el restablecimiento de la simbiosis pudo ser más afectada por el pH que por la temperatura dado que en el tratamiento de blanqueamiento los pólipos soportaron temperaturas de 37 °C y no se observó blanqueamiento. Además, en la Fig. 12 se muestra como la P(D) decrece proporcionalmente cuando el pH disminuye lo cual es una evidencia de que los pólipos pueden presentar una menor tolerancia al estrés ocasionado cuando el pH disminuye.

La acidificación por CO₂ también puede afectar otros procesos celulares (Gattuso *et al.* 1999); por ejemplo, se ha reportado que la enzima fosfatasa alcalina tiene una

tolerancia al pH entre 7.5-10.5 (Xu *et al.* 2006). Esta enzima es crucial para la asimilación de fósforo orgánico disuelto, nutriente que se encuentra en el medio (Borowitzka *et al.* 2016). Esto podría explicar por qué a un pH de 7.2 se observó el efecto más negativo en la reinfección. Otra enzima que juega un rol importante en la simbiosis es la AC que permite que el hospedero soporte la fijación de carbono fotosintético (Venn *et al.* 2008). Es posible que esta enzima se haya inhibido en los pólipos de *C. cf. xamachana* dado que a un bajo pH en la anémona *A. viridis* se redujo la expresión de la AC y en los gametofitos de la macroalga *S. japónica* la AC inhibe su actividad externa y la actividad interna incrementa (Urbarova *et al.* 2019, Bi *et al.* 2020). En un futuro tanto en los pólipos como en *Symbiodinium* se podría analizar la expresión o inhibición de estas enzimas bajo diferentes gradientes de pH. También se puede evaluar la producción de metabolitos como glutamato, acetato, betaína, metilguanidina, lisina, sarcosina, glicina, ya que cuando el pH disminuye estos se producen en la medusa *C. barnesi* (Boco *et al.* 2019).

En otras medusas también se ha reportado tolerancia a bajos valores de pH, éfiras (*A. aurita*) y pólipos (*C. barnesi* y *A. nr mordens*) toleraron un pH de 7.6 y 7.7 respectivamente, no obstante redujeron su tamaño y movilidad (Klein *et al.* 2014, Tills *et al.* 2016, Boco *et al.* 2019). En contraste, los pólipos del presente experimento que estuvieron expuestos a un pH de 7.20 no mostraron una reducción significativa comparada con los expuestos a un pH de 8.2, por lo que el pH no influyó visiblemente en el tamaño ni movilidad. En la medusa *A. coerulea* se reportó que un pH de 7.3 no influye en su sobrevivencia ya que presenta una elevada tasa de asentamiento de sus larvas plánulas (Dong & Sun 2018). Aunque en el presente trabajo no se analizó la tasa de asentamiento de las gemas liberadas por los pólipos de *C. cf. xamachana*, se observó que en todos los experimentos establecidos se liberaron gemas, por tanto en un futuro puede analizarse la viabilidad de las gemas así como su tasa de asentamiento en los distintos pH, esto permitirá saber si los pólipos pueden dar lugar a éfiras viables que lleguen a la etapa adulta bajo estas condiciones.

Específicamente en pólipos de la medusa *Cassiopea* sp. se ha reportado que a pH de 7.6 *Symbiodinium* reduce su tasa de fotorrespiración cuando el CO₂ incrementa, lo que presenta ciertas ventajas en cuanto a la tolerancia de otros huéspedes cnidarios no calcificantes (Klein *et al.* 2017). Como ya se mencionó, la acidificación con CO₂ o Tris-HCl tiene efectos similares por lo que es de suponer que el Tris-HCl puede estar

influyendo en la tasa de fotorespiración aunque su efecto sea menor comparado con el causado por CO₂; y es por lo que se encontraron endosimbiontes a un pH de 7.20. La presencia de endosimbiontes en el pH más bajo (7.2) incrementan las probabilidades de que los pólipos de *C. cf. xamachana* sobrevivan y se adapten a medios donde el pH tiende a disminuir. Además, en medusas de *Cassiopea* sp. un pH de 7.6 por sí solo no afecta la densidad de endosimbiontes y se considera una especie tolerante a bajos valores de pH (Weeks *et al.* 2019). Estos resultados permiten corroborar que efectivamente los pólipos de *C. cf. xamachana* toleran bajos valores de pH lo cual le permite adaptarse y sobrevivir a distintos ambientes donde el pH se encuentra en constante variación. Por ejemplo, en las costas donde se acumulan grandes cantidades de sargazo ya que se ha reportado que el pH varía entre 6.9-9.1 (Van Tussenbroek *et al.* 2017)

La presencia de *Symbiodinium* (aunque en menor cantidad) a un pH de 7.20 evidencia la tolerancia de los pólipos a este estrés, si bien no se utilizó CO₂ para ajustar el pH los resultados pueden ser la base para futuros estudios. En cuanto a su uso como modelo de estudio para la reinfección en corales, esta tolerancia a bajos valores de pH puede presentar inconvenientes dado que *Cassiopea* carece de una estructura de CaCO₃ y el CO₂ afecta el crecimiento y calcificación que se ve reflejado en la erosión de sus estructuras pudiendo repercutir en la distribución y abundancia de estas especies (Guinotte & Fabry 2008, Davy *et al.* 2012, Millero 2016). Sin embargo, puede ser utilizada para evaluar las posibles respuestas e interacciones que se presenten en otros cnidarios.

En conjunto, todos los resultados indican que el estrés a la temperatura más alta utilizada en el ensayo de reinfección (34 °C) no es suficiente para afectar la reinfección de los pólipos de *C. cf. xamachana*. Esto fue más evidente cuando se observó que la temperatura solo tuvo un efecto lineal con el pH de 7.5 y 8.2, cuando la población de endosimbiontes disminuyó con respecto a menor pH y mayor temperatura. Sin embargo, a pH de 7.2 se observó el mismo efecto (mínima población de endosimbiontes) en todas las temperaturas analizadas (29, 32 y 34 °C, Fig. 8). Por lo tanto, el posible mecanismo por el que la acidificación afecta el establecimiento de la simbiosis entre *C. cf. xamachana* y *S. microadriaticum* es por la inducción en la producción de ROS, que aumenta conforme disminuye el pH. A pH 7.5, a 32 y 34 °C, la producción de ROS podría incrementar aún más por el estrés causado por el aumento de la temperatura, por lo que se observa un efecto aditivo de pH y

temperatura. A pH 7.2 en todas las temperaturas la cantidad de ROS alcanzaría un nivel en el cual la cantidad de ROS inducido por la temperatura no tiene un efecto aditivo. Las altas concentraciones de ROS afectan la capacidad de las células del hospedero de fagocitar al simbiote, entre otros procesos; a esto se puede añadir efectos en la función de enzimas, tales como la fosfatasa alcalina, lo que finalmente resulta en una disminución en la reinfeción de los pólipos blanqueados.

9. CONCLUSIONES

- Los pólipos de *C. cf. xamachana* y *S. microadriaticum* presentan alta tolerancia a altas temperaturas.
- El uso de mentol a 0.19 mM es letal para los pólipos de *C. cf. xamachana* y *S. microadriaticum* bajo las condiciones utilizadas.
- Los monosacáridos son un método efectivo para obtener pólipos *C. cf. xamachana* blanqueados en poco tiempo (siete días).
- Una temperatura de 29 °C y un pH de 8.2 son las condiciones óptimas para obtener una mayor tasa de reinfeción por *S. microadriaticum*.
- El pH de 7.5 y 7.2 induce una disminución de la reinfeción a 32 y 34 °C.
- Comparado con la temperatura, el pH tiene un mayor efecto negativo en la reinfeción.
- Los pólipos son un modelo ideal para estudiar la simbiosis cnidario-Symbiodiniaceae.

10. REFERENCIAS

- Albright, R. (2018). Ocean acidification and coral bleaching. In *Coral Bleaching* (pp. 295-323). Springer, Cham. DOI: 10.1007/978-3-319-75393-5_12
- Antonio-Martínez, F., Henaut, Y., Vega-Zepeda, A., Cerón-Flores, *et al.* (2020). Leachate effects of pelagic *Sargassum* spp. on larval swimming behavior of the coral *Acropora palmata*. *Scientific reports*, 10(1), 1-13, 10(1):1-13. DOI: 10.1038/s41598-020-60864-z
- Bádenas, B., Aurell, M. (1999). Coral reefs and carbon dioxide concentration: an example on the teaching of climate change. *Enseñanza de las Ciencias de la Tierra*. 7(1):21-28.
- Baird, A. H., Guest, J. R., Willis, B. L. (2009). Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40, 551-571. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120220
- Barfield, S. J., Aglyamova, G. V., Bay, L. K., Matz, M. V. (2018). Contrasting effects of Symbiodinium identity on coral host transcriptional profiles across latitudes. *Molecular ecology*, 27(15), 3103-3115. DOI: 10.1111/mec.14774
- Bi, Y. H., Liang, C. L., Li, J. L., Yin, H., *et al.* (2020). Effects of inorganic carbon concentration and pH on carbonic anhydrase activity of gametophytes of *Saccharina japonica*. *Aquaculture and Fisheries*. DOI: 10.1016/j.aaf.2020.01.003
- Board, O. S., National Research Council. (2010). *Ocean acidification: a national strategy to meet the challenges of a changing ocean*. National Academies Press. National Academies Press.
- Boco, S. R., Pitt, K. A., Melvin, S. D. (2019). Extreme, but not moderate climate scenarios, impart sublethal effects on polyps of the Irukandji jellyfish, *Carukia barnesi*. *Science of The Total Environment*, 685, 471-479. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.451
- Borowitzka, MA, Beardall, J., Raven, JA. (2016). *The physiology of microalgae* (Vol. 6). Cham: Springer. International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-319-24945-2
- Brown, B. E., Bythell, J. C. (2005). Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 291-309. DOI: 10.3354/meps296291

- Brown, B. E., Downs, C. A., Dunne, R. P., Gibb, S. W. (2002). Exploring the basis of thermotolerance in the reef coral *Goniastrea aspera*. *Marine Ecology Progress Series*, 242, 119-129. DOI: 10.3354 / meps242119
- Brusca, R. C., Brusca, G. J. (2003). Invertebrates 2^a ed. Sinauer Associates, Inc Publishers. Sunderland, Massachusetts. 904 pp
- Cabrales-Arellano, P., Islas-Flores, T., Thomé, P. E., Villanueva, M. A. (2017). Indomethacin reproducibly induces metamorphosis in *Cassiopea xamachana* scyphistomae. *PeerJ*, 5, e2979. DOI: 10.7717/peerj.2979
- Cárdenas, A., Neave, M. J., Haroon, M. F., Pogoreutz, *et al.* (2018). Excess labile carbon promotes the expression of virulence factors in coral reef bacterioplankton. *The ISME journal*, 12(1), 59-76. DOI: 10.1038/ismej.2017
- Castillo, R., Montero, R., Amador, J., Durán, A. M. (2018). Cambios futuros de precipitación y temperatura sobre América Central y el Caribe utilizando proyecciones climáticas de reducción de escala estadística. *Revista de climatología*. 18(1): 1-2. <https://hdl.handle.net/10669/75876>
- Chi, J., Parrow, M. W., Dunthorn, M. (2014). Cryptic sex in *Symbiodinium* (Alveolata, Dinoflagellata) is supported by an inventory of meiotic genes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(3), 322-327. DOI: 10.1111/jeu.12110
- Coles, S. L., Brown, B. E. (2003). Coral bleaching capacity for acclimatization and adaptation. DOI: 10.1016/S0065-2881(03)46004-5
- Craig, P., Birkeland, C., Belliveau, S. (2001). High temperatures tolerated by a diverse assemblage of shallow-water corals in American Samoa. *Coral Reefs*, 20(2), 185-189. DOI: 10.1007/s00338010015
- D'Angelo, C., Wiedenmann, J. (2014). Impacts of nutrient enrichment on coral reefs: new perspectives and implications for coastal management and reef survival. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 7, 82-93. DOI: 10.1016/j.cosust.2013.11.029
- Dani, V., Priouzeau, F., Pagnotta, S. *et al.* (2016). Thermal and menthol stress induce different cellular events during sea anemone bleaching. *Symbiosis*, 69(3), 175-192. DOI: 10.1007/s13199-016-0406-y
- Davies, S. W., Ries, J. B., Marchetti, A., Castillo, K. D. (2018). *Symbiodinium* functional diversity in the coral *Siderastrea siderea* is influenced by thermal stress and reef environment, but not ocean acidification. *Frontiers in Marine Science*, 5, 150. DOI: 10.3389/fmars.2018.00150

- Davy, S. K., Allemand, D., Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 26(2), 229-261. DOI: 10.1128/MMBR.05014-11
- Dickson, A. G. (1984). pH scales and proton-transfer reactions in saline media such as sea water. *Geochimica et cosmochimica acta*, 48(11), 2299-2308. DOI: 10.1016/0016-7037(84)90225-4
- Doney S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A. Kleypas J. A. (2009). Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Annual Review of Marine Science*, 1, 169-192. DOI: 10.1146/annurev.marine.010908.163834
- Dong, Z., Sun, T. (2018). Combined effects of ocean acidification and temperature on planula larvae of the moon jellyfish *Aurelia coerulea*. *Marine environmental research*, 139, 144-150. DOI: 10.1016/j.marenvres.2018.05.015
- Downs, CA., Fauth, JE., Halas, JC., Dustan, P., *et al.* (2002). Estrés oxidativo y blanqueamiento de corales estacionales. *Radiología libre y medicina y biología*, 33(4), 533-543. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00907-3
- Dubinsky, Z., Jokiel, P. L. (1994). Ratio of energy and nutrient fluxes regulates symbiosis between zooxanthellae and corals. *Pacific Science*, 48(3), 313-324. https://www.researchgate.net/profile/PaulJokiel/publication/29737481_Ratio_of_Energy_and_Nutrient_Fluxes_Regulates_Symbiosis_between_Zooxanthellae_and_Corals/links/5400be670cf2c48563aeaa66/Ratio-of-Energy-and-Nutrient-Fluxes-Regulates-Symbiosis-between-Zooxanthellae-and-Corals.pdf
- Dunn, S. R., Pernice, M., Green, K., Hoegh-Guldberg, O., Dove, S. G. (2012). Thermal stress promotes host mitochondrial degradation in symbiotic cnidarians: are the batteries of the reef going to run out? *PLoS One*, 7(7), e39024. DOI: 10.1371/journal.pone.0039024
- Eccles, R. (1994). Menthol and related cooling compounds. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(8), 618-630. DOI:10.1111/j.2042-7158.1994.tb03871.x
- Feder, M. E., Hofmann, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual review of physiology*, 61(1), 243-282. DOI: 10.1146/annurev.physiol.61.1.243
- Fisher, P. L., Malme, M. K., Dove, S. (2012). The effect of temperature stress on coral-*Symbiodinium* associations containing distinct symbiont types. *Coral Reefs*, 31(2), 473-485. DOI: 10.1007/s00338-011-0853-0

- Fitt, W. K., Costley, K. (1998). The role of temperature in survival of the polyp stage of the tropical rhizostome jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 222(1-2), 79-91. DOI: 10.1016/S0022-0981(97)00139-1
- Freeman, C. J., Stoner, E. W., Easson, C. G., Matterson, K. O., Baker, D. M. (2016). Symbiont carbon and nitrogen assimilation in the *Cassiopea Symbiodinium* mutualism. *Marine Ecology Progress Series*, 544, 281-286. DOI: 10.3354/meps11605
- Fujise, L., Yamashita, H., Suzuki, G., Sasaki, K., *et al.* (2014). Moderate thermal stress causes active and immediate expulsion of photosynthetically damaged zooxanthellae (*Symbiodinium*) from corals. *PLoS One*, 9(12), e114321. DOI: 10.1371/journal.pone.0114321
- Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand., *et al.* (2011). Adaptations to Endosymbiosis in a Cnidarian-Dinoflagellate Association: Differential Gene Expression and Specific Gene Duplications. *PLoS Genetics*, (7), e1002187. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002187
- Gattuso, J. P., Allemand, D., Frankignoulle, M. (1999). Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral reefs: a review on interactions and control by carbonate chemistry. *American zoologist*, 39(1), 160-183. DOI: 10.1093/icb/39.1.160.
- Gierz, S. L., Forêt, S., Leggat, W. (2017). Transcriptomic analysis of thermally stressed *Symbiodinium* reveals differential expression of stress and metabolism genes. *Frontiers in plant science*, 8:271, DOI: doi.org/10.3389/fpls.2017.00271
- Glynn, P. W. (1991). Coral reef bleaching in the 1980s and possible connections with global warming. *Trends in Ecology & Evolution*, 6(6), 175-179. DOI: 10.1016/0169-5347(91)90208-F
- Grover, R., Maguer, J. F., Allemand, D., Ferrier-Pages, C. (2003). Nitrate uptake in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Limnology and oceanography*, 48(6), 2266-2274. DOI: 10.4319/lo.2003.48.6.2266
- Guinotte, J. M., Fabry, V. J. (2008). Ocean acidification and its potential effects on marine ecosystems. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1134(1), 320-342. DOI: 10.1196/annals.1439.013

- Harley, C. D., Hughes A. R., *et al.* (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9, 228-241. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x
- Haykin, S. (1999). *Neural Networks A Comprehensive Foundations*. Prentice-Hall International, New Jersey. 842 pp
- Hennige, S. J., McGinley, M. P., Grottoli, A. G., Warner, M. E. (2011). Photoinhibition of *Symbiodinium* spp. within the reef corals *Montastraea faveolata* and *Porites astreoides*: implications for coral bleaching. *Marine Biology*, 158(11), 2515-2526. DOI: 10.1007/s00227-011-1752-1
- Hidaka, M. (2016). Life history and stress response of scleractinian corals. In *Coral Reef Science* (pp. 1-24). *Springer*, Tokyo. DOI: 10.1007 / 978-4-431-54364-0_9
- Hofmann, D. K., Kremer, B. P. (1981). Carbon metabolism and strobilation in *Cassiopea andromedea* (Cnidaria: Scyphozoa): Significance of endosymbiotic dinoflagellates. *Marine Biology*, 65(1), 25-33. DOI: 10.1007/BF00397064
- Holland, B. S., Dawson, M. N., Crow, G. L., Hofmann, D. K. (2004). Global phylogeography of *Cassiopea* (Scyphozoa: Rhizostomeae): molecular evidence for cryptic species and multiple invasions of the Hawaiian Islands. *Marine Biology*, 145(6), 1119-1128. DOI: 10.1007/s00227-004-1409-4
- Howells, E. J., Abrego, D., Meyer, E., Kirk, N. L., Burt, J. A. (2016). Host adaptation and unexpected symbiont partners enable reef building corals to tolerate extreme temperatures. *Global change biology*. 22:8. 2702-2714. DOI: 10.1111/gcb.13250
- Hughes, T. P., Kerry, J. Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J. G., *et al.* (2017). Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature*, 543, 373-377. DOI: 10.1038/nature21707
- Jäättelä, M. (1999). Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Annals of medicine*, 31(4), 261-271. DOI: 10.3109/07853899908995889
- Jeon, K. W. (1977). A new method for obtaining aposymbiotic hydra using trimethoprim as a bleaching agent. *Developmental biology*, 59(2), 255-258. DOI: 10.1016/0012-1606(77)90260-3
- Jeong, H. J., Lim, A. S., Yoo, Y. D., Lee, M. J., *et al.* (2014). Feeding by heterotrophic dinoflagellates and ciliates on the free living dinoflagellate

- Symbiodinium* sp.(Clade E). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61(1), 27-41. DOI: :10.1111/jeu.12083
- Karako S., Stambler N., Dubinsky Z. (2004). The Taxonomy and Evolution of the Zooxanthellae-Coral Symbiosis. *In*: Seckbach J. (eds) Symbiosis. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology (541-560), vol 4. DOI: 10.1007/0-306-48173-1_34
- Klein, S. G., Pitt, K. A., Rathjen, K. A., Seymour, J. E. (2014). Irukandji jellyfish polyps exhibit tolerance to interacting climate change stressors. *Global Change Biology*, 20(1), 28-37. DOI: 10.1111/gcb.12408
- Klein, S. G., Pitt, K. A., Carroll, A. R. (2016). Surviving but not thriving: inconsistent responses of zooxanthellate jellyfish polyps to ocean warming and future UV-B scenarios. *Scientific reports*, 6(1), 1-9. DOI: 10.1038/srep28859
- Klein, S. G., Pitt, K. A., Nitschke, M. R., Goyen, S., *et al.* (2017). *Symbiodinium* mitigate the combined effects of hypoxia and acidification on a noncalcifying cnidarian. *Global change biology*, 23(9), 3690-3703. DOI: 10.1111/gcb.13718
- Kline, D. I., Kuntz, N. M., Breitbart, M., Knowlton, N., Rohwer, F. (2006). Role of elevated organic carbon levels and microbial activity in coral mortality. *Marine Ecology Progress Series*, 314, 119-125. DOI: 10.3354/meps314119
- Kopp, C., Pernice, M., Domart-Coulon, I., Djediat, C., *et al.* (2013). Highly dynamic cellular-level response of symbiotic coral to a sudden increase in environmental nitrogen. *MBio* 4. DOI: 10.1128 / mBio.00052-13.
- Kuntz, N. M., Kline, D. I., Sandin, S. A., Rohwer, F. (2005). Pathologies and mortality rates caused by organic carbon and nutrient stressors in three Caribbean coral species. *Marine Ecology Progress Series*, 294, 173-180. DOI: 10.3354/meps294173
- LaJeunesse, T. C. (2017). Validation and description of *Symbiodinium microadriaticum*, the type species of *Symbiodinium* (Dinophyta). *J. Phycol*, 53, 1109-1114. DOI: 10.1111 / jpy.12570
- LaJeunesse, T. C., Parkinson, J. E., Gabrielson, P. W., *et al.* (2018). Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Current Biology*, 28(16), 2570-2580. DOI: 10.1016/j.cub.2018.07.008
- Lapointe, B. E., Brewton, R. A., Herren, L. W., Porter, J. W., Hu, C. (2019). Nitrogen enrichment, altered stoichiometry, and coral reef decline at Looe Key, Florida

- Keys, USA: a 3-decade study. *Marine Biology*, 166(8), 108. DOI: 10.1007/s00227-019-3538-9
- Lehnert, E. M., Mouchka, M. E., Burriesci, M. S., Gallo, *et al.* (2014). Extensive differences in gene expression between symbiotic and aposymbiotic cnidarians. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(2), 277-295. DOI: 10.1534/g3.113.009084
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol*, 68, 253-278. DOI: 10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001
- Li, Y., Wu, Z., Dong, X., Jia, Z., Sun, Q. (2019). Dependency of biological nitrogen fixation on organic carbon in acidic mine tailings under light and dark conditions. *Applied Soil Ecology*, 140, 18-25. DOI: 10.1016/j.apsoil.2019.04.002
- Loram, J. E., Boonham, N., O'toole, P., Trapido-Rosenthal H. G., Douglas, A. E. (2007). Molecular quantification of symbiotic dinoflagellate algae of the Genus *Symbiodinium*. *Maryne biology laboratory*, 212(3), 259-268. DOI: 10.2307/25066608
- Lupínková, L., Komenda, J. (2004). Oxidative Modifications of the Photosystem II D1 Protein by Reactive Oxygen Species: From Isolated Protein to Cyanobacterial Cells. *Photochemistry and Photobiology*, 79(2), 152-162. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2004.tb00005.x
- Mansfield, K. M., Carter, N. M., Nguyen, L., Cleves, P. A., *et al.* (2017). Transcription factor NF- κ B is modulated by symbiotic status in a sea anemone model of cnidarian bleaching. *Scientific reports*, 7(1), 1-14. DOI: 10.1038/s41598-017-16168-w
- Matthews, J. L., Sproles, A. E., Oakley, C. A., Grossman, A. R., *et al.* (2016). Menthol-induced bleaching rapidly and effectively provides experimental aposymbiotic sea anemones (*Aiptasia* sp.) for symbiosis investigations. *Journal of Experimental Biology*, 219(3), 306-310. DOI: 10.1242/jeb.128934
- McGill, C., Pomory, C. M. (2008). Effects of bleaching and nutrient supplementation on wet weight in the jellyfish *Cassiopea xamachana* (Bigelow) (Cnidaria: Scyphozoa). *Marine and freshwater behaviour and physiology*, 41, 179-189: DOI: 10.1080/10236240802369899

- McGinty, E. S., Pieczonka, J., Mydlarz, L. D. (2012). Variations in reactive oxygen release and antioxidant activity in multiple Symbiodinium types in response to elevated temperature. *Microbial ecology*, 64(4), 1000-1007. DOI: 10.1007/s00248-012-0085-z
- McNicholl, C., Koch, M. S., Swarzenski, P. W., Oberhaensli, F. R., Taylor, A., Batista, M. G., & Metian, M. (2020). Ocean acidification effects on calcification and dissolution in tropical reef macroalgae. *Coral Reefs*, 39(6), 1635-1647. DOI: 10.1007/s00338-020-01991-x
- Millero, F. J. (2016). *Chemical oceanography* 4^a ed. Prensa CRC. Taylor y Francis & Group. 594 pp
- Moore, S. J. (1989). Narcotising sea anemones. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 69(4), 803-811. DOI: 10.1017/S0025315400032173
- Newkirk, C. R., Frazer, T. K., Martindale, M. Q. (2018). Acquisition and proliferation of algal symbionts in bleached polyps of the upside-down jellyfish *Cassiopea xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 508, 44-55. DOI: 10.1016/j.jembe.2018.08.010
- Newkirk, C. R., Frazer, T. K., Martindale, M. Q., Schnitzler, C. E. (2020). Adaptation to Bleaching: Are Thermotolerant Symbiodiniaceae Strains More Successful Than Other Strains Under Elevated Temperatures in a Model Symbiotic Cnidarian?. *Frontiers in Microbiology*, 11, 822. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00822
- Ohdera, A. H., Abrams, M. J., Ames, C. L., *et al.* (2018). Upside-down but headed in the right direction: review of the highly versatile *Cassiopea xamachana* system. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6:35, DOI: 10.3389/fevo.2018.00035
- Okazawa, M., Terauchi, T., Shiraki, T., Matsumura, K., Kobayashi, S. (2000). 1-Menthol-induced [Ca²⁺]_i increase and impulses in cultured sensory neurons. *Neuroreport*, 11(10), 2151-2155. DOI: 10.1097/00001756-200007140-00018
- Oliver, T. A., Palumbi, S. R. (2011). Many corals host thermally resistant symbionts in high-temperature habitat. *Coral Reefs*, 30(1), 241-250. DOI: 10.1007/s00338-010-0696-0

- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., *et al.* (2005). La acidificación oceánica antropogénica durante el siglo XXI y su impacto en los organismos calcificadores. *Nature*, 437(7059), 681-686. DOI: 10.1038/nature04095
- Paracer, S., Ahmadjian, V. (2000). *Symbiosis, An introduction to Biological Associations* 2ª ed. Oxford University Press, Inc. New York. 291 pp
- Pérez, C. E. (2013). Caracterización del receptor de la cinasa C activa, Rack 1 en *Symbiodinium* sp. Tesis para obtener el grado de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, posgrado en Ciencias del Mar y Limnología. 74 pp
- Pochon, X., Gates, R. D. (2010). A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 492-497. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.03.040
- Pogoreutz, C., Cárdenas, A., Gärdes, A., Voolstra, C., Wild, C. (2016). Stimulated nitrogen fixation causes coral bleaching in the absence of heat and light stress. *Coral holobiont functioning under global environmental change*, 218 pp
- Pogoreutz, C., Rådecker, N., Cardenas, A., Gärdes, A., Voolstra, C. R., Wild, C. (2017). Sugar enrichment provides evidence for a role of nitrogen fixation in coral bleaching. *Global Change Biology*, 23(9), 3838-3848. DOI: 10.1111/gcb.13695
- Pospíšil, P. (2016). Production of reactive oxygen species by photosystem II as a response to light and temperature stress. *Frontiers in plant science*, 7, 1950. DOI: 10.3389/fpls.2016.01950
- Rodríguez-Martínez, R. E., Medina-Valmaseda, A. E., Blanchon, P., Monroy-Velázquez, *et al.* (2019). Faunal mortality associated with massive beaching and decomposition of pelagic *Sargassum*. *Marine pollution bulletin*, 146, 201-205. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.06.015
- Rojas-Higuera, P. J., Pabón-Caicedo J. D. (2015). Sobre el calentamiento y la acidificación del océano mundial y su posible expresión en el medio marino costero colombiano. *Revista Académica Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(151), 201-217. DOI: 10.18257/raccefyn.135
- Rosic, N. N., Pernice, M., Dove, S., Dunn, S., Hoegh-Guldberg, O. (2011). Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to thermal stress: possible implications

- for coral bleaching. *Cell Stress and Chaperones*, 16(1), 69-80. DOI: 10.1007/s12192-010-0222-x
- Sachs, J. L., Wilcox, T. P. (2006). A shift to parasitism in the jellyfish symbiont *Symbiodinium microadriaticum*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1585), 425-429. DOI: 10.1098/rspb.2005.3346
- Schnepf, E., Elbrächter, M. (1992). Nutritional strategies in dinoflagellates: a review with emphasis on cell biological aspects. *European journal of protistology*, 28(1), 3-24. DOI: 10.1016/S0932-4739(11)80315-9
- Seidgar, M., Mohebbi, F., Nekuiefard, A., Hafezieh, M., *et al.* (2019). The effect of *Artemia urmiana*, Earthworm, Cow heart and concentrate as supplementary diets on skin color and pigmentation of Oscar fish (*Astronotus ocellatus*). *Int. J. of Aquatic Science*, 10(2), 88-93. ISSN: 2008-8019
- Seveso, D., Montano, S., Maggioni, D., Pedretti, F., *et al.* (2018). Diel modulation of Hsp70 and Hsp60 in corals living in a shallow reef. *Coral Reefs*, 37(3), 801-806. DOI: 10.1007/s00338-018-1703-0
- Seveso, D., Arrigoni, R., Montano, S., Maggioni, D., *et al.* (2020). Investigating the heat shock protein response involved in coral bleaching across scleractinian species in the central Red Sea. *Coral Reefs*, 39(1), 85-98. DOI: 10.1007/s00338-019-01878-6
- Shashar, N., Cohen, Y., Loya, Y., Sar, N. (1994). Nitrogen fixation (acetylene reduction) in stony corals: evidence for coral-bacteria interactions. *Marine Ecology Progress Series*, 111(3), 259-264. DOI: 10.3354/meps111259
- Silverthorn, D. U. (2008). Fisiología humana/Human Physiology: *Un enfoque integrado. Incluye Sitio Web/An integrated approach*. Ed. Médica Panamericana. 980 pp
- Somero, G. N. (2002). Thermal Physiology and Vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 780-789. DOI: 10.1093/icb/42.4.780
- Stambler, N. (2011). Zooxanthellae: the yellow symbionts inside animals. In *Coral Reefs: an ecosystem in transition* (pp. 87-106). Springer, Dordrecht. DOI: 10.1007/978-94-007-0114-4_7
- Stat, M., Carter, D., Hoegh-Guldberg, O. (2006). The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts Symbiosis, diversity, and the effect of

- climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolutionary and Systematics*, 8, 23-43. DOI: 10.1016/j.ppees.2006.04.001
- Steen, R. G., Muscatine, L. (1987). Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *The biological bulletin*, 172(2), 246-263. DOI: 10.2307/1541797
- Strychar, K. B., Coates, M., Sammarco, P. W., Piva, T. J. (2004). Bleaching as a pathogenic response in scleractinian corals, evidenced by high concentrations of apoptotic and necrotic zooxanthellae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 304(1), 99-121. DOI: 10.1016/j.jembe.2003.11.023
- Strychar, K.B., Coates, M., Sammarco, P. W., Piva, T. J., Scott, P.T. (2005). Loss of *Symbiodinium* from bleached soft corals *Sarcophyton ehrenbergi*, *Sinularia* sp. and *Xenia* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2, 159-177. DOI: 10.1016/j.jembe.2004.12.039
- Sun, T., Tang, X., Jiang, Y., Wang, Y. (2017). Seawater acidification induced immune function changes of haemocytes in *Mytilus edulis*: a comparative study of CO₂ and HCl enrichment. *Scientific reports*, 7, 41488. DOI: 10.1038/srep41488
- Tang, D., Khaleque, M. A., Jones, E. L., *et al.* (2005). Expression of heat shock proteins and heat shock protein messenger ribonucleic acid in human prostate carcinoma *in vitro* and in tumors *in vivo*. *Cell Stress Chaperones*, 10(1):46-58. DOI:10.1379/csc-44r.1
- Tchernov, D., Gorbunov, M. Y., De Vargas, C., Yadav, *et al.* (2004). Membrane lipids of symbiotic algae are diagnostic of sensitivity to thermal bleaching in corals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13531-13535. DOI: doi.org/10.1073/pnas.0402907101
- Thornhill, D. J., Daniel, W. M., LaJeunesse, T. C., Schmidt, G. W., Fitt, W. K. (2006). Natural infections of aposymbiotic *Cassiopea xamachana* scyphistomae from environmental pools of *Symbiodinium*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 338(1), 50-56. DOI: 10.1016/j.jembe.2006.06.032
- Thornhill, D. J., Howells, E. J., Wham, D. C., Steury, T. D., Santos, S. R. (2017). Population genetics of reef coral endosymbionts (*Symbiodinium*, Dinophyceae). *Molecular Ecology*, 26(10), 2640-2659. DOI: 10.1111/mec.14055

- Tills, O., Sun, X., Rundle, S. D., Heimbach, T., Gibson, T., Cartwright, A., *et al.* (2016). Reduced pH affects pulsing behaviour and body size in ephyrae of the moon jellyfish, *Aurelia aurita*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 480. 54-61. DOI: 10.1016/j.jembe.2016.03.014
- Titlyanov, E. A., Titlyanova, T. V., Leletkin, V. A., Tsukahara, *et al.* (1996). Degradation of zooxanthellae and regulation of their density in hermatypic corals. *Marine Ecology Progress Series*, 139, 167-178. DOI: 10.3354/meps139167
- Urbarova, I., Forêt, S., Dahl, M., Emblem, *et al.* (2019). Ocean acidification at a coastal CO₂ vent induces expression of stress-related transcripts and transposable elements in the sea anemone *Anemonia viridis*. *PloS one*, 14(5), e0210358. DOI: 10.1371/journal.pone.0210358
- Uribe, EA, Archundia, MPF y Luna-Figueroa, J. (2018). El efecto de los alimentos vivos sobre la coloración y el crecimiento en peces guppy, *Poecilia reticulata*. *Ciencias Agrícolas*, 9(02), 171. DOI: 10.4236/as.2018.92013
- Van Tussenbroek, B. I., Arana, H. A. H., Rodríguez-Martínez, R. E., Espinoza-Avalos, J., *et al.* (2017). Severe impacts of brown tides caused by *Sargassum* spp. on near-shore Caribbean seagrass communities. *Marine Pollution Bulletin*, 122(1-2), 272-281. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.057
- Venn, A. A., Loram, J. E., Douglas, A. E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of experimental botany*, 59(5), 1069-1080. DOI:10.1093/jxb/erm328
- Walker, P., Wood, E., (2005). The coral Reef. Facts On File, Inc. Life in the Sea.157 pp
- Wang, J. T., Chen, Y. Y., Tew, K. S., Meng, P. J., Chen, C. A. (2012). Physiological and biochemical performances of menthol-induced aposymbiotic corals. *PLoS One*, 7(9), e46406. DOI:10.1371/journal.pone.0046406
- Wang, J. T., Keshavmurthy, S., Chu, T. Y., Chen, C. A. (2017). Diverse responses of Symbiodinium types to menthol and DCMU treatment. *PeerJ*, 5. e3843. DOI: 10.7717/peerj.3843
- Warner, M. E., Fitt, W. K., Schmidt, G. W. (1996). The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae in hospite from four different species of reef coral: a novel approach. *Plant, Cell & Environment*, 19(3), 291-299. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1996.tb00251.x

- Warner, M. E., Fitt, W. K., Schmidt, G. W. (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: a determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8007-8012. DOI:10.1073/pnas.96.14.8007
- Weeks, C., Meagher, S., Willink, P., McCravy, K. W. (2019). Does seawater acidification affect zooxanthellae density and health in the invasive upside-down jellyfish, *Cassiopea* spp.?. *Invertebrate Biology*, 138(3), e12255. DOI: 10.1111/ivb.12255
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 211(19), 3059-3066. DOI: 10.1242/jeb.009597
- Wicks, L. C., Sampayo, E., Gardner, J. P. A., Davy, S. K. (2010). Local endemism and high diversity characterise high-latitude coral–Symbiodinium partnerships. *Coral reefs*, 29(4), 989-1003. DOI: 10.1007/s00338-010-0649-7
- Wiedenmann, J., D'Angelo, C., Smith, E. G., Hunt, AN., *et al.* (2013). Nutrient enrichment can increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change*. 3(2), 160-164. DOI: 10.1038/nclimate1661
- Wietheger, A., Starzak, D. E., Gould, K. S., Davy, S. K. (2018). Differential ROS Generation in Response to Stress in Symbiodinium spp. *The Biological Bulletin*, 234(1), 11-21. DOI: 10.1086/696977
- Xiang, T., Jinkerson, R. E., Clowez, S., Tran, *et al.* (2018). Glucose-induced trophic shift in an endosymbiont dinoflagellate with physiological and molecular consequences. *Plant Physiology*, 176(2), 1793-1807. DOI: 10.1104/pp.17.01572
- Xiang, T., Lehnert, E., Jinkerson, R. E., Clowez, S., *et al.* (2020). Symbiont population control by host-symbiont metabolic interaction in Symbiodiniaceae-cnidarian associations. *Nature communications*, 11(1), 1-9. DOI: 10.1038/s41467-019-13963-z
- Xu, M., Sun, T., Tang, X., Lu, K., Jiang, Y., Cao, S., & Wang, Y. (2020). CO₂ and HCl-induced seawater acidification impair the ingestion and digestion of blue mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere*, 240, 124821. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124821

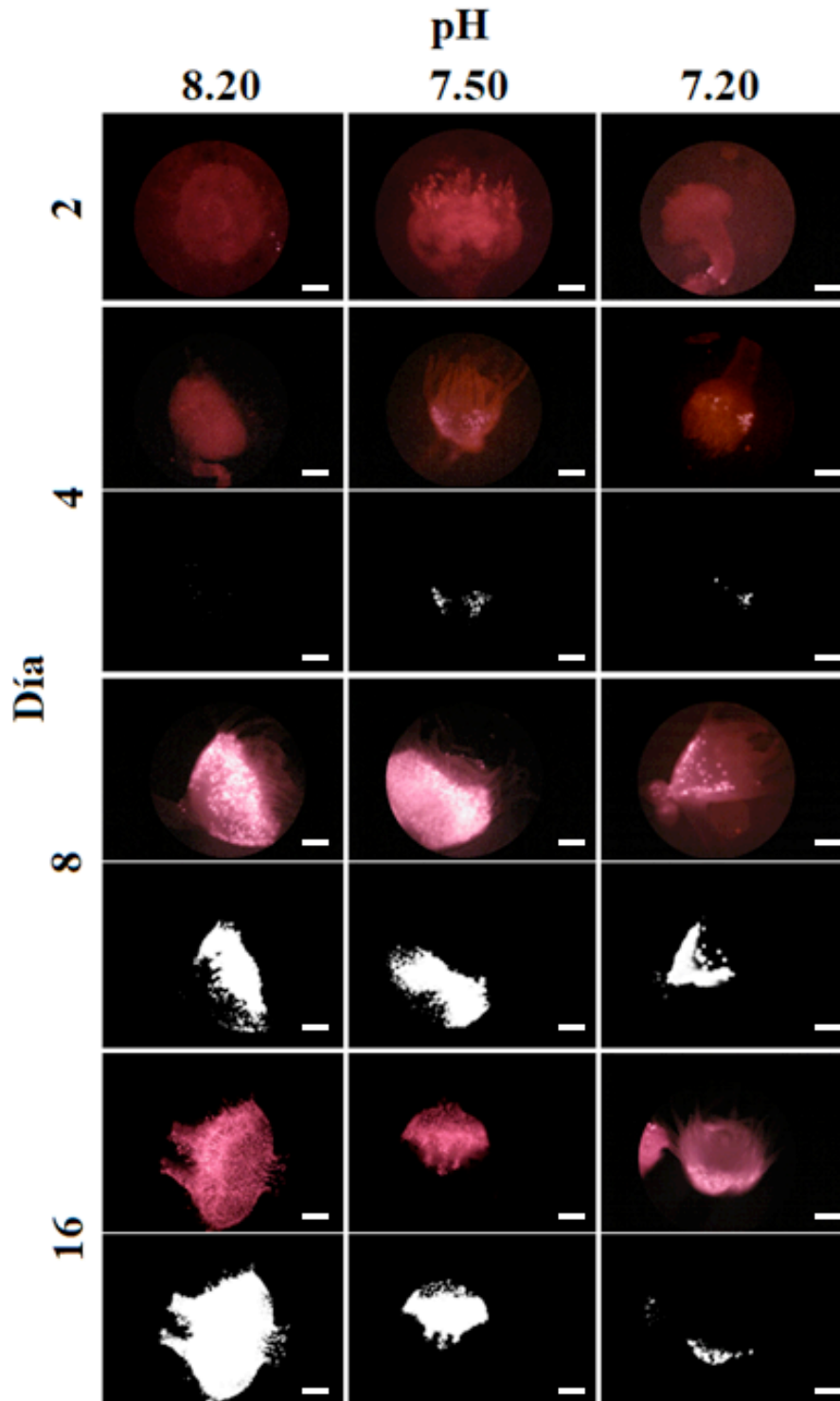
11. ANEXOS

Anexo I. Matriz obtenida a partir de la densidad de píxeles utilizada para la elaboración del modelo lineal de clasificación neuronal.

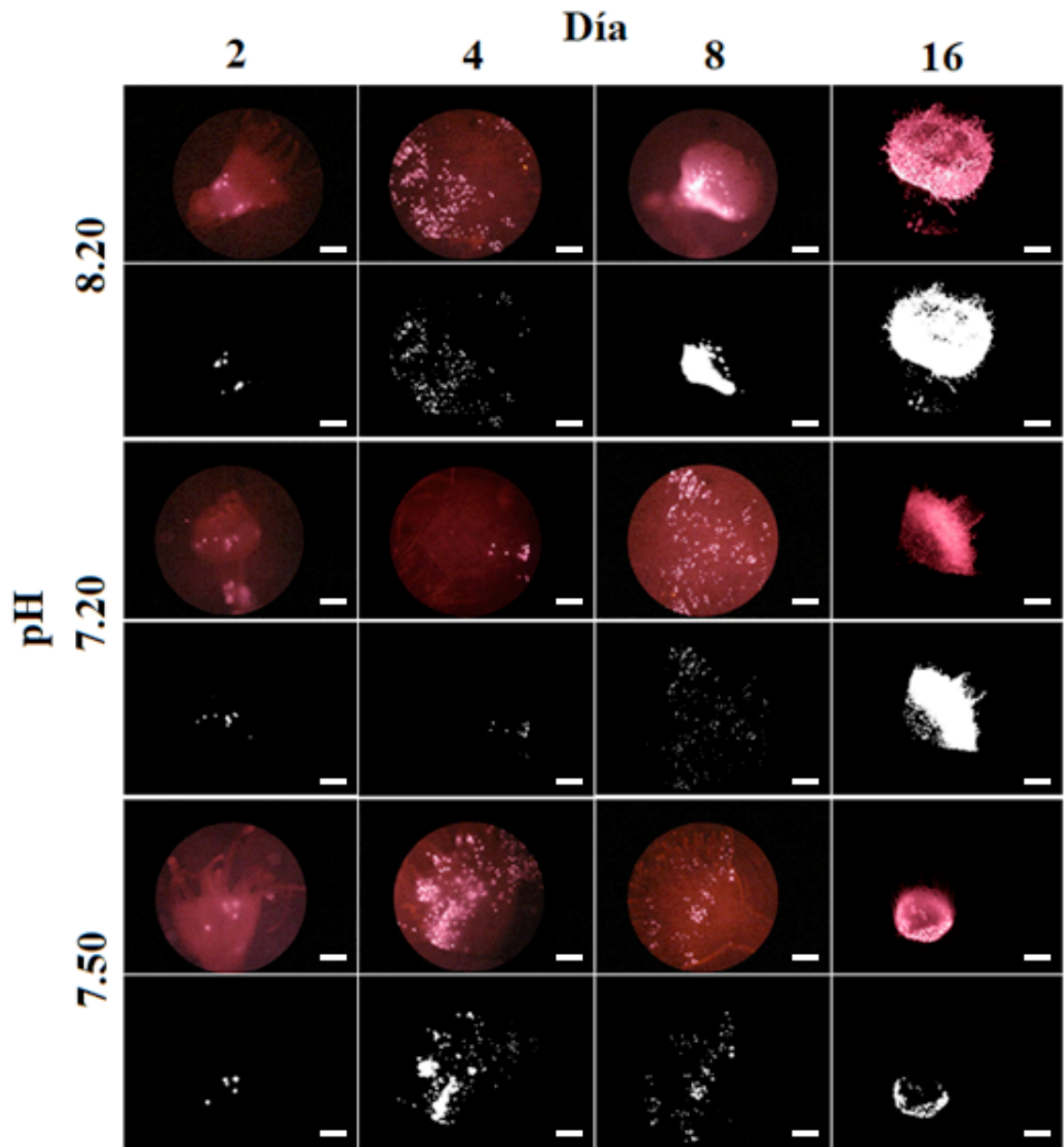
Día	pH	Temperatura	Densidad
2	8,2	29	0
2	8,2	29	0
2	8,2	32	37929
2	8,2	32	32609
2	8,2	34	188148
2	8,2	34	108869
2	7,5	32	0
2	7,5	32	0
2	7,5	32	23595
2	7,5	32	19525
2	7,5	34	145904
2	7,5	34	50347
2	7,2	29	0
2	7,2	29	0
2	7,2	32	10349
2	7,2	32	25699
2	7,2	34	25518
2	7,2	34	121671
4	8,2	29	67915
4	8,2	29	5981
4	8,2	32	27785
4	8,2	32	58158
4	8,2	34	13175
4	8,2	34	18954
4	7,5	32	1211926
4	7,5	32	162170
4	7,5	32	32447
4	7,5	32	13572
4	7,5	34	384685
4	7,5	34	391514
4	7,2	29	322966
4	7,2	29	332307
4	7,2	32	290023
4	7,2	32	259619

4	7,2	34	291666
4	7,2	34	146100
8	8,2	29	1059453
8	8,2	29	1079534
8	8,2	32	1146230
8	8,2	32	1179977
8	8,2	34	491841
8	8,2	34	561886
8	7,5	32	462311
8	7,5	32	507439
8	7,5	32	67413
8	7,5	32	83387
8	7,5	34	54224
8	7,5	34	105277
8	7,2	29	400223
8	7,2	29	675957
8	7,2	32	116464
8	7,2	32	264733
8	7,2	34	702808
8	7,2	34	960409
16	8,2	29	2929579
16	8,2	29	3427624
16	8,2	32	779333
16	8,2	32	927640
16	8,2	34	319215
16	8,2	34	122745
16	7,5	32	2387893
16	7,5	32	2329387
16	7,5	32	2048772
16	7,5	32	1318211
16	7,5	34	191845
16	7,5	34	164593
16	7,2	29	1803964
16	7,2	29	1536711
16	7,2	32	710628
16	7,2	32	840671
16	7,2	34	154077
16	7,2	34	315296

Anexo II. Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfección de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana* con *S. microadriaticum* a 29 °C y bajo el gradiente de pH evaluado. Las imágenes en blanco y negro muestran el aislamiento de píxeles fluorescentes (endosimbiontes). En las imágenes del día 2 no se realizó un aislamiento de píxeles ya que no presentaron endosimbiontes. La mayor densidad de endosimbiontes se observó a un pH de 8.20. La barra mide 200 μ m.



Anexo III. Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfección de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana* con *S. microadriaticum* a 32 °C. Las imágenes en blanco y negro muestran el aislamiento de píxeles fluorescentes (endosimbiontes). En todos los casos la densidad comienza a aumentar en el segundo día, al concluir el experimento en el día 16 el pH de 8.20 y 7.50 presentaron una mayor densidad de endosimbiontes, caso contrario sucedió a pH de 7.20. La barra mide 200 µm.



Anexo IV. Micrografías de epifluorescencia que muestran la cinética de reinfección de pólipos blanqueados de *C. cf. xamachana* con *S. microadriaticum* a 34 °C. Las imágenes en blanco y negro muestran el aislamiento de píxeles fluorescentes (endosimbiontes). Al finalizar el experimento se observaron las diferencias más importantes de densidad de endosimbiontes en un pH de 8.20 y 7.20. La barra mide 200 μm .

