



Universidad Austral de Chile

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

Profesor patrocinante:

Dr. Mauricio Cubillos M.

Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas

Facultad de Ciencias Universidad Austral de Chile

Profesor co-patrocinante:

Dr. Jorge Nimptsch M.

Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas

Facultad de Ciencias Universidad Austral de Chile

Profesor informante:

Dr. Jorge Jaramillo M.

Instituto de Ciencias Marinas y Limnológicas

Facultad de Ciencias Universidad Austral de Chile

**¿SON LOS NIVELES DE SIMBIONTES DETERMINANTES EN LA RESPUESTA FOTO-OXIDATIVA DE LA ANÉMOMA ESTUARINA *Anthopleura hermaphroditica*?:
COMPARACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE EXPULSIÓN GENERADOS BAJO MECANISMOS FÍSICOS Y QUÍMICOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO.**

Tesis de grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciada en Biología Marina y
Título Profesional de **Bióloga Marina**.

PAULA ALEJANDRA MARTIS WINTER

VALDIVIA-CHILE

2019

A mis padres, Beatriz Winter y Julio Martis.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis padres Beatriz y Julio, por otorgarme la Beca Martis-Winter que además de financiar mis estudios de pregrado y darme todo para que mi proceso universitario sea lo más fácil posible, me dieron amor infinito y mucho apoyo en todas mis decisiones. También a mis hermanas por aceptar acompañarme a Calfuco como mis asistentes de trabajo/laboratorio y escucharme todas mis teorías raras sobre ciencia.

Quiero agradecer a mi profesor patrocinante Dr. Mauro Cubillos, que cuando aparecí como una “fugitiva” en su oficina pidiéndole si me recibía como tesista, me aceptó en su laboratorio. Desde entonces agradezco su paciencia para enseñarme en todo el proceso de práctica y tesis, además de su constante preocupación y simpatía conmigo. A Felipe por ayudarme en la realización de mi tesis, fuiste fundamental en todo el proceso puesto que no solo me diste tu apoyo y conocimiento, sino que también tu compañerismo.

Al Dr. Chaparro por otorgarme el espacio y el equipamiento necesario para realizar mis análisis de la tesis. A mis profesores co-patrocinantes Dr. Jorge Nimptsch y Dr. Jorge Jaramillo por ser parte de mi comisión.

A Mauri, Waleska, Felipe, Anto, Illesca y Chilco por todos los cafés y conversaciones que compartimos. Gracias a Toto, Josecilla, Pancho, Pao, López y Sr. Nury por la compañía en Calfuco. Y a Pelao, Tami, Medina, Gladys, Coni y Andrea por sacarme de la burbuja científica.

Especial agradecimiento a Abel Sandaña, por tu apoyo, amistad, cariño, comprensión y fe en mí.

Finalmente agradezco el financiamiento otorgado por el proyecto FONDECYT 11150585.

INDICE

1. RESUMEN	9
2. ABSTRACT.....	11
3. INTRODUCCIÓN	13
3.1 Hipótesis.....	21
4. OBJETIVOS	22
4.1 Objetivo general.....	22
4.2 Objetivos específicos	22
5. MATERIAL Y MÉTODO	23
5.1. Colecta de material biológico	23
5.2. Mecanismos de expulsión de <i>Symbiodinium sp.</i> desde <i>A. hermaphroditica</i>	24
5.2.1. Método físico.....	24
5.2.2. Método químico.....	26
5.2.3 Fotografía post- liberación	27
5.3. Muestras de agua.....	27
5.4 Conteo en Cámara de Neubauer	27
5.5 Agua de mar filtrada (AMF).....	28
5.6 Cultivo de <i>Artemia salina</i>	28
5.7 Diseño experimental – exposición radiación.....	29
5.8. Análisis bioquímicos	33
5.8.1. Determinación de proteínas totales.....	33
5.8.2. Determinación de carbonilos protéicos.....	34

5.8.3. Determinación de peroxidación lipídica	35
5.8.4. Determinación de fenoles totales.....	36
5.8.5. Determinación de capacidad antioxidantes totales	37
5.9. Análisis estadístico.....	38
6. RESULTADOS	39
6.1. Liberación de <i>Symbiodinium</i> sp. desde <i>Anthopleura hermaphroditica</i>	39
6.1.1. Liberación semanal para el método físico.....	39
6.1.2. Liberación semanal para el método químico	41
6.1.3 Liberación semanal para tratamiento físico y químico	43
6.1.4. Niveles de expulsión de zooxantelas	45
6.2. Niveles de simbiosis y respuesta celular frente a la radiación experimental	48
6.2.1. Carboniles proteicos	48
6.2.2. Peroxidación lipídica	50
6.2.3. Fenoles totales	52
6.2.4. Capacidad antioxidante	54
6.2.5 Niveles de fenoles totales y capacidad antioxidante total.....	56
7. DISCUSIÓN	57
7.1 Liberación de <i>Symbiodinium</i> sp. desde <i>Anthopleura hermaphroditica</i>	57
7.2 Respuesta celular frente al estrés por radiación UV-B y su relación con los niveles de simbiosis.....	63
8. CONCLUSIÓN	71
9. REFERENCIAS	72

TABLA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la célula hospedadora (cnidario) siendo infectada por <i>Symbiodinium</i>	14
Figura 2: Sitio de colecta de muestras.	24
Figura 3: Liberación de <i>Symbiodinium</i> por método físico.	25
Figura 4: Liberación de <i>Symbiodinium</i> por método químico.	26
Figura 5: Cámara de Neubauer	28
Figura 6: Estado metanauplio de <i>Artemia salina</i>	29
Figura 7: Resumen del diseño de mantención de <i>A. hermaphroditica</i> previo al experimento.....	32
Figura 8: Concentración de células de <i>Symbiodinium</i> expulsadas [cél/ml] para cada semana del tratamiento físico (barras negras) y control (barras blancas) durante las 8 semanas.	40
Figura 9: Concentración de células de <i>Symbiodinium</i> expulsadas [cél/ml] para cada semana del tratamiento químico (barras negras) y control (barras blancas) durante las 8 semanas.....	42
Figura 10: Concentración de células de <i>Symbiodinium</i> expulsadas [cél/ml] para cada semana del tratamiento físico (A) y tratamiento químico (B) durante las 8 semanas.	44
Figura 11: <i>Anthopleura hermaphroditica</i> en tres niveles de simbiosis	46
Figura 12: juveniles de <i>Anthopleura hermaphroditica</i> expulsadas de individuos adultos	47
Figura 13: Niveles de Carboniles proteicos ($\mu\text{mol carbonil} / \text{mg proteína}$).....	49
Figura 14: Niveles de peroxidación lipídica ($\text{nmol MDA g PF}^{-1}$)	51
Figura 15: Niveles de fenoles totales ($\text{mg AG Eq}^* \text{ g PF}^{-1}$).....	53
Figura 16: Niveles de capacidad antioxidante ($\text{mg Trolox Eq}^* \text{ g PF}^{-1}$).....	55
Figura 17: Correlación de Pearson.....	56
Figura 18: Mecanismos celulares de pérdida de simbiontes	60

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Especies utilizadas en experimentos de liberación de zooxantelas.....	20
Tabla 2: Diseño experimental para exposición a radiación.....	30

ABREVIATURAS

PAR = Radiación fotosintéticamente activa

UV-R = Radiación ultravioleta

UV-A = Radiación ultravioleta A

UV-B = Radiación ultravioleta B

ROS = Especies reactivas de oxígeno

SOD = Superóxido dismutasa

CAT = Catalasa

GPO_x = Glutatión peroxidasa

Gr = Glutatión reductasa

GSH = Glutatión

Rab5 = Proteína Rab

AMF = Agua de mar filtrada

MeOH = Metanol

PBS = Solución salina amortiguada por Fosfato

PvPP = Polivinilpolipirrolidona

EDTA = Ácido etilendiaminotetraacético

BCA = Ácido Bicinconinico

HCl = Ácido clorhídrico

DNPH = 2,4-dinitrofenilhidracina

DPPH = 2,2 -difetil-1-picrilhidrazilo

TCA = Ácido tricloroacético

TBA = Ácido tiobarbitúrico

Na₂CO₃ = Carbonato de sodio

RPM = Revoluciones por minuto

HSP = Proteínas de choque térmico

CPDs = Dímeros ciclobutano pirimidina

MAA = Micosporinas del tipo aminoácido

RUBISCO = Enzima ribulosa-1,5-bisfosfato
carboxilasa/oxigenasa

¹O₂ = Oxígeno singlete

O₂⁻ = Radical superóxido

OH⁻ = Radical hidroxilo

H₂O₂ = Peróxido de hidrógeno

MDA = Malondialdehido

1. RESUMEN

La relación simbiótica entre cnidarios y el dinoflagelado atecado *Symbiodinium sp.* (zooxantelas) se fundamenta en procesos nutricionales, basada en el intercambio de nutrientes por productos de desecho metabólico que es generado entre la célula animal y vegetal. La interrupción de la simbiosis en cnidarios es un proceso conocido como “blanqueamiento”, que implica un quiebre en el balance simbiótico, el cual conlleva la expulsión del simbiote desde la célula animal, implicando la pérdida de los pigmentos fotosintéticos por parte del cnidario. Para entender la influencia del blanqueamiento ante la exposición a distintas bandas de radiación ambiental (PAR y UVR) en la anémona simbiote estuarina *Anthopleura hermaphroditica*, se obtuvieron experimentalmente individuos con bajos niveles de simbiosis (casi aposimbiosis) por medio de un tratamiento físico (shock térmico) y un tratamiento químico (mentol + metanol). El experimento consistió en exponer a individuos con altos y bajos niveles de simbiosis (i.e. tratamiento físico y químico) a dos niveles de radiación: PAR y PAR+UV-B durante 6 y 12 horas. Posteriormente, se realizaron análisis bioquímicos a las anémonas (alto y bajo niveles de simbiosis) expuestas a radiación para identificar los niveles de daño oxidativo a las proteínas y lípidos, además de la capacidad para evitar el daño por medio de capacidad antioxidante total y fenoles totales.

Los individuos expuestos a tratamientos de blanqueamiento por medio físico y químico expulsaron 97% y 93% más que sus respectivos controles (Mann-Whitney U -test $P = < 0,05$), mientras que no se observó diferencia significativa entre los dos tratamientos (Mann-Whitney U -test: $z = -1,599$, $P = 0,109$). En cuanto a los análisis bioquímicos el tiempo de exposición es determinante en los niveles de daño oxidativo (proteínas y lípidos) y en la síntesis de fenoles totales (Tukey, $p = < 0,05$). Se pudo identificar mayor pérdida de pigmentación y simbiosis por

parte de los individuos tratados a través del método físico. Independiente del tratamiento de expulsión de simbiontes utilizado, anemonas con bajos niveles de zooxantelas son más susceptibles a la radiación UV-B, que los organismos con altos niveles de simbiontes. Los organismos con altos niveles de zooxantelas se ven beneficiados puesto que pueden utilizar los compuestos fotoprotectores y antioxidantes sintetizados por las zooxantelas. Adicionalmente el daño oxidativo que no diferenció entre condición simbiótica posiblemente se ve originado por la foto-oxidación en los pólipos inducida principalmente por cromóforos presentes en la célula.

2. ABSTRACT

The symbiotic relationship between cnidarians and the atecated dinoflagellate *Symbiodinium sp.* (zooxanthellae) is based on nutritional processes, where an exchange of nutrients by metabolic waste products is generated between the animal and vegetal cells. The interruption of symbiosis in cnidarians is a process commonly known as "bleaching", which implies a break in the symbiotic balance which finally conduces to the expulsion of the symbiont from the animal cell, entailing the loss of photosynthetic pigments by the cnidarian. In order to understand the influence of bleaching on exposure to different radiation bands (PAR and UVR) in the sea anemone *Anthopleura hermaphroditica*, individuals with low levels of symbionts (almost aposymbionts) were obtained experimentally through a physical- (thermal shock) and a chemical treatment (menthol + methanol). Sea anemones with high and low levels of symbionts (physical or chemical treatment) were exposed to two radiation levels of PAR and PAR + UV-B for 6 and 12 hours. Subsequently, biochemical analyzes were performed on anemones (symbionts and aposymbiont) exposed to radiation in order to identify the levels of oxidative damage to proteins and lipids. Additionally, total antioxidant capacity and total phenols were also determined.

Individuals exposed to bleaching treatments through physical and chemical methodologies expelled 97% and 93% more than their respective controls respectively (Mann-Whitney U-test $P = <0,05$), while no significant difference was observed between the two treatments (Mann-Whitney U-test: $z = -1,599$, $P = 0,109$). Regarding the biochemical analyses, the exposure time was determinant in the levels of oxidative damage (proteins and lipids) and in the synthesis of total phenols (Tukey, $p = < 0,05$). Higher loss of pigmentation and symbionts could be identified by individuals treated through the physical method. Independent of the expulsion treatment of symbionts used, anemones with low levels of zooxanthellae are more susceptible to UV-B

radiation than organisms with high levels of symbionts. Thus, the presence of symbionts in the animal cell can be considered as a benefit since they can synthesize photoprotective and antioxidant compounds that might be transferred to the animal cell. Additionally, oxidative damage that did not differentiate between symbiotic conditions is possibly caused by photo-oxidation in anemones induced mainly by chromophores present in the cell.

3. INTRODUCCIÓN

Symbiodinium sp. es un género de dinoflagelado atecado, conocido como zooxantela, que se encuentra presente de forma endosimbiótica en varios organismos marinos como protistas, poríferas, moluscos y en más de la mitad de los cnidarios (Wang *et al.*, 2017, Allemand & Furla, 2018). Particularmente, en este último grupo taxonómico, *Symbiodinium* ha desarrollado una interacción endosimbiótica mutualista (Paxton *et al.*, 2013), puesto que el hospedador (cnidario) y huésped (zooxantela) se benefician mutuamente debido a la asociación (Rosenberg & Loya, 2013). *Symbiodinium*, se encuentra principalmente en las células que conforman la gastrodermis de las anémonas, distribuyéndose principalmente en tentáculos y mesenterios de la cavidad gastrovascular de este tipo de cnidarios (Weis, 2008). La adquisición de zooxantelas en este tipo de organismo puede originarse a través de una vía vertical u horizontal durante los estadios iniciales del desarrollo. La primera estrategia, implica la transferencia de los simbiontes desde el progenitor a la progenie, mientras que, la transmisión horizontal de las microalgas implica que el cnidario adquiera la zooxantela por medio del ambiente, siendo esta última estrategia utilizada por aproximadamente el 85% de los cnidarios simbiontes (Thornhill *et al.*, 2006, Furla *et al.*, 2011, Cowlin, 2012). Adicionalmente en ciertas especies del género *Hydra*, la simbiosis se genera con la microalga *Chlorella sp.* (Yellowlees *et al.*, 2008).

Básicamente, la relación cnidario-dinoflagelado se sustenta en el contexto nutricional (Weis, 2008), donde el balance simbiótico permite el flujo de energía entre el hospedador (anémona) y el hospedero (simbionte) (Roopin *et al.*, 2008). Considerando lo anterior, es fundamental el transporte de carbono inorgánico a través del tejido, ya que el CO₂ producido por la respiración del hospedador y sus productos de degradación metabólica son reciclados por la microalga (Weis, 2008, Yellowlees *et al.*, 2008, Rosenberg & Loya, 2013). En este sentido, el dinoflagelado

recurre a la radiación solar para realizar fotosíntesis, utilizando como nutrientes los productos de desecho metabólicos del hospedador, con la finalidad de generar hidratos de carbono, glicerol y maltosa (Venn *et al.*, 2008, Gordon & Leggat, 2010). Por su parte, estos compuestos son translocados al hospedador, quien los utiliza para su beneficio y llevar a cabo funciones propias del metabolismo, otorgando adicionalmente un ambiente estable que permita refugio (Brown, 1997, Davy *et al.*, 2012, Rosenberg & Loya, 2013, Dani *et al.*, 2016).

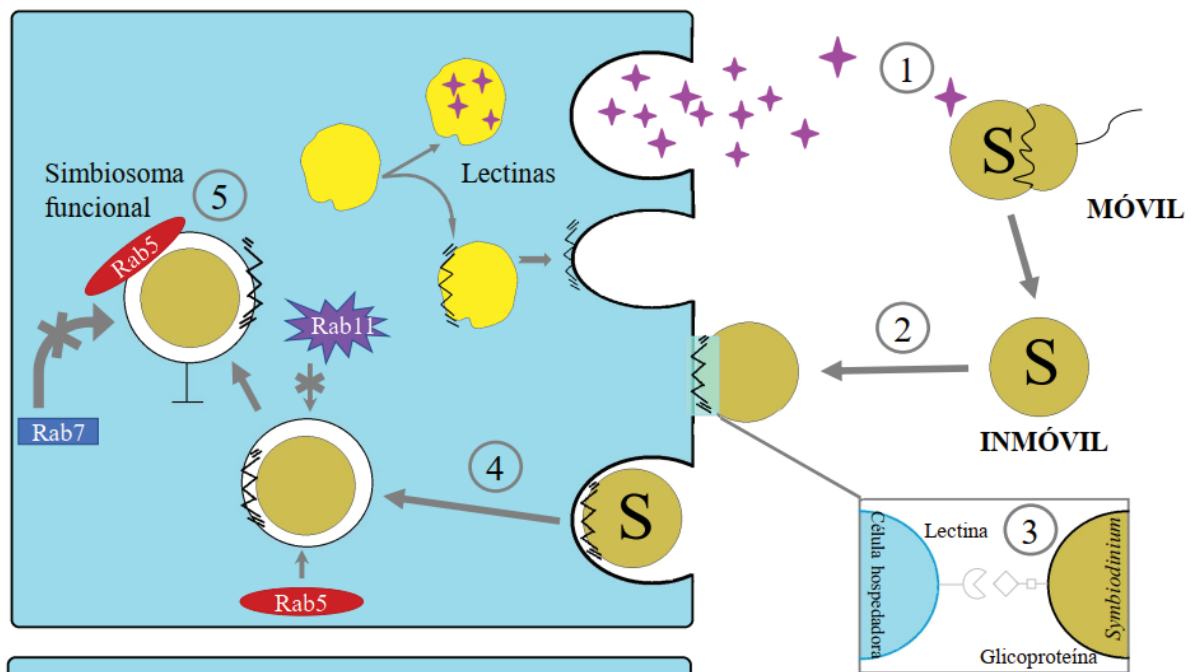


Figura 1: Esquema de la célula hospedadora (cnidario) siendo infectada por *Symbiodinium*. (1) La lectina secretada por el hospedador induce al alga móvil a progresar a un estado inmóvil (cisto). (2) La fase inmóvil (cisto) de *Symbiodinium* entra en la cavidad gastrodermal del hospedador. (3) El contacto y reconocimiento entre hospedador-huésped se logra por la unión de lectina presente en la superficie de la célula hospedadora y la glicoproteína presente en superficie del *Symbiodinium* inmóvil. (4) *Symbiodinium* es fagocitado y direccionada al compartimiento endocítico temprano. (5) A través de la unión y retención de Rab5 *Symbiodinium* logra un simbiosoma funcional (Modificada de Fransolet *et al.*, 2012).

Consecuentemente, la relación simbiótica entre hospedador y hospedero, genera cambios en el comportamiento del cnidario (Furla *et al.*, 2011), puesto a que esta condición obliga a este tipo de cnidarios a vivir en aguas dentro de la zona fótica, con el objetivo de que sus hospederos puedan fotosintetizar (Safaie *et al.*, 2018). Así, vivir en aguas cercanas a la superficie implica transportar a través de su tejido carbono inorgánico (Ci), nitrógeno (NH_3 , N_2 , o NO_3), fosfato y otros nutrientes inorgánicos (Yellowlees *et al.*, 2008, Furla *et al.*, 2011). Para mantener la relación simbiótica tanto los dinoflagelados como el cnidario han adaptado y desarrollado estructuras celulares que ayudan a controlar las actividades metabólicas (Yellowlees *et al.*, 2008, Fransolet *et al.*, 2012). Es así como una serie de membranas de origen algal y una exterior derivada del hospedador forman el simbiosoma que es un compartimiento simbiótico intracelular que ayuda a manipular el tráfico endosomal entre el hospedador-hospedero (Figura 1) (Yellowlees *et al.*, 2008, Dani *et al.*, 2016).

En términos sistemáticos, la simbiosis a través de *Symbiodinium* en corales y anémonas está representada por 9 clados identificados con letras entre A-I (Rowan *et al.*, 1997, Belda-Baillie *et al.*, 2002, Cowlin, 2012, Wang *et al.*, 2017, Gabay *et al.*, 2018). Particularmente, el clado A y B son comunes en cnidarios de aguas superficiales (Rowan *et al.*, 1997), mientras el clado C es predominante en cnidarios que se encuentran a mayor profundidad, (Rowan *et al.*, 1997, LaJeunesse *et al.*, 2018). Cada clado de *Symbiodinium* posee características particulares, por ejemplo, el clado A se caracteriza por estar adaptada para vivir en condiciones con alta radiación, mientras el clado B puede tolerar altas y bajas temperaturas (LaJeunesse *et al.*, 2018). Mientras que en el clado C, gran parte de las especies asociadas presentan sensibilidad térmica, mientras el clado D se presenta en cnidarios que se encuentra en ambientes estresantes por lo que son termotolerantes y soportan la turbidez (Stat & Gates, 2011, LaJeunesse *et al.*, 2018).

Considerando las características específicas de cada clado, es que algunas especies de cnidarios han optado por poseer más de un clado, de esta forma pueden abarcar un mayor rango de distribución batimétrica, ambiental y/o en zonas geográficas otorgando mayor resistencia frente a condiciones ambientales fluctuantes (Silverstein *et al.*, 2012).

Dependiendo de las condiciones ambientales a las que esté expuesta el hospedador, predominará un clado de *Symbiodinium sp.* sobre los demás (Rowan *et al.*, 1997). La relación cnidario-zooxantela posee una tendencia de fidelidad hacia el clado o clados que posean, pues se ha observado que organismos de la misma especie en diferentes profundidades y/o ambientes poseen *Symbiodinium* del mismo clado (Cowlin, 2012). Por último, como cada clado tiene distintas respuestas a los factores ambientales y químicos, tener distintos clados alojados en el interior de la célula animal, podría favorecer al hospedador ante eventos de estrés ambiental (Rowan *et al.*, 1997, Belda-Baillie *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2017). Aunque la presencia de dos o más clados de simbioses en un solo organismo representa una ventaja fisiológica, durante la década del 80, investigadores reportaron por primera vez el hecho que cambios drásticos en las condiciones ambientales sobre los límites de tolerancia fisiológicos, podía inducir la pérdida significativa de las microalgas (*Chlorella sp.*) o dinoflagelados simbioses (Goreau & Hayes, 1994, Venn *et al.*, 2008). Este proceso, fue descrito por Glynn (1983) como “blanqueamiento”, lo cual implica un quiebre en el balance simbiótico, proceso que termina con la expulsión del simbiote desde la célula animal (Furla *et al.*, 2011, Dani *et al.*, 2016, Safaie *et al.*, 2018). Consecuentemente, este proceso genera una disminución en el aporte energético al pólipo, lo que posteriormente lleva al animal a un estado de inanición, lo que en el corto plazo puede provocar la muerte del cnidario (Barott *et al.*, 2015, Brown *et al.*, 2018).

Se ha descrito que los eventos de blanqueamiento se originan debido al estrés provocado por el repentino cambio en los niveles de salinidad, temperatura, radiación ambiental (UV-B y PAR), compuestos tóxicos y/o xenobióticos (Brown, 1997, Weis, 2008, Rosenberg & Loya, 2013, Matthews *et al.*, 2016, Rehman *et al.*, 2016, Ros *et al.*, 2016, Corinaldesi *et al.*, 2018, Safaie *et al.*, 2018). Por lo tanto, dicha situación genera un aumento en las tasas respiratorias y/o fotosintéticas lo cual puede generar una excesiva producción de electrones, los cuales se asocian al oxígeno molecular para formar compuestos citotóxicos conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS) entre los cuales se destacan el radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), hidroxil radical (HO^\cdot) entre otros (Nii & Muscatine, 1997, Paxton *et al.*, 2013, Gundlach & Watson, 2019). Cuando el estrés ambiental es elevado, existe una acumulación en los niveles de ROS, las cuales superan la capacidad de remoción por parte de enzimas (e.g. SOD, CAT, GPox, Gr) y compuestos antioxidantes (e.g. GSH, fenoles, ascorbato, tocoferoles) (Núñez-Pons *et al.*, 2018), generándose daño oxidativo a macromoléculas como lípidos, proteínas y DNA afectando la homeostasis celular (Nii & Muscatine, 1997, Belda-Baillie *et al.*, 2002, Lesser, 2006, Weis, 2008, Furla *et al.*, 2011, Safaie *et al.*, 2018). Particularmente, se ha documentado que elevados niveles de radiación PAR (>400 – 700 nm) y UV-B (>280 – 320 nm) pueden inducir elevados niveles de ROS en la célula simbiote, generando problemas fisiológicos (Weis, 2008).

Investigaciones previas relacionadas con eventos de blanqueamiento en cnidarios se han llevado a cabo utilizando especies marinas de zonas tropicales (tabla 1), siendo *Aiptasia sp.* la principal especie utilizada en este tipo de estudios (Matthews *et al.*, 2016). Aproximaciones experimentales han determinado en otras especies la respuesta de expulsión de los simbiontes bajo condiciones de obscuridad, temperatura, radiación UV-R y agentes químicos (tabla 1).

Sin embargo, solo algunos estudios profundizan en determinar como la falta de simbiontes puede afectar la fisiología de este tipo de organismos.

Particularmente, en el sur de Chile se desarrolla la anémona intermareal *Anthopleura hermaphroditica*, cnidario hermafrodita de pequeño tamaño (≈ 12 mm altura) la cual establece una relación de endosimbiosis con el dinoflagelado del género *Symbiodinium sp.* (Spano *et al.*, 2013), alojándose principalmente en los tentáculos (coloración café-amarilla) y parte superior de la columna corporal. En términos reproductivos, los individuos de esta especie son hermafroditas y se ha observado reproducción asexual por fisión longitudinal (Schories *et al.*, 2011, Spano *et al.*, 2013). Ésta especie habita principalmente zonas protegidas y semi-protegidas del intermareal fangosos-arenoso y rocoso hasta los 20 m de profundidad (Häussermann & Försterra, 2009), distribuyéndose desde Antofagasta hasta el Archipiélago de Chonos, habitando planicies inter y submareales, así como también zonas de estuarios en el sur de Chile alcanzando densidades de hasta 10.000 individuos m^{-2} (Schories *et al.*, 2011, Spano *et al.*, 2013). La alta plasticidad fenotípica que posee esta especie de cnidario le permite vivir en zonas de estuarios, que presentan fluctuaciones significativas en los niveles de salinidad, temperatura y radiación ambiental (Cubillos *et al.*, 2018). Aunque es sabido que la expulsión de simbiontes es una respuesta adaptativa para minimizar los niveles de daño celular en organismos como corales y anémonas expuestos a elevados niveles de estrés ambiental, actualmente no existe información sobre este tipo de respuestas en anémonas de estuario, las cuales están aclimatadas a constantes fluctuaciones en las condiciones ambientales (Cubillos *et al.*, 2018). En este sentido, el estudio sobre la respuesta de expulsión de simbiontes (blanqueamiento) y los efectos celulares que esta situación pueda generar en anémonas de estuario, podría indicarnos si la simbiosis en este tipo de

organismos puede entenderse como una ventaja o desventaja cuando ellos son expuestos a niveles experimentales de radiación UV-B.

Tabla 1: Especies utilizadas en experimentos de liberación de zooxantelas

Especie	Ecosistema	Hábitat	Estresor	Referencia
<i>Acropora aspera</i>	Marino	Templado a Tropical	Temperatura	Middlebrook <i>et al</i> 2008
<i>Aiptasia sp.</i>	Marino	Templado a Tropical	Obscuridad + Inhibidor fotosíntesis	Shoenberg & Trench 1980
<i>Aiptasia pulchella</i>	Marino	Templado a Tropical	Obscuridad + Temperatura	Steen 1986
<i>Aiptasia pulchella</i>	Marino	Templado a Tropical	Obscuridad + Temperatura	Steen & Muscatine 1987
<i>Aiptasia pulchella</i>	Marino	Templado a Tropical	Obscuridad + Temperatura	Wang & Douglas 1998
<i>Aiptasia sp.</i>	Marino	Templado a Tropical	Obscuridad + Temperatura	Belda-Baillie <i>et al.</i> , 2002
<i>Aiptasia sp.</i>	Marino	Templado a Tropical	Obscuridad + Inhibidor fotosíntesis (DMCU)	Lehnert <i>et al.</i> , 2012
<i>Aiptasia pulchella</i>	Marino	Templado a Tropical	Temperatura	Starzak <i>et al.</i> , 2014
<i>Aiptasia sp.</i>	Marino	Templado a Tropical	Temperatura + radiación	Bieri <i>et al.</i> , 2016
<i>Aiptasia sp.</i>	Marino	Templado a Tropical	Temperatura + químicos (mentol)	Matthews <i>et al.</i> , 2016
<i>Anemonia viridis</i>	Marino	Templado a semi-ártico	Temperatura + químicos (mentol)	Ganot <i>et al.</i> , 2011
<i>Anemonia viridis</i>	Marino	Templado a semi-ártico	Temperatura + químicos (mentol)	Dani <i>et al.</i> , 2016
<i>Anthopleura aureoradiata</i>	Marino	Templado	Temperatura	Cowlin 2012
<i>Anthopleura elegantissima</i>	Marino	Tropical	Inhibidor fotosíntesis (DCMU)	Fitt & Pardy 1981
<i>Anthopleura elegantissima</i>	Marino	Tropical	Obscuridad	Weis 1996
<i>Isopora palifera</i>	Marino	Tropical	Químicos (Mentol)	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Stylophora pistillata</i>	Marino	Tropical	Químicos (Mentol)	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Montastraea cavernosa</i>	Marino	Tropical	Inhibidor fotosíntesis (DCMU)	Silverstein <i>et al.</i> , 2015

3.1 Hipótesis

H1: Considerando que la fotosíntesis genera elevados niveles ROS, es posible presumir que anémonas con elevados niveles de simbiosis expuestas a radiación experimental pueden generar mayores niveles de daño celular que en aquellas anémonas con bajos niveles de simbiosis.

H2: Considerando que los simbiontes sintetizan elevados niveles de antioxidantes, se espera que anémonas con altos niveles de simbiosis tengan mayores niveles defensivos que aquellos con bajos niveles de simbiosis expuestos a distintas bandas de radiación.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el tiempo en el cual adultos de *A. hermaphroditica* pueden expulsar los simbiontes bajo dos tratamientos (físico y químico) con el objetivo de entender si el alto o bajo nivel de dinoflagelados del género *Symbiodinium* afecta el balance celular daño oxidativo/respuesta antioxidante en pólipos de esta especie de anémona estuarina cuando son expuestos a distintos niveles de radiación experimental.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el tiempo involucrado en generar individuos con bajo nivel de simbiosis de *A. hermaphroditica* (blanqueados) utilizando un tratamiento físico (variación de temperatura) y químico (cristales de mentol + metanol diluido).
- Cuantificar y comparar las concentraciones de zooxantelas liberadas en forma temporal bajo cada una de las metodologías utilizadas para la generación de anémonas con bajo nivel de simbiosis.
- Cuantificar el daño oxidativo y capacidad antioxidante de pólipos con alto y bajo nivel de simbiosis de *Anthopleura hermaphroditica* bajo diferentes tratamientos de radiación (PAR y PAR+UV-B).

5. MATERIAL Y MÉTODO

5.1. Sitio de colecta de material biológico

Desde la rivera norte de la Isla grande de Chiloé, en el estuario río Quempillén (Ancud – Chiloé, 41°520S; 73°460W) (Figura 2), se realizó la extracción pólipos de *A. hermaphroditica*. El estuario se caracteriza por presentar en invierno temperaturas entre los 8,6 – 10,9°C y una salinidad que oscila entre los 9,4 a 30,3 psu (Chaparro *et al.*, 2008, Cubillos *et al.*, 2018), mientras en verano puede variar su temperatura entre 14,8 a 30°C, con una salinidad más estable entre los 25,9 a 31,6 psu (Chaparro *et al.*, 2008).

Los pólipos fueron colectados por medio de la obtención de sedimento desde el fondo del río Quempillén (zona intermareal) utilizando palas plásticas, el cual fue tamizado para así eliminar el sedimento fino. Posteriormente, los organismos colectados en el tamiz fueron trasladados al Laboratorio Costero de Recursos Acuáticos de Calfuco (Valdivia) para ser mantenidos en condiciones de laboratorio con agua de mar (35 psu) circulante bajo un fotoperiodo de 8:16, utilizando luz PAR (>400 – 700 nm). Previo a los experimentos, se seleccionaron aproximadamente 300 pólipos de similares tamaños (disco basal entre 4,7 a 5 mm de diámetro) para llevar a cabo los experimentos.

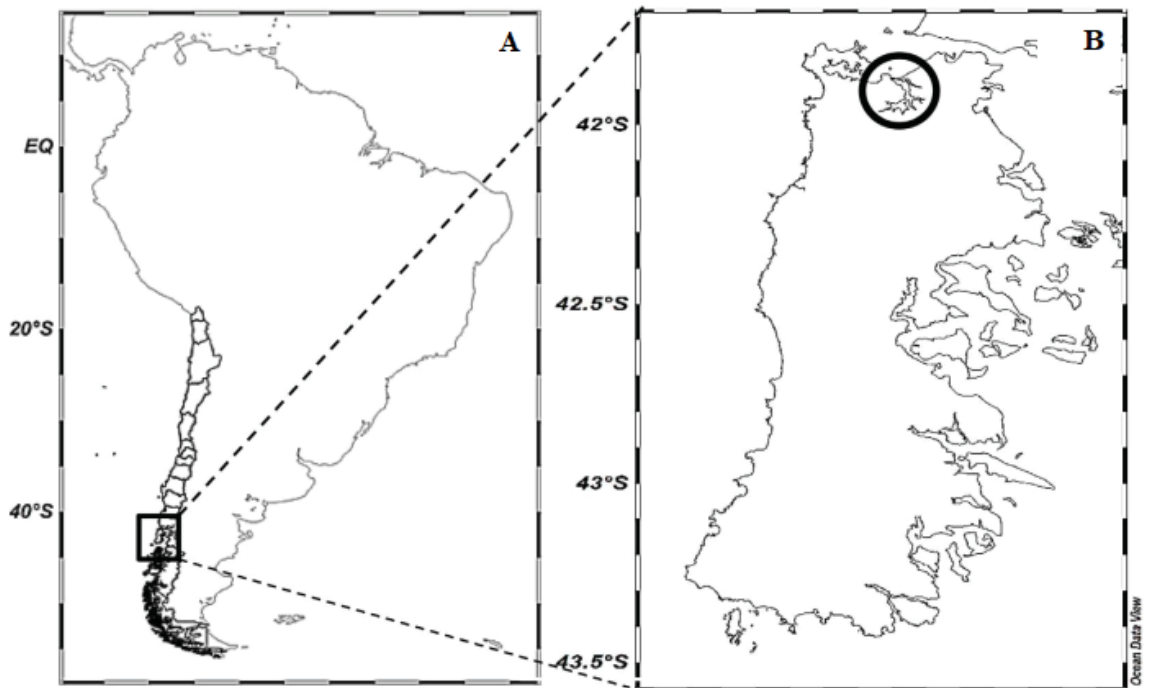


Figura 2: Sitio de colecta de muestras al sur de Chile (A) en la isla de Chiloé (B) en el estuario de Quempillén (41°520S; 73°460W).

5.2. Mecanismos de expulsión de *Symbiodinium sp.* desde *A. hermaphroditica*

Para entender qué factores determinan el proceso de expulsión de zooxantelas (blanqueamiento) en *A. hermaphroditica*, pólipos experimentales fueron expuestos a dos condiciones de la siguiente forma:

5.2.1. Método físico

Para ello se utilizó una modificación del método de shock térmico descrito por Oakley *et al.* (2017). De acuerdo con este, durante dos meses, 90 pólipos fueron expuestos a ciclos semanales (3 días) de shock térmico en condiciones de total oscuridad. Específicamente, la exposición diaria correspondió a un periodo de 6 horas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ para después permanecer durante 2 horas a 4°C en refrigerador y posteriormente reposar 16 horas a temperatura ambiente (12°C) en un volumen de 4 ml de agua de mar filtrada (AMF) (Figura 4). Diariamente, el AMF fue

reemplazada por agua fresca a cada anémona, las cuales fueron alimentadas 2 veces por semana con estadios iniciales del desarrollo de *Artemia salina*. Como individuos controles se utilizaron aproximadamente 60 ejemplares en condiciones ambientales normales donde se midió la expulsión durante 3 días a la semana, a las cuales se les contabilizó la concentración de células expulsadas de *Symbiodinium* sp., por un periodo de 2 meses en condiciones de total oscuridad. Cada individuo fue puesto en un pocillo con un volumen de AMF de 4 ml a 12- 14°C con recambio diario de agua.

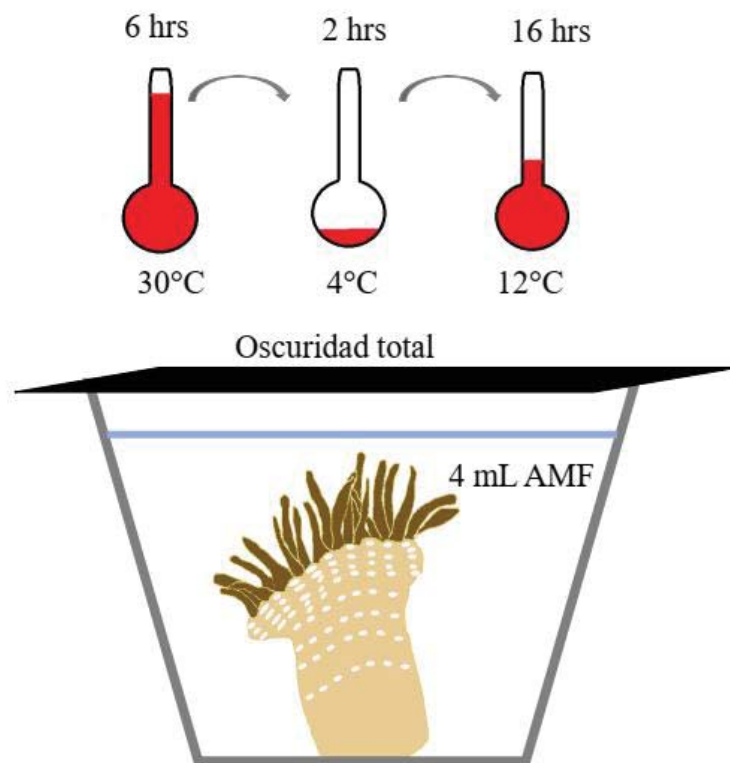


Figura 3: Liberación de *Symbiodinium* por método físico.

5.2.2. Método químico

Pólipos de *A. hermaphroditica* fueron expuestos en una solución de AMF+MeOH+cristales de mentol basándose en el protocolo de Wang (2012). Para ello, se expusieron 90 pólipos a ciclos semanales de 4 días donde diariamente se les colocaba 4 ml de AMF con una concentración de 0,19 mM de mentol durante 24 horas por un periodo de 2 meses, a los cuales se les contabilizó la concentración células expulsadas de *Symbiodinium* sp. (Figura 5). Durante el tratamiento los pólipos se expusieron a un fotoperiodo de 8/16 horas (luz : oscuridad) y se alimentaban 2 veces por semana con *Artemia salina* en estado metanauplio. Como controles del experimento, se utilizaron aproximadamente 60 ejemplares en condiciones ambientales sin estar expuestos a estresores (químicos o físicos) normales donde se contabilizó la expulsión durante 4 días a la semana por un periodo de 2 meses con un fotoperiodo de 8/16 horas (luz : oscuridad). Cada individuo fue colocado en mini acuario con un volumen de AMF de 4 ml a $\approx 13^{\circ}\text{C}$ con recambio diario de agua.

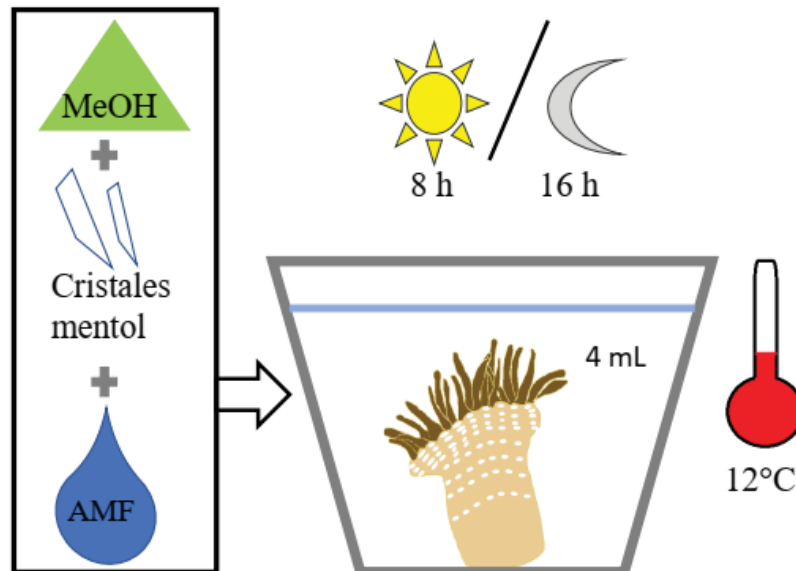


Figura 4: Liberación de *Symbiodinium* por método químico.

5.2.3 Fotografía post- liberación

Con el objetivo de determinar el efecto de los tratamientos estresores sobre la simbiosis, se realizó un registro posterior a la finalización de los tratamientos de liberación de zooxantelas, para lograr el contraste con un individuo simbiote. Registros fotográficos *in toto* se obtuvieron utilizando una lupa Olympus SZ51. Por otra parte, las zooxantelas en los tentáculos se observaron utilizando un microscopio invertido Olympus BX51 con luz normal y epifluorescencia.

5.3. Muestras de agua

Los pólipos expuestos a los tratamientos de liberación de *Symbiodinium*, fueron contenidos en cubeteras de hielo de un volumen de 5 ml. Diariamente, se le extrajo 1 ml de agua utilizando una micropipeta de 1000 μ l. Cada muestra de agua fue guardada en microtubos de plásticos de 1,5 ml y fijadas con formalina al 37%, logrando una concentración final de 7% de formalina, lo cual permite la preservación de las muestras.

5.4 Conteo en Cámara de Neubauer

El número de células simbiotes expulsadas desde cada uno de los pólipos experimentales fueron contabilizadas diariamente durante un periodo de 2 meses, donde fueron escogidas al azar 30 muestras de cada tratamiento y control. Para ello, 10 μ l de cada unidad experimental fue contabilizada 4 veces (pseudo-replica) previa homogenización. El número de células simbiotes fueron determinadas utilizando la metodología descrita por Campbell & Campbell (1986) por medio de la cámara de Neubauer. Para ello se determinó el número de células simbiotes contabilizadas en un polígono de área de 1 mm² dentro de la cámara de Neubauer con la finalidad

de obtener la concentración total de células expulsadas en 4 ml de AMF, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Número de células contadas} * 10.000 * 4}{\text{Número de cuadrados}}$$

Fórmula 1: Concentración de células expulsadas [cél/ml]



Figura 5: Cámara de Neubauer

5.5 Agua de mar filtrada (AMF)

Para la mantención de los organismos y posterior experimentación en el actual trabajo, el agua de mar del Laboratorio Costero de Recursos Acuáticos de Calfuco (Valdivia) fue filtrada por medio del sistema que posee el establecimiento: filtro de 20 μm , filtro 5 μm , filtro de carbón y filtro de luz UV. Adicionalmente se utilizó un filtro de microfibra de borosilicato 0,7 μm para la eliminación de la fracción restante como microalgas, detritus, dinoflagelados y otros que sean de mayor tamaño que el poro de 0,7 μm .

5.6 Cultivo de *Artemia salina*

Durante el desarrollo del experimento y considerando que la pérdida de simbioses afecta la translocación de sustancias nutricionales desde la microalga al hospedador, los pólipos de *A.*

hermaphroditica fueron alimentados durante la etapa experimental con estadios iniciales del desarrollo (metanauplio) del crustáceo *Artemia salina* (Figura 7). Para el cultivo se utilizó un recipiente semi-cónico en la base, que en su interior se colocaron cistos de *Artemia salina* en 2.5 l de AMF mantenida a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ con calentador de acuario (Pua 50W), y luz directa durante las 24 horas. El cultivo se renovaba cada 3 a 4 días.



Figura 6: Estado metanauplio de *Artemia salina*.

5.7 Diseño experimental – exposición radiación

Para determinar el efecto de la radiación sobre organismos con altos y bajos niveles de simbiosis (químicos y físicos) se seleccionaron 195 pólipos (60 anémonas con bajo nivel de simbiosis provenientes del tratamiento físico y químicos y 75 anémonas con altos niveles de simbiosis) (Figura 7). En cada cubetera de hielo se depositaron un total de 15 individuos (5 individuos simbiosis, 5 del tratamiento químico y 5 del tratamiento físico), seleccionados al azar replicados 3 veces (Tabla 2).

Bajo condiciones de laboratorio se expusieron a irradiación anémonas con altos y bajos niveles de simbiosis, con la finalidad de evaluar el efecto de la radiación PAR (>400-700 nm) y PAR +UV-B (>280–700 nm) sobre la respuesta celular (daño oxidativo y capacidad antioxidante). Los pólipos fueron expuestos a una irradiación de PAR (85 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$), durante un período de 12 horas.

Tabla 2: Diseño experimental para exposición a radiación. AS: Altos niveles de simbiosis; BSF: bajo nivel de simbiosis proveniente del físico; BSQ: bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento químico; R: réplica; H: hora; C: control.

	C	6 h	12 h	6 h	12 h
AS	R1	R1	R1	R1	R1
	R2	R2	R2	R2	R2
	R3	R3	R3	R3	R3
BSF		R1	R1	R1	R1
		R2	R2	R2	R2
		R3	R3	R3	R3
BSQ		R1	R1	R1	R1
		R2	R2	R2	R2
		R3	R3	R3	R3
		PAR		PAR + UV-B	

La dosis de radiación UV-B aplicada fue de 2.2 W/m^2 por el mismo periodo de tiempo y producida por 2 lámparas Phillips TL20 W. Para generar las condiciones de radiaciones experimentales descritas anteriormente, sobre los acuarios que contenían a pólipos de *A. hermaphroditica* fueron cubiertos con filtros plásticos para generar las condiciones indicadas. Así, la condición experimental PAR se logró utilizando el filtro clear-220 (Chris, UK) permitiendo únicamente el paso de longitudes de onda entre >400-700 nm. Igualmente, la

condición PAR+UVB fue lograda cubriendo los acuarios con una lámina plástica de Celulosa de acetato (CDA, Graphix – USA), permitiendo el paso de longitudes de onda entre 280-700 nm.

La condición de radiación PAR+ UV-B se logró utilizando lámparas Phillips TDL20W (PAR) y Phillips T (UV-B) suspendidas a 30 cm de distancia de los filtros. Muestras de *A. hermaphroditica* fueron colectadas desde las unidades experimentales a las 6 y 12 h, traspasadas a nitrógeno líquido (-196 °C) y luego almacenadas en un ultra-freezer a -80°C hasta llevar a cabo los análisis bioquímicos.

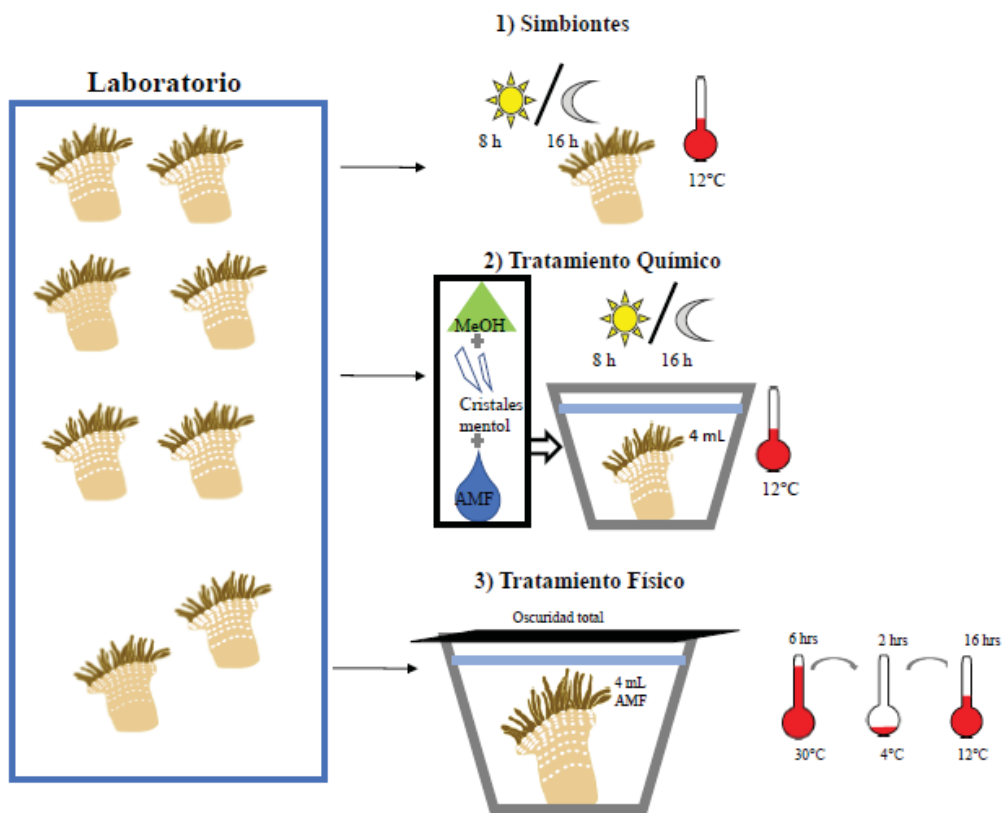


Figura 7: Resumen del diseño de mantención de *A. hermaphrodita* previo al experimento.

5.8. Análisis bioquímicos

Previo a las extracciones bioquímicas, las muestras biológicas fueron molidas en frío (nitrógeno líquido) utilizando un mortero y pistilo, para posteriormente ser almacenados en tubos de 1,5 ml a -80°C.

5.8.1. Determinación de proteínas totales

Previo a la determinación de carbonilos proteicos se estableció la concentración de proteínas, para ello 100 mg de tejido pulverizado fueron depositados en un tubo de 1,5 ml al cual se le adicionó 2 ml del buffer PBS 1x+ PvPP +EDTA, se centrifugaron a 13500 rpm (17,135 g) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se extrajo el sobrenadante y se transfirió a nuevos tubos de 2 ml. Se realizó una réplica de medición por réplica de experimento, utilizando alícuotas de 200 µl de kit de análisis de proteínas reactivo de BCA Pierce se depositaron en una microplaca junto con una alícuota de 25 µl de cada muestra (para los tubos pertenecientes al blanco, se adicionaron 25 µl del buffer). La microplaca se incubó durante 30 minutos a 37°C en una estufa de secado (Memmert D2800), y posteriormente la absorbancia fue determinada a 562 nm utilizando un lector de microplaca (Zenyth 200rt, biochrom Ltd). Se utilizó una curva de calibración, realizada con suero de albumina bovina 2 mg/ml (Kit BCA Pierce), para identificar las concentraciones de proteínas, posteriormente se utilizó la fórmula 2, para generar un mix de concentración de 200 µg/ml de proteína por lo que se extrajeron del tubo madre una alícuota y se le agregó buffer para lograr un volumen de 1 ml en tubo de 1,5 ml.

$$\frac{\left(\frac{((A_{M562} - A_{B562}) - 0.11) / 0.009 * (vol. extracción (ml))}{alícuota vol. (ml)} \right)}{Peso (gr)}$$

Fórmula 2: concentración de proteínas (µg * g⁻¹PF)

5.8.2. Determinación de carbonilos protéicos

Daño a las proteínas fueron determinados utilizando el protocolo modificado de Mesquita *et al.* (2014). Para ello, del mix de proteína [200 µg/ml] se extrajeron 200 µL del extracto y se depositó en un tubo ambar de 2 ml y se le añadió 200 µL de ácido tricloroacético (TCA), dejando reposar durante 30 minutos a -20°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13500 rpm (17,135 g) durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se extrajo y el pellet generado en el tubo fue resuspendido con 300 µL 2N HCl con 10nM DNPH. Tubos ámbar de 2 ml con 300 µL 2N HCl correspondiente a los blancos se incubaron a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente a cada tubo se le adicionó 500 µL de TCA 20% y se dejó precipitar la muestra por 15 minutos a -20°C. Luego las muestras se centrifugaron a 13500 rpm (17,135 g) por 15 minutos a 4°C, y posteriormente el sobrenadante fue eliminado. Al pellet generado se le adicionó una alícuota de 500 µL etanol:etil acetato (1:1) y se centrifugaron nuevamente por 10 minutos a 3.500 rpm (4,442 g) a 4°C. El pellet resultante se disolvió en 2 ml de 20 mM fosfato de sodio (pH 6,8) conteniendo 6M guanidin- hidrocloreto y fue centrifugado por 10 minutos a 9000 rpm (11,423 g) a 4°C. La lectura se realizó depositando 200 µl de la solución final, siendo una réplica por réplica experimental, en una microplaca cuya absorbancia fue determinada a 380 nm, utilizando un lector de microplaca (Zenyth 200rt, biochrom Ltd) La identificación de la concentración de carbonilos protéicos fue por medio de la fórmula 3, que utiliza el coeficiente de extinción molar del DNPH (22000 M⁻¹ cm⁻¹).

$$\frac{(A_{M380} - A_{B380})}{(22000 M^{-1}cm^{-1} * 0.56 cm)} * factor\ de\ dilución$$

Fórmula 3: Carbonilos protéicos (µmol carbonil/mg proteína)

5.8.3. Determinación de peroxidación lipídica

La determinación de los niveles de peroxidación lipídica se llevó a cabo utilizando el protocolo modificado de Salama & Pearce (1993). Para ello, se depositaron 30 mg de tejido pulverizado en un tubo de 1,5 ml al cual se le agregó una alícuota de 320 μ l de TCA al 0.1 N. Posteriormente los tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 12000 rpm (15,231 g) y a una temperatura de 4°C. 200 μ l del sobrenadante se depositaron en un nuevo tubo (1,5 ml) y se le adicionaron 500 μ l de una solución de TBA 0.5% - TCA 20%. Los blancos fueron confeccionados utilizando 200 μ l de TCA al 0.1 N y 500 μ l de la solución de TBA 0.5% - TCA 20%. Luego las muestras se incubaron en baño termorregulado a 80°C durante 30 minutos y posteriormente traspasadas a una caja termo con hielo por 5 minutos e inmediatamente centrifugadas a 13000 rpm (16,500 g) por 5 minutos a 4°C. Finalmente, 200 μ l del sobrenadante fue depositado en una microplaca, siendo una réplica por réplica de experimental (96 pocillos / Zenyth 200rt, biochrom Ltd) donde la lectura de la absorbancia fue determinada inmediatamente a 440, 532 y 600 nm. La identificación de la concentración de peroxidación lipídica fue por medio de la fórmula 4, que utiliza el coeficiente de extinción molar del MDA ($155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

$$\frac{((A_{532} - A_{\text{Blanco}}) - (A_{600} - A_{\text{Blanco}})) * \text{factor de dilución} * \text{alícuota vl. (ml)} * 1000}{(155 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} * 0,56 \text{ cm} * \text{peso (gr)})}$$

Fórmula 4: Peroxidación lipídica (nmol MDA*g PF⁻¹)

5.8.4. Determinación de fenoles totales

Compuestos fenólicos fueron determinados según el protocolo modificado de Koivikko (2008) realizando tres series de extracción sucesivas a cada muestra. Para ello, se depositó 70 mg de muestra en un tubo de 1,5 ml a la cual se le adicionó 1 ml de acetona al 70%. Posteriormente la muestra fue sonicada durante 120 minutos a 4°C en un baño ultrasónico (Cole Parmer, Modelo: 8891). Posteriormente los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a 9000 rpm (11,423 g) a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de 1,5 ml plástico y posteriormente fue almacenado a -80°C y el pellet se guardó hasta completar las 3 extracciones. Cada tubo con extracto fue protegido de la luz utilizando “alusa foil” y se evaporaron por 2 horas en campana de extracción y sin luz directa.

Posteriormente, una alícuota de 100 µl del extracto fue mezclada con 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu 1 N y 100 µl de agua destilada al interior de un tubo ámbar de 1,5 ml. Los blancos fueron generados utilizando 100 µl de acetona al 70%, 100 µl de Folin-Ciocalteu 1 N y 100 µl de agua destilada. Se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente en obscuridad para que se estabilice el pH. Posteriormente, se adicionó 200 µl Na₂CO₃ al 20% y se incubaron en completa obscuridad por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 7500 rpm (9,519 g) por 5 minutos a 4°C. A continuación, 200 µl de la muestra (una réplica por réplica de experimento) fueron adicionadas a cada pocillo de la microplaca (Falcon® 96 Well Clear Flat Bottom TC-Treated Culture Microplate with Lid) y su absorbancia fue determinada a 730 nm utilizando un lector de microplaca (Zenyth 200rt, biochrom Ltd). La identificación de la concentración de fenoles totales fue por medio de la suma de cada extracción (fórmula 5), utilizando curva de calibración para ácido gálico.

$$\frac{\left(\left(\frac{A_{730} - 0,1622}{14,566} \right) * Volumen\ extracción\ (ml) \right)}{peso\ (gr)}$$

Fórmula 5: Fenoles totales (mg AG Eq * g PF⁻¹)

5.8.5. Determinación de capacidad antioxidantes totales

La capacidad antioxidante total fue determinada por medio del protocolo de Fukumoto & Mazza (2000), de la primera extracción de fenoles, correspondiente a 70 mg en 1 ml de acetona (ver sección 5.8.4. Determinación de fenoles totales), se extraen 80 µL de muestra que se depositan en tubos de 200 µL. Previamente a la lectura se cargó en microplacas de 96 pocillos, una réplica por réplica de experimento, siendo 200 µL de DPPH y se le adicionó 22 µL de muestra (una réplica por réplica de experimento), 22 µL de acetona al 70% en el caso de los blancos. Posteriormente la absorbancia fue determinada a 520 nm durante un periodo de 2 horas en 12 ciclos de 10 minutos a ± 37°C en lector de microplacas (Zenyth 200rt, biochrom Ltd). La identificación de la concentración de fenoles totales fue por medio de la fórmula 6, utilizando curva de calibración para DPPH.

$$\frac{\left(\left(\frac{(A_{520} + 0.4226)}{0.0045} \right) * volumen\ extracción\ (ml) \right)}{alicuota\ (ml)} \frac{1}{peso\ (gr)}$$

Fórmula 6: Capacidad antioxidante total (mg Trolox Eq * g PF⁻¹)

5.9. Análisis estadístico

Previo a la utilización de una prueba paramétrica (análisis de varianzas) o no paramétrica, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos por medio de la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Cochran respectivamente. Para comparar las concentraciones de células liberadas de *Symbiodinium* sp. se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, así como para comparar entre tratamientos y semanas. Para los análisis bioquímicos se utilizó una ANOVA 3 vías, para comparar entre los niveles simbióticos (alto nivel de simbiosis, bajo nivel de simbiosis (físico) y bajo nivel de simbiosis (químico)) en función del tiempo y radiación. El análisis a posteriori de Tukey permitió detectar si los factores en forma independiente o su interacción influían en la respuesta. Se utilizó una correlación de Pearson, para identificar el aporte de los fenoles totales a la capacidad antioxidante totales. En todas las pruebas se consideró un nivel de significancia del 5 % ($p \leq 0,05$) y para los análisis se utilizó el programa STATISTICA versión 7, mientras que el análisis de correlación se realizó con SigmaPlot versión 10.

6. RESULTADOS

6.1. Liberación de *Symbiodinium* sp. desde *Anthopleura hermaphroditica*

6.1.1. Liberación semanal para el método físico

La exposición de *A. hermaphroditica* a variaciones de temperatura en forma cíclica genera diferencias significativas en los niveles de expulsión de zooxantelas desde los pólipos cuando fueron comparados con aquellos animales controles. Así, anémonas expuestas a ciclos experimentales físicos expulsan más simbiontes que los organismos controles que permanecieron bajo condiciones naturales sin estrés térmico (Mann-Whitney *U*-test: $z = 15,76$, $P = < 0,05$).

Durante todo el tratamiento de liberación física se identificaron individuos que no presentaron expulsión de zooxantelas. De los organismos experimentales se constató que, durante la cuarta y quinta semana, un solo individuo (3%) no expulsó zooxantelas, las demás semanas el 100% de los individuos liberaron simbiontes (Figura 8). Mientras los controles presentaron un aumento progresivo de organismos liberando células de 53% a un 97%, de la primera a la quinta semana respectivamente, disminuyendo levemente a la octava semana con 81% de los organismos liberando simbiontes (Figura 8).

La expulsión máxima de simbiontes (21,2 millones de cél/ml) realizada por un solo pólipo se observó dentro la séptima semana en el tratamiento físico, mientras que en el control ocurrió en la quinta semana de aproximadamente 2,2 millones de cél/ml.

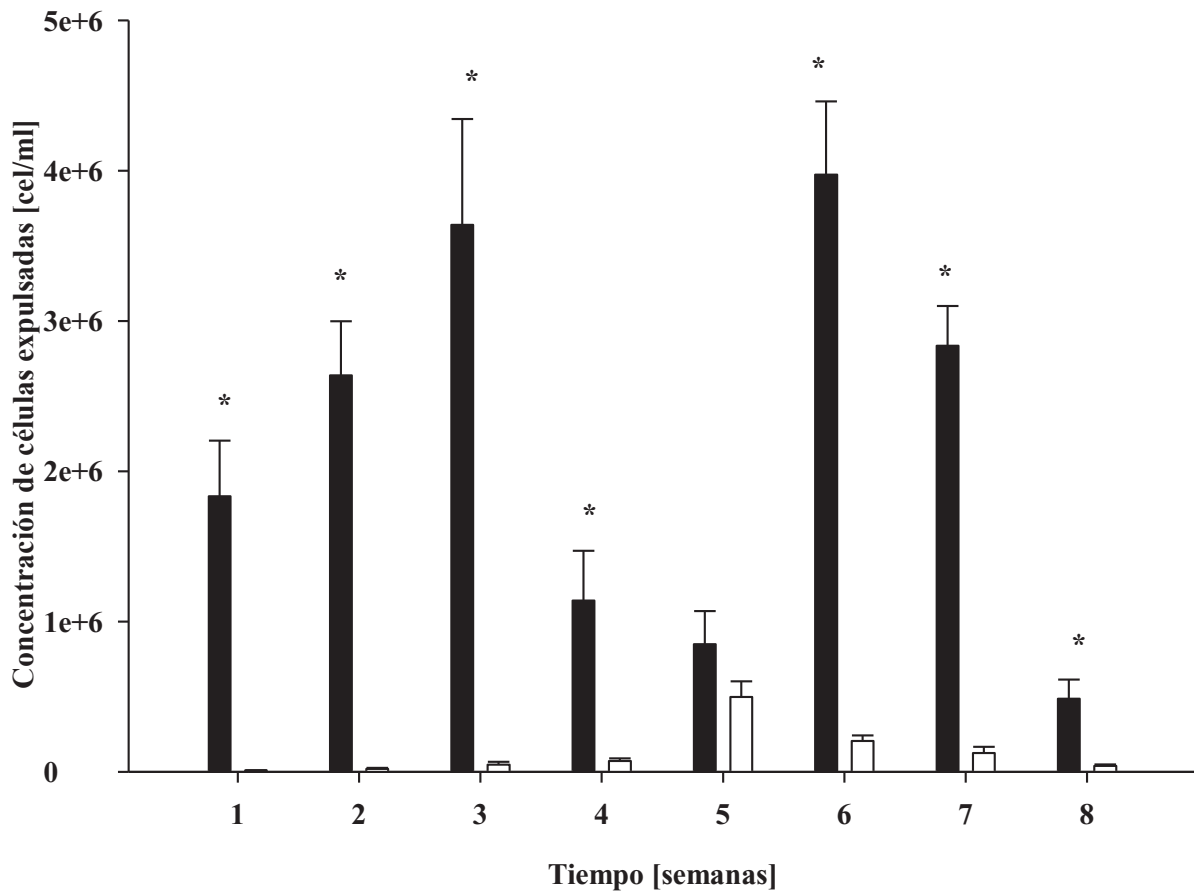


Figura 8: Concentración de células de *Symbiodinium* expulsadas [cél/ml] para cada semana del tratamiento físico (barras negras) y control (barras blancas) durante las 8 semanas. Los asteriscos (*) indican diferencia significativa con el control de la misma semana ($p < 0,05$) y las barras (T) indican \pm ES.

6.1.2. Liberación semanal para el método químico

La exposición a una solución de cristales de mentol + metanol genera diferencias significativas (Mann-Whitney *U*-test: $z = 4.31$, $P = < 0.05$) en la expulsión de zooxantelas desde los pólipos experimentales (Figura 9).

Al igual que en el método físico se observó que en cada semana existían organismos que no presentaban liberación tanto en el tratamiento químico como en el control. El tratamiento generó que el 90% de los individuos expulsara zooxantelas desde los pólipos durante la primera semana, aumentando a un 100% de organismos liberando para la cuarta semana, para la octava semana disminuyó a un 90%. Mientras los controles presentaron un aumento progresivo de organismos liberando de un 56,25% a un 100%, de la primera a la octava semana respectivamente (Figura 9). Durante la quinta semana de exposición en el tratamiento con mentol se observó la mayor liberación de zooxantelas por parte de un solo organismo de aproximadamente 15 millones de cel/ml, siendo 5 veces mayor que la liberación máxima presentada en la octava semana.

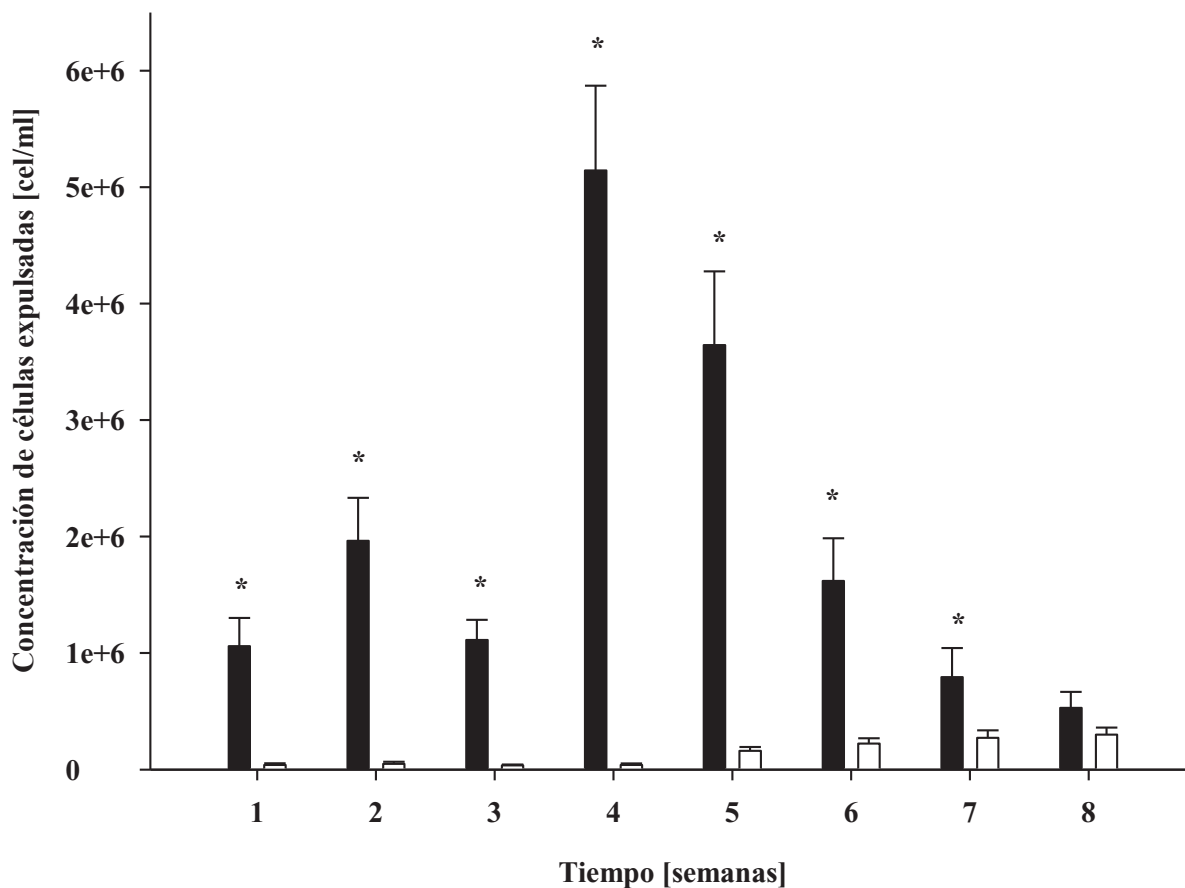


Figura 9: Concentración de células de *Symbiodinium* expulsadas [cél/ml] para cada semana del tratamiento químico (barras negras) y control (barras blancas) durante las 8 semanas. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con el control de la misma semana ($p < 0,05$) y las barras (T) indican \pm ES.

6.1.3 Liberación semanal para tratamiento físico y químico

Aunque existe una diferencia de alrededor de un 20% en los niveles de expulsión entre los tratamientos físicos y químicos, no se observa una diferencia significativa entre los tratamientos (Mann-Whitney *U*-test: $z=-1,599$, $P= 0,109$), sin embargo, en las semanas 1, 3, 4, 5, 6, 7 se observó una diferencia significativa entre los tratamientos (Mann- Whitney *U*-test, $p < 0,05$).

En el tratamiento físico las semanas con menores valores de expulsión se encontraron en la cuarta, quinta y octava semana (Mann- Whitney *U*-test, $p < 0,05$) (Figura 10 A). Mientras en el tratamiento químico se encontró la mayor expulsión de zooxantelas en la cuarta semana, la cual posee diferencia significativa con las demás semanas (Mann- Whitney *U*-test, $p < 0,05$) (Figura 10 B).

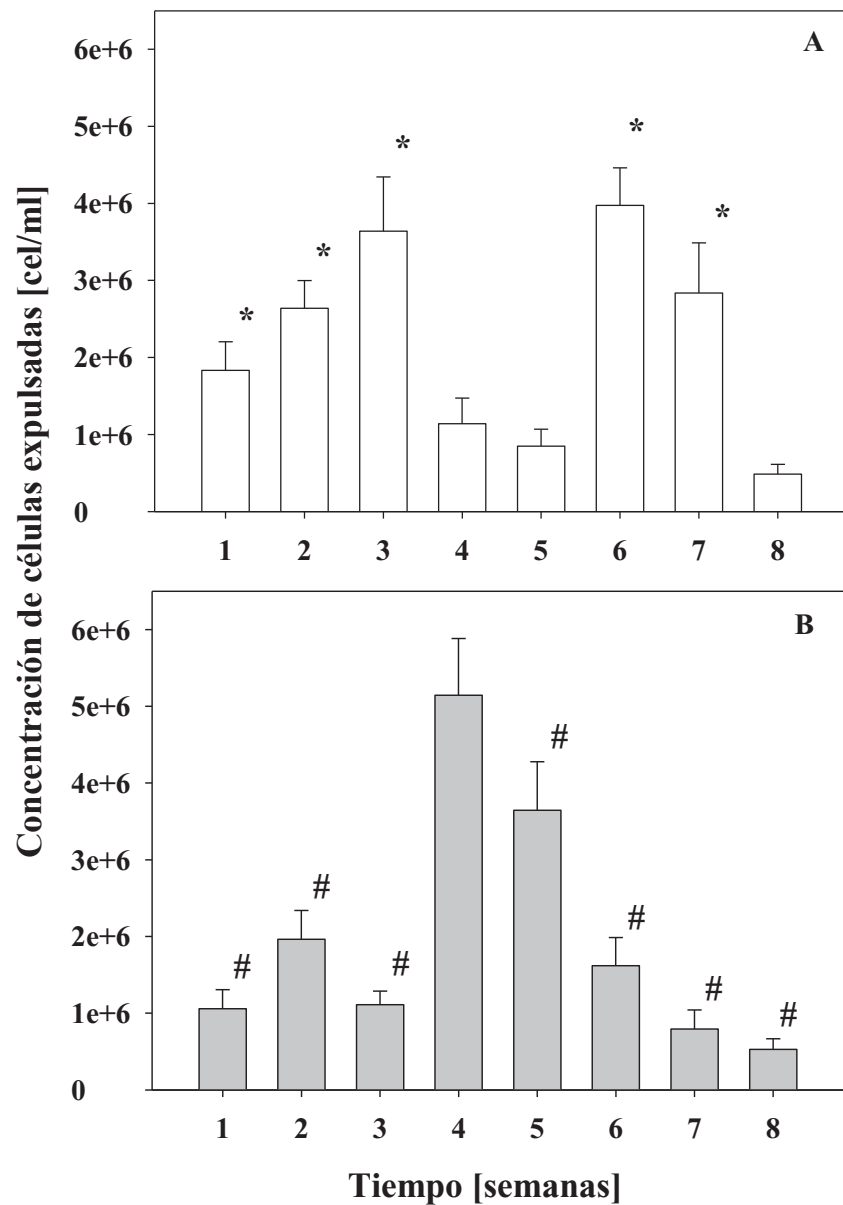


Figura 10: Concentración de células de *Symbiodinium* expulsadas [cél/ml] para cada semana del tratamiento físico (A) y tratamiento químico (B) durante las 8 semanas. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas dentro del tratamiento físico con las semanas 4, 5 y 8 ($p < 0,05$), el numeral (#) indica diferencias significativas dentro del tratamiento químico con la semana 4 ($p < 0,05$) y las barras (T) indican \pm ES.

6.1.4. Niveles de expulsión de zooxantelas

La prolongada exposición de los pólipos de *A. hermpahroditica* a los estresores químicos y físicos genera una gradual disminución de la coloración de los individuos (Figura 11 D, G) respecto de los controles (Fig 11 A). Las observaciones se realizaron utilizando una luz de fluorescencia, la cual permitió identificar una clara disminución en la fluorescencia de sus tentáculos tanto de pólipos expuestos a estresores físicos y químicos (Figura 11 F, I) cuando éstos fueron comparados con aquellos sin exposición al estrés (Figura 11 C). Durante el proceso de expulsión de zooxantelas, se observó que los individuos expuestos al tratamiento de variación de temperatura (físico) expulsaron juveniles blanqueados desde la cavidad gastrovascular a partir de la quinta semana del tratamiento hasta la octava semana, mientras que los individuos expuesto solo a obscuridad presentan liberación de juveniles con simbiontes en su interior durante todo el control (8 semanas) (Figura 12).

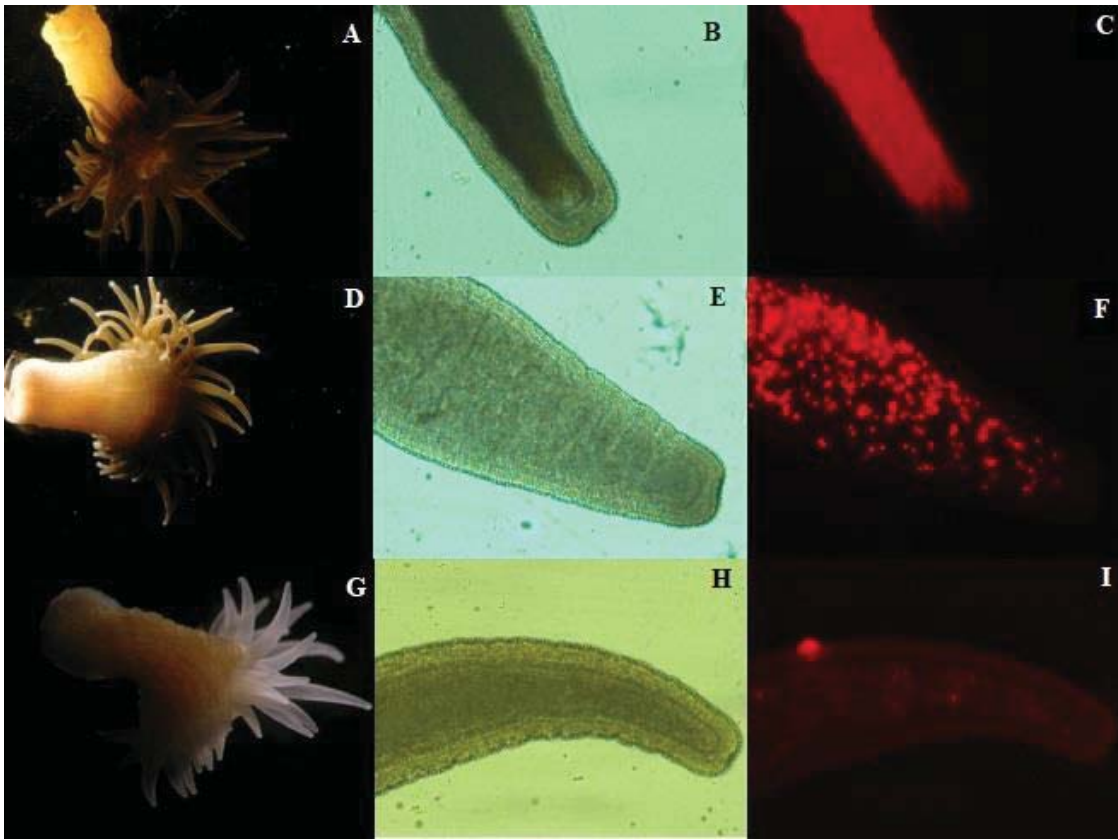


Figura 11: *Anthopleura hermaphroditica* en tres niveles de simbiosis, anémonas con alto nivel de simbiosis (A, B, C), bajo nivel de simbiosis químico (D, E, F) y bajo nivel de simbiosis físico (G, H, I). A través de 3 observaciones lupa (A, D, G), microscopía óptica (B, E, H) y epifluorescencia (C, F, I).

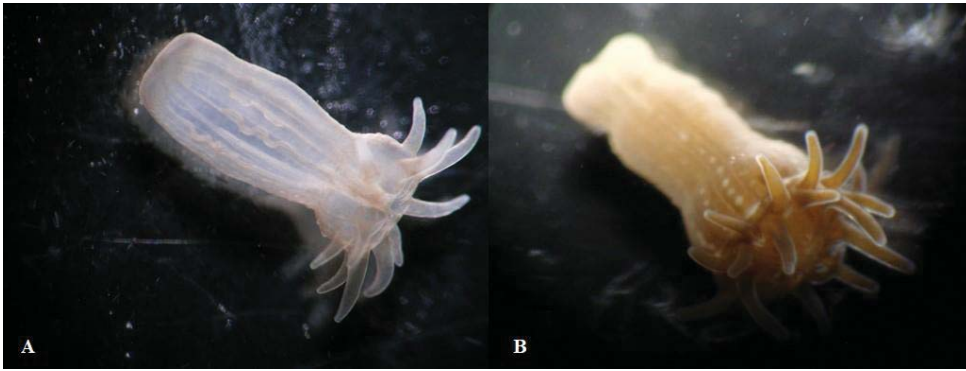


Figura 12: juveniles de *Anthopleura hermaphroditica* expulsadas de individuos adultos expuestos a tratamiento físico de blanqueo (A) y del control (B).

6.2. Niveles de simbiosis y respuesta celular frente a la radiación experimental

6.2.1. Carboniles proteicos

El ANOVA 3 vías indica que el tiempo ejerce un efecto en la generación de daño oxidativo a las proteínas ($F_{(2,36)} = 15,77$, $P = < 0,05$). El análisis *a posteriori* de Tukey mostró diferencias significativas entre pólipos controles (tiempo 0) versus los experimentales ($P = < 0,05$) (Figura 13). En simbiosis la exposición a PAR+UV-B produce una mayor producción de daño al corto plazo con tendencia a la disminución a las 12 horas, a diferencia del PAR que a las 12 horas aumenta la producción de carboniles proteicos (Figura 13 A).

Similares resultados fueron obtenidos en pólipos del tratamiento químico ante la exposición a PAR presentando un aumento continuo hacia las 12 horas, mientras que la exposición a PAR+UV-B se observa una disminución del 44% posterior a las 6 horas (Figura 13 B). Para las anémonas provenientes del tratamiento físico se observa un aumento del nivel de daño proteico en ambos tratamientos de radiación posterior a las 12 horas de exposición (Figura 13 C).

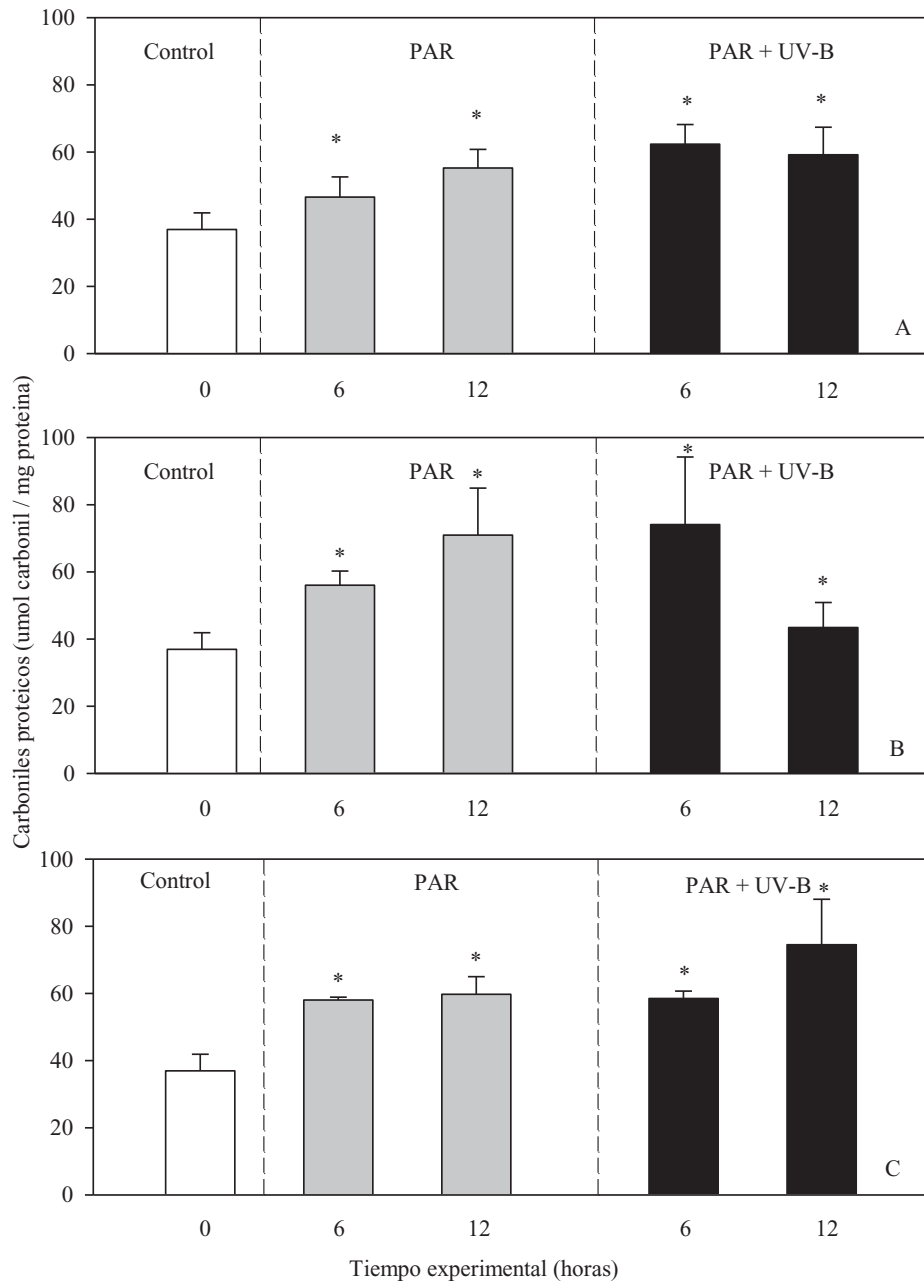


Figura 13: Niveles de Carbonilos proteicos ($\mu\text{mol carbonil} / \text{mg prote\u00edna}$) para los niveles de simbiosis, an\u00e9monas con alto nivel de simbiosis (A), bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento qu\u00edmico (B) y bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento f\u00edsico (C) de *Anthopleura hermaphroditica* expuestos experimentalmente a radiaci\u00f3n PAR y PAR+ UV-B durante 6 y 12 horas. Los asteriscos (*) indican la diferencia significativa con el control y barras (T) indican \pm ES.

6.2.2. Peroxidación lipídica

El ANOVA 3 vías indican que el tiempo de exposición a la radiación genera un efecto significativo en los niveles de peroxidación lipídica ($F_{(2,36)} = 10,8551$, $P = < 0,05$). Donde en las anémonas con altos niveles de simbiosis expuestas a PAR y PAR+UV-B presentaron a las 6 horas valores similares con el control, mientras que al cumplir las 12 horas se observa una disminución del daño (Figura 14 A). Similarmente, para los pólipos con bajos niveles de simbiosis provenientes del tratamiento químico se observa una disminución de los niveles de daño lipídico en ambos tratamientos de radiación a posterior a las 12 horas de exposición. (Figura 14 B).

Equivalentes resultados fueron observados en pólipos provenientes del tratamiento físico. Sin embargo, a las 6 horas la exposición con radiación PAR+UVB genera un aumento significativo en los niveles de peroxidación lipídica incrementando sus niveles en un 100% respecto de los niveles iniciales. Durante las siguientes horas del tratamiento PAR+UVB, existe una reducción del 80% de los niveles de daño oxidativo a los lípidos para los pólipos con bajos niveles de zooxantelas provenientes del tratamiento físico (Figura 14 C).

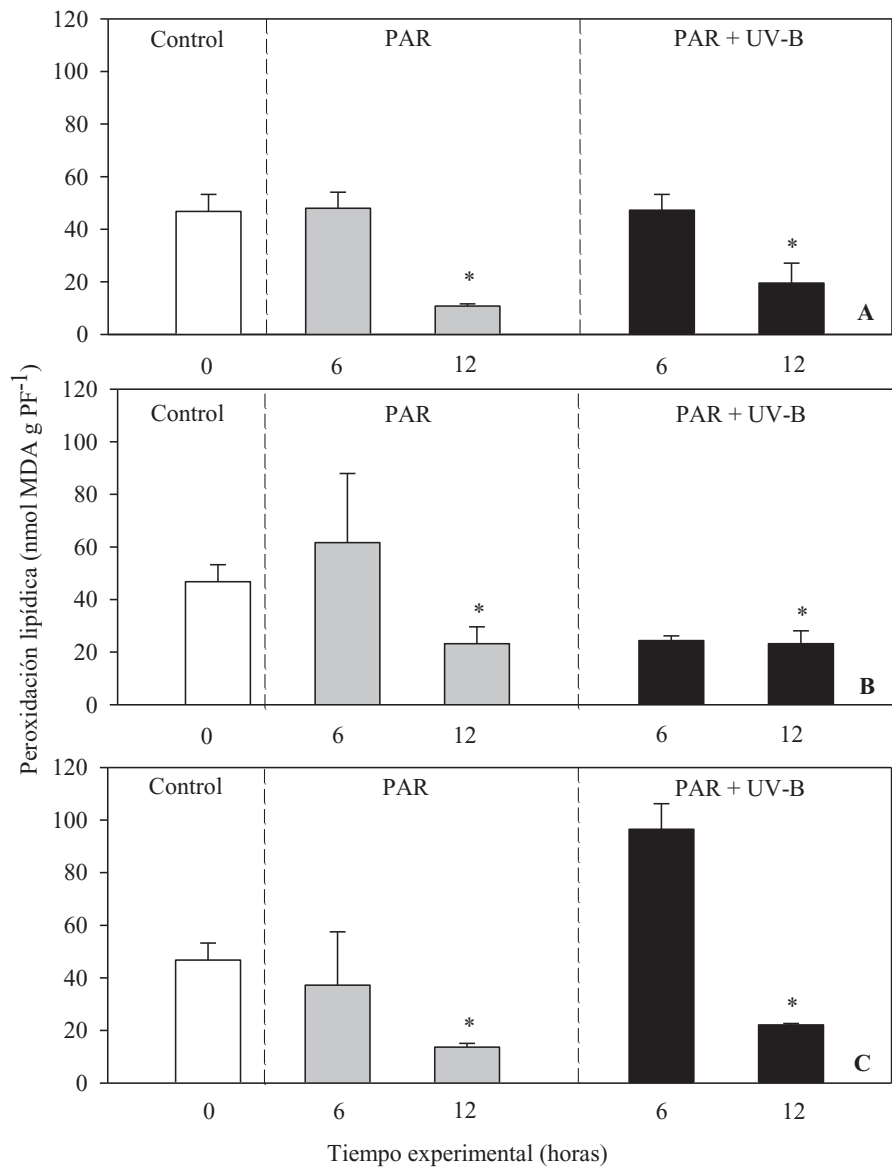


Figura 14: Niveles de peroxidación lipídica (nmol MDA g PF⁻¹) para los niveles de simbiosis, anémonas con alto nivel de simbiosis (A), bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento químico (B) y bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento físico (C) de *Anthopleura hermaphroditica* expuestos experimentalmente a radiación PAR y PAR+ UV-B durante 6 y 12 horas. Los asteriscos (*) indican la diferencia significativa con el control y barras (T) indican ± ES.

6.2.3. Fenoles totales

El ANOVA 3 vías indican que el tiempo de exposición produce un efecto significativo en la síntesis de compuestos fenólicos totales ($F_{(2,36)} = 5.226$, $P = 0.010$). Los pólipos con altos niveles de simbiosis expuestos a PAR y PAR+ UV-B presentaron aumento de producción fenoles hacia las 12 horas (Figura 15 A). Similares resultados fueron observados en los pólipos provenientes del tratamiento químico, donde se observa un aumento de la síntesis de compuestos fenólicos hacia las 12 horas (figura 15 B). Para las anémonas del tratamiento físico se observa el mismo resultado previamente mencionado para la exposición a PAR. Sin embargo, en la exposición a PAR+ UV-B se observa una disminución de síntesis de fenoles hacia las 12 horas (Figura 15 C). Los valores de fenoles totales para las 12 horas PAR + UV-B en niveles altos de simbiosis y niveles bajos de zooxantelas (físico y químico) son similares (Figura 15).

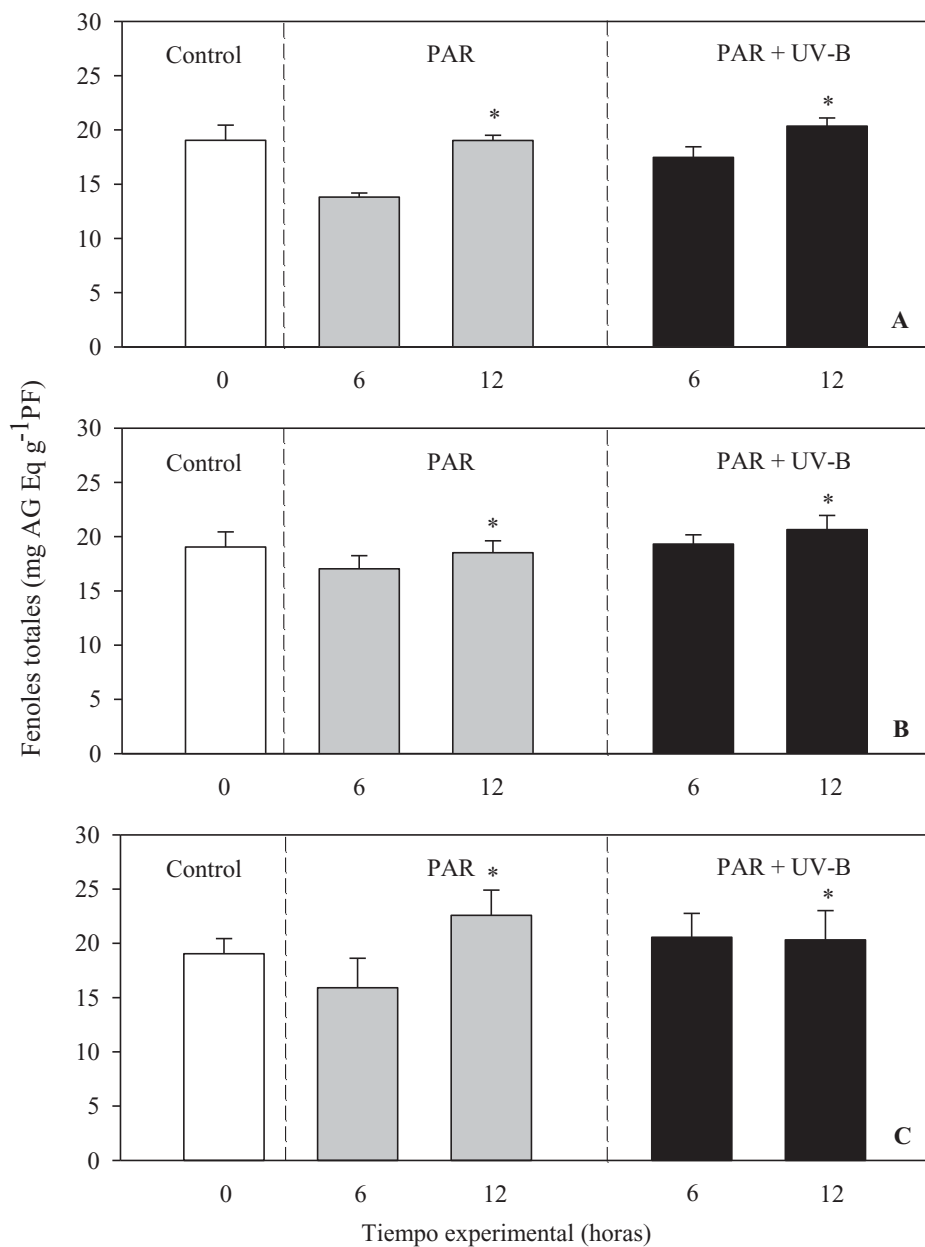


Figura 15: Niveles de fenoles totales ($\text{mg AG Eq}^* \text{ g PF}^{-1}$) para los niveles de simbiosis, anémonas con alto nivel de simbiosis (A), bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento químico (B) y bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento físico (C) de *Anthopleura hermaphroditica* expuestos experimentalmente a radiación PAR y PAR+ UV-B durante 6 y 12 horas. Los asteriscos (*) indican la diferencia significativa con las 6 horas de exposición y barras (T) indican \pm ES.

6.2.4. Capacidad antioxidante

El ANOVA a 3 vías indica que la capacidad antioxidante no fue influenciada por la interacción de los factores de niveles de simbiosis, tiempo de exposición y tratamientos de radiación experimental (Figura 16). El análisis estadístico también indicó que los factores de forma independiente no influenciaban en la capacidad antioxidante total.

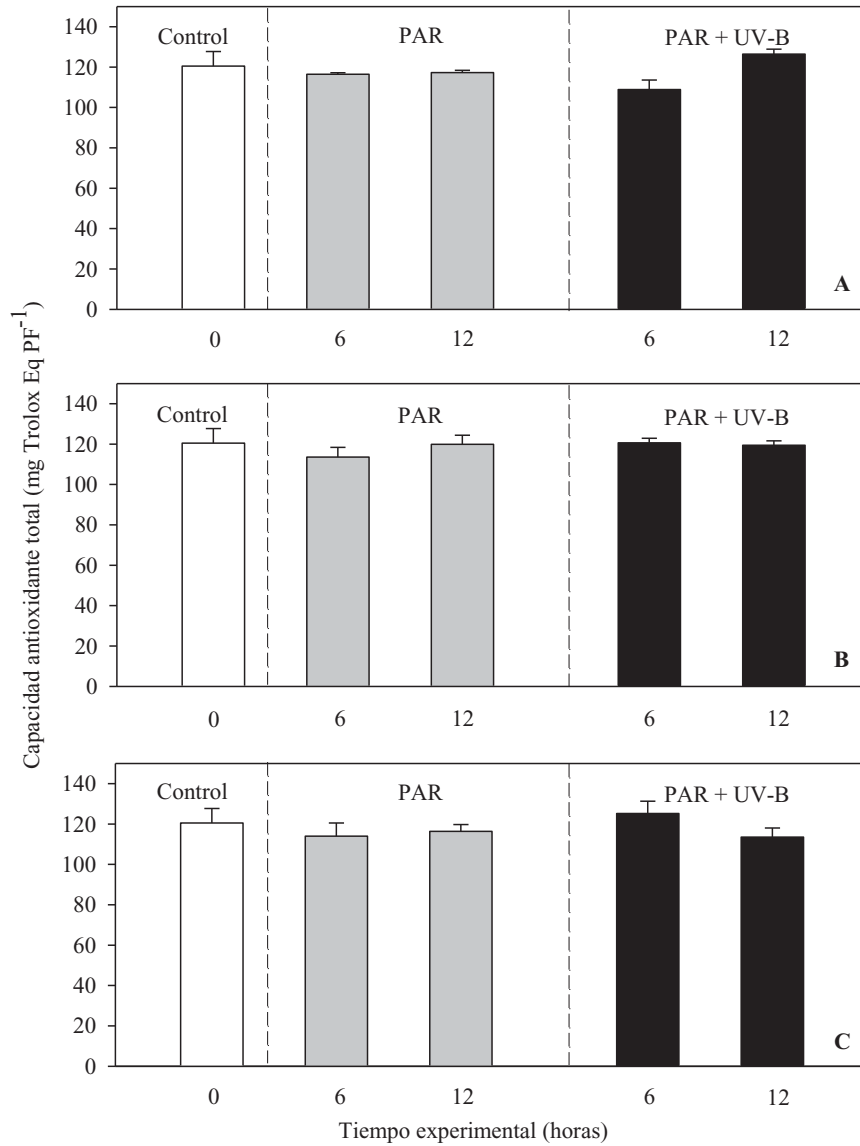


Figura 16: Niveles de capacidad antioxidante (mg Trolox Eq* g PF⁻¹) para los niveles de simbiosis, anémonas con alto nivel de simbiosis (A), bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento químico (B) y bajo nivel de simbiosis proveniente del tratamiento físico (C) de *Anthopleura hermaphroditica* expuestos experimentalmente a radiación PAR y PAR+ UV-B durante 6 y 12 horas. Barras (T) indican \pm ES.

6.2.5 Niveles de fenoles totales y capacidad antioxidante total

Se realizó una correlación de Pearson, de la cual se puede observar que al aumentar los fenoles totales existe un aumento de la capacidad antioxidante total (Figura 17). Sin embargo, el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,32$) muestra que la relación entre los datos es baja (Figura 17).

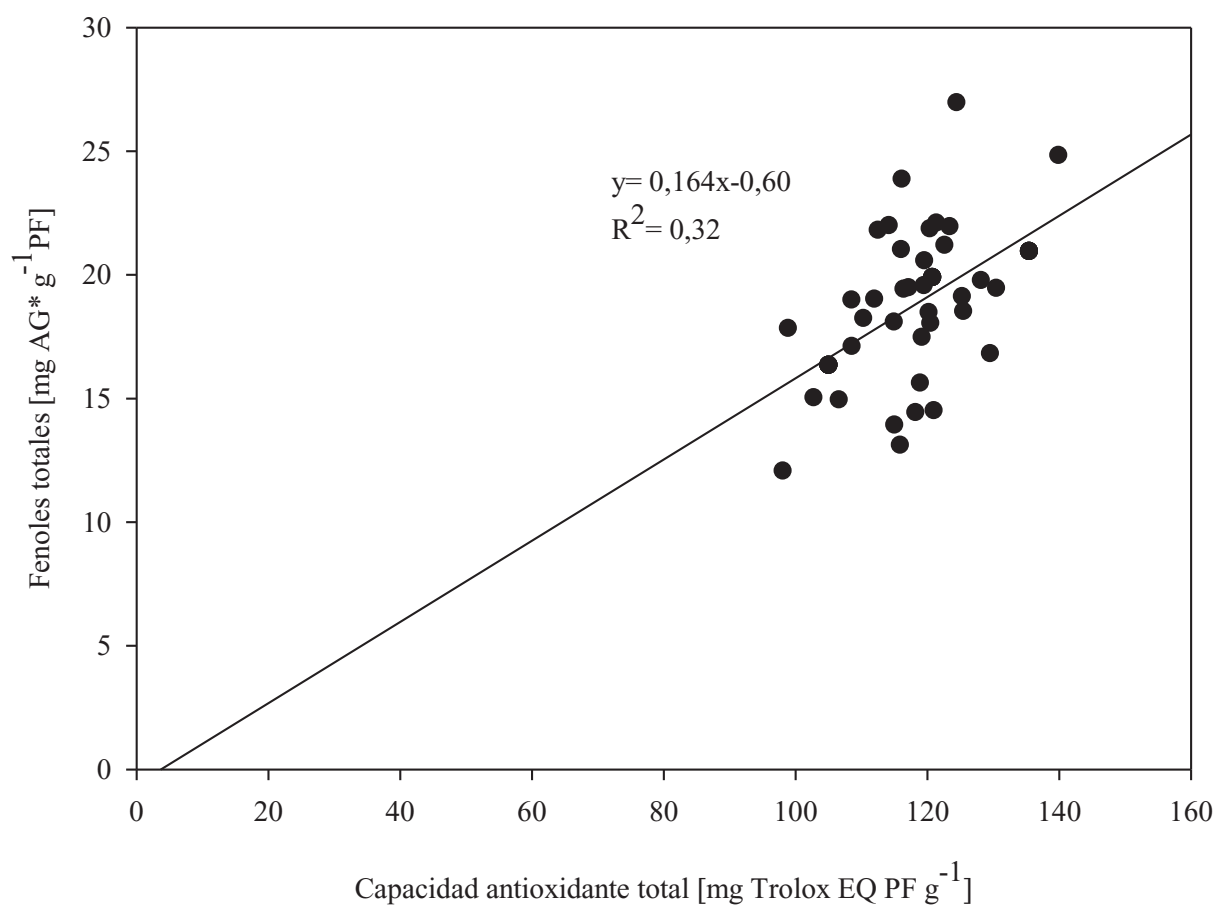


Figura 17: Correlación de Pearson entre fenoles totales [mg AG*g⁻¹PF] con la capacidad antioxidante total [mg Trolox EQ PF g⁻¹]. R^2 indica el coeficiente de determinación.

7. DISCUSIÓN

Anthopleura hermaphroditica es una anémona que presenta simbiosis junto a *Symbiodinium sp.*, habitando en planicies intermareales de zonas marinas y estuarinas en el sur de Chile. Consecuentemente, este cnidario está expuesto a periódicas fluctuaciones en las condiciones ambientales circundantes debido a los cambios de marea, situación que puede generar elevados niveles de daño celular lo cual favorece la expulsión de las zooxantelas simbiotes.

7.1 Liberación de *Symbiodinium sp.* desde *Anthopleura hermaphroditica*

A través de los experimentos llevados cabo bajo condiciones de laboratorio, es posible indicar en términos generales que cuando se comparan pólipos expuestos a tratamiento físico con los organismos controles (obscuridad total), éstos últimos presentaron una liberación del 5.8% del total liberado por los organismos experimentales en el tiempo de 8 semanas. Lo anterior se puede corroborar debido que los controles de ambos tratamientos no presentaron una decoloración evidente de sus tentáculos (Figura 11 A). Estos resultados permiten inferir que la privación de luz no es un factor determinante en los índices de blanqueamiento, al corto plazo, en *Anthopleura hermaphroditica*. En este sentido, investigaciones previas indican que existe una respuesta diferenciada frente a la obscuridad, puesto que pólipos de *Aiptasia pulchella* pueden expulsar hasta el 50% del total de las zooxantelas en un periodo de tiempo de 10 días; por el contrario *Anthopleura elegantissima* puede lograr la completa expulsión de los simbiotes después de un periodo de 1 año en condiciones de total obscuridad (Steen & Muscatine, 1987, Weis & Levine, 1996). Por otro lado, estudios sobre el proceso de blanqueamiento en corales indican que los incrementos de temperatura han sido identificados como el principal mecanismo que genera la expulsión de simbiotes desde este tipo de animales (Baker *et al.*, 2008). Así, en esta

investigación se observó que el 100% de los pólipos expuestos a fluctuaciones de temperatura durante un periodo de tres semanas, generan la expulsión de aproximadamente el 47% del total de las zooxantelas, resultado que es concordante con las observaciones llevadas a cabo en la anémona simbiote *Anemonia viridis* donde la exposición a elevados niveles de temperatura induce la expulsión del 50% de su total de zooxantelas en un periodo de 10 días (Dani *et al.*, 2016).

Si bien el efecto individual de la privación de luz y temperatura aportan con distintos porcentajes a la expulsión de zooxantelas desde los pólipos, su efecto sinérgico también es determinante en este proceso. Así, un estudio previo, utilizando la anémona simbiote *Aiptasia pallida*, indica que la combinación de elevada temperatura sumados a un ciclo de luz y oscuridad originan importantes niveles de daño en el centro de reacción fotosintético, debido a la alta producción de ROS por parte de la zooxantela (Tolleter *et al.*, 2013), situación que facilita la expulsión de las microalgas.

A diferencia de previos experimentos de expulsión realizados en corales y anémonas en los cuales se desciende o aumenta la temperatura del agua de mar, la presente investigación es el primer trabajo en el cual se utilizan rangos térmicos observados en el ambiente (invierno / verano) para generar individuos con un bajo nivel de simbioses (casi aposimbioses) (Steen & Muscatine, 1987, Cowlin, 2012, Lehnert *et al.*, 2012, Paxton *et al.*, 2013, Tolleter *et al.*, 2013, Matthews *et al.*, 2016, Pey *et al.*, 2017, de Orte *et al.*, 2019) . Se ha registrado en corales que estrés por frío parece ser fisiológicamente similar al estrés por calor , puesto que ambos dependen de la luz implicando un mecanismo en común asociado al fotodaño del PSII y pérdida de simbioses (Silverstein *et al.*, 2017).

Considerando que *A. hermaphroditica* es una anémona estuarina la cual habita en zonas intermareales, la baja mortalidad observada durante el desarrollo del tratamiento físico (estrés térmico) de la presente investigación puede explicarse debido a que este organismo está expuesto a fluctuaciones térmicas reguladas por una componente temporal diaria (cambios de marea) como estacional (distintos niveles de temperatura) (Cubillos *et al.*, 2018). Debido a su escaso movimiento (prácticamente sésil), durante periodos de marea baja este organismo queda confinado en pequeñas pozas de marea donde la temperatura ambiental puede afectar directamente a este organismo. Sin embargo, la capacidad de aclimatación a las condiciones ambientales a través de la utilización del metabolismo antioxidante es fundamental para poder minimizar el daño celular. Aunque los mecanismos que permiten a este organismo vivir bajo importantes fluctuaciones de temperatura aún no han sido estudiados, es posible que ellos puedan hacer uso de proteínas de estrés térmico (HSP) (Oakley *et al.*, 2017), lo cual podría ayudar a este organismo a enfrentar de mejor manera los periodos de estrés por temperatura en la zona intermareal.

La baja liberación de zooxantelas tanto de los organismos controles del shock térmico (5%) como de los controles de tratamiento químico (7%) correspondería a la liberación normal de zooxantelas que posee *Anthopleura hermaphroditica*. Puesto que no se observó una disminución en la coloración de los tentáculos. Estudios previos en los corales *Acropora palmata* y *Pocillopora damicornis* indican que bajo condiciones normales de luz ($350 \mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$), pueden liberar hasta el 2% del total de células simbiotes en un periodo entre 3 y 18 días (Vidal-Dupiol *et al.*, 2009, DeSalvo *et al.*, 2010). Bajo condiciones de laboratorio, se ha descrito que pólipos sanos tienden a expulsar simbiotes en pequeñas cantidades de forma constante con la finalidad de: 1) clasificar y eliminar simbiotes inapropiados del holobionte, 2) control de la

densidad de *Symbiodinium* y mantener la proporción de la simbiosis, 3) adaptación a diferentes condiciones ambientales (*e.g* : cambios estacionales) (Dani *et al.*, 2016).

Aunque se desconoce el mecanismo exacto de liberación de simbioses bajo condiciones normales (Allemand & Furla, 2018), existen vías de liberación de zooxantelas que consideran: 1) exocitosis del hospedero, 2) degradación *in situ* del hospedero, 3) apoptosis de las células hospedadoras (cnidario), 4) necrosis de la célula hospedadora y/o por medio del 5) desprendimiento de las células simbioses del hospedador (Davy *et al.*, 2012) (Figura 18).

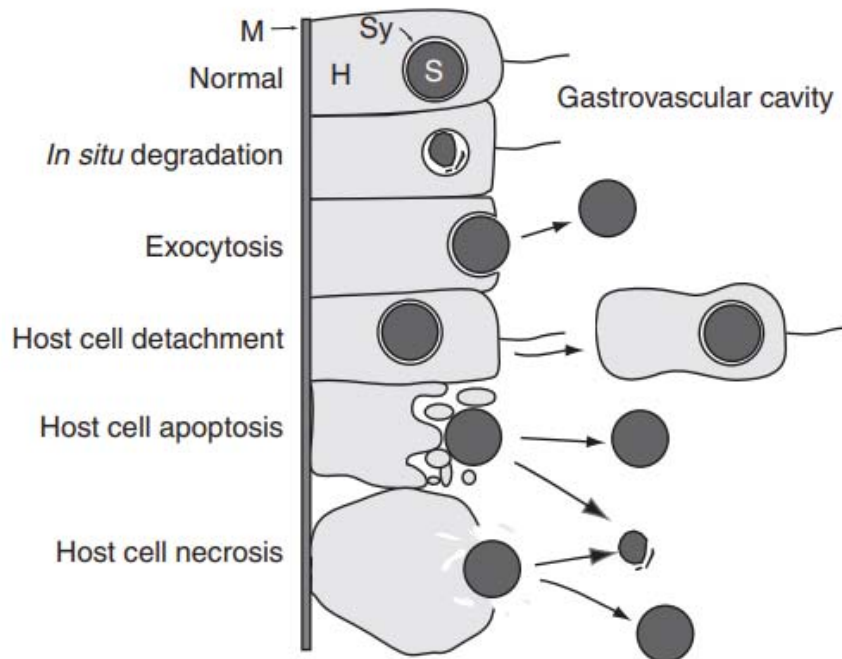


Figura 18: Mecanismos celulares de pérdida de simbioses por parte de los cnidarios (tomado de Weis, 2008).

La solución de mentol + MeOH hasta la cuarta semana genera concentraciones de *Symbiodinium* 98% mayor que las liberadas por el control en el mismo periodo de tiempo, donde los pólipos que fueron tratados presentaron su punto máximo de liberación (Figura 8). Se ha observado que la anémona *Anemonia viridis* expuesta a concentraciones de 0,58 mM de mentol + MeOH posee pérdidas significativas al día 10 de experimentación (Dani *et al.*, 2016).

El estresor físico (variación de temperatura) como el químico (solución de mentol+MeOH) producen liberaciones de *Symbiodinium* que disminuyen la concentración de la microalga al interior del hospedador (Figura 11). Sin embargo, en el presente trabajo se obtuvieron aposimbiontes parciales después del tratamiento de blanqueamiento. Puesto que, la liberación promedio para tratamiento físico y químico fue de aproximadamente 17,4 y 15,8 millones respectivamente. Si bien la diferencia en número no es grande, dichas diferencias se hacen evidente cuando se comprara la coloración de los tentáculos de ambos tratamientos.

En el tratamiento por estrés térmico (físico) existe una degradación de los colores de los tentáculos los cuales cambian de un color café-dorado a una coloración gris-blanquecino (Figura 11 G); mientras que en el individuo con tratamiento químico el cambio es hacia una coloración café claro (Figura 11 D). Si bien la pérdida de simbiosis conlleva una pérdida en la coloración, esto implica también una notoria disminución en la fluorescencia de la clorofila en los tentáculos (Figura 11 F, I). En el proceso físico se observó que individuos adultos que ya presentan una clara disminución de su coloración, a partir de la quinta semana, empezaron a liberar juveniles blanqueados (Figura 12 A). Lo que sugiere que la adquisición de las zooxantelas podría ser por medio de la vía vertical, en sí el traspaso de microalgas desde el adulto al juvenil que se encuentra en el interior de la cavidad gastrovascular (Belda-Baillie *et al.*, 2002).

Durante el tiempo experimental bajo ambas condiciones de estrés, la pérdida de zooxantelas no fue total. Lo anterior puede corroborarse con otros trabajos realizados en *Anthopleura aureoradiata* y *Aiptasia* sp., donde el proceso de blanqueamiento puede llegar a durar entre 3 a 6 meses (Cowlin, 2012, Matthews *et al.*, 2016). En la presente investigación el proceso de blanqueamiento o expulsión de zooxantelas simbiotes fue mucho más efectivo bajo condiciones de estrés térmico (tratamiento físico) que aquellos expuestos a un estrés químico (utilizando una solución de cristales de mentol + MeOH).

Lo anterior se sustenta en que la temperatura es considerado el principal factor que controla el blanqueamiento en cnidarios (Weis, 2008). Bajo este escenario, lo más seguro para el holobionte es generar la expulsión de los simbiotes puesto que así evita la sobre-producción de ROS debido a la inhibición térmica de la fotosíntesis, debido a la destrucción de la proteína D1 (Takahashi *et al.*, 2004, Lesser, 2011, Hawkins & Warner, 2017).

Sin embargo, un estudio reciente indica que la generación de pólipos aposimbiontes utilizando un tratamiento químico (cristales de mentol + MeOH) es una metodología más efectiva y rápida, debido a que, otorga individuos 100% aposimbiontes mientras los organismos tratados con temperatura solo alcanzan una expulsión del 60% y en un periodo más largo de tiempo (Matthews *et al.*, 2016). Las posibles vías por las que se genera el blanqueamiento bajo tratamiento químico está relacionado con que el mentol aumenta la activación del receptor potencial transitorio (TRP) M8 del hospedador que produce un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Wang *et al.*, 2012, Matthews *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2017), el cual regula la autofagia (Dani *et al.*, 2016). Mientras que el estrés térmico genera una fotoinhibición de la actividad del fotosistema II (Wang *et al.*, 2012).

Durante la generación de pólipos con bajos niveles de zooxantelas tanto por la metodología física y química, se observó que *Anthopleura hermaphroditica* generó la liberación de un pellet desde la cavidad gastrovascular que estaba compuesto de mucus, restos de digestión y zooxantelas (observación personal). Nuestras observaciones concuerdan con aquellas registradas previamente por Dani *et al.* (2016) y Wang *et al.* (2012) donde se observó el mismo comportamiento en la anemona *Anemonia viridis* expuesta a una concentración de mentol del 0,58 mM.

Se ha observado en *Anemonia viridis* y *Aiptasia sp* que la exposición a elevados niveles de temperatura genera importantes niveles de expulsión de simbiontes debido a procesos de apoptosis y necrosis del simbiote (Dunn *et al.*, 2004, Dani *et al.*, 2016), apoptosis de células del hospedador así también como de la liberación de células gastrodermales conteniendo simbiontes (Bieri *et al.*, 2016). El comportamiento de blanqueamiento de *Anthopleura hermaphroditica* es distinto a los demás organismos previamente mencionados, pues se debe considerar que el blanqueamiento es un proceso heterogéneo tanto espacial como taxonómicamente, que depende de la identidad genética del hospedador y simbiote, historia de vida de la simbiosis, exposición previa al estresor y características del ambiente (Hawkins *et al.*, 2015).

7.2 Respuesta celular frente al estrés por radiación UV-B y su relación con los niveles de simbiosis.

Es sabido que la radiación UV-B es considerada un factor determinante en la distribución batimétrica de distintos organismos marinos en zonas costeras (Bischof *et al.*, 2006) debido que tanto la absorción directa como indirecta genera problemas celulares, debido a la formación de CPDs y ROS respectivamente los cuales puede generar desde malformaciones anatómicas en

estadios tempranos del desarrollo, afectando aspectos reproductivos, impactando el desarrollo larval, capacidad fotosintética, tasas fisiológicas, hasta la muerte (Núñez-Pons *et al.*, 2018).

Sin embargo en cnidarios simbioses se han identificado estrategias basadas en el uso de metabolitos secundarios (MAA) o a través de mecanismos de foto-reparación enzimática (PER), que pueden minimizar el daño por CPDs (Cubillos *et al.*, 2015). Adicionalmente, las estrategias para minimizar el daño oxidativo a lípidos y proteínas están basadas en eficientes capacidades defensivas basadas en el uso de antioxidantes así también como en mecanismos de reparación celular (Lesser, 2006, Cubillos *et al.*, 2016).

Nuestros resultados indican que el tiempo de exposición es determinante en los niveles de daño oxidativo en pólipos de *A. hermaphroditica* indistintamente de los niveles de simbiosis o tipo de radiación. Considerando los resultados obtenidos en este estudio, es posible indicar que pólipos con bajo nivel de simbiosis de *A. hermaphroditica* son más susceptibles frente a los niveles de radiación UVB que los organismos con alto nivel de simbiosis, lo cual indica que, si bien la simbiosis es beneficiosa en términos nutricionales, esta asociación también favorece al complejo holobionte a minimizar el daño celular. Similares resultados fueron encontrados por Hörtnagl & Sommaruga (2007) quienes observaron que el ciliado simbiote *Paramecium bursaria* presenta menores niveles de daño oxidativo que aquellos organismos aposimbioses expuestos a radiación PAR.

Parte de estos resultados pueden ser explicados debido que la presencia de microalgas beneficia al hospedador frente a la absorción directa de la UV-B debido que los simbioses son los que pueden sintetizar compuestos fotoprotectores que absorben longitudes de onda entre 315-360 nm (Paredes-Molina *et al.*, 2016). Se ha observado que corales expuestos a prolongados periodos de

UV-B, generan una mayor concentración de compuestos fotoprotectores y menor densidad de microalgas simbiotes (zooxantelas) que en aquellos pólipos expuestos únicamente a radiación PAR (Kinzie, 1993). En este sentido, análisis bioquímicos llevados a cabo en la anémona *Anthopleura hermaphroditica* indican la presencia de un compuesto fotoprotector del tipo micosporinas del tipo aminoácido identificado como Mycosporine 2-glicina (Myc 2-gly) la cual tiene una absorbancia máxima (λ_{\max}) de 331 nm (Cubillos *et al.*, 2018). Lo anterior implica que los compuestos fotoprotectores están absorbiendo algunas longitudes de onda del rango UV-B y algunas longitudes de onda del UV-A. Uno de los beneficios de la utilización de MAA es que la energía es disipada sin inducir la generación de ROS (de la Coba *et al.*, 2019).

Lamentablemente, es difícil poder comparar nuestros resultados en términos de estrés oxidativo, ya que no existen muchos estudios al respecto que incluyan el efecto foto-oxidativo y los niveles de simbiosis en anémonas. Sin embargo, registros previos corroboran experimentalmente que la exposición a la UV-B genera elevados niveles de daño oxidativo a lípidos y proteínas, lo cual se corroboró exponiendo a la anémona aposimbionte *Actinia tenebrosa* a niveles normales (ambientales / PAR+UVA+UVB) e incrementados de radiación UV-B (en un contexto de reducción de ozono estratosférico / PAR+UVA+20%UVB) y comparados con los niveles de PAR y PAR+UVA (Cubillos *et al.*, 2014).

En cuanto a la peroxidación lipídica, esta presentó valores similares (35-100 nmol MDA g PF⁻¹) observados en *Anthopleura hermaphroditica* en un ciclo diario expuesta a radiación ambiental en periodo de invierno (Cubillos *et al.*, 2018). La anémona *A. tenebrosa* bajo una exposición aumentada de PAR + UV-A + UV-B al cuarto día presentó valores de peroxidación lipídica 2 a 5

veces menores que los encontrados en individuos tratados a las 6 horas de exposición, sin embargo, similares a los encontrados a las 12 horas de exposición (Cubillos *et al.*, 2014).

Durante las 12 horas de exposición la radiación PAR y PAR+ UV-B, genera un aumento de la producción de carbonilos proteicos y disminución de peroxidación lipídica en la mayoría de las condiciones simbióticas (a excepción de los pólipos con altos niveles de simbiosis y del tratamiento químico en UVB). En condiciones estuarinas *A. hermaphroditica* acumula el daño de las proteínas hacia el final del día para así regenerar las proteínas durante la noche (Cubillos *et al.*, 2018)

Inherentemente, la simbiosis con productores primarios conlleva que estos organismos deban fotosintetizar siempre y cuando estén expuestos a niveles aceptables de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Consecuentemente, la clorofila es considerada una molécula que promueve la foto-oxidación debido a que en su estado excitado (triple estado) en el complejo antena del PSII da origen al oxígeno singlete, compuesto altamente reactivo que puede: 1) dañar al cloroplasto de las zooxantelas, al condensar las lamelas de tilacoides y excluir el lumen (Downs *et al.*, 2013); 2) disminución del proceso fotosintético de la zooxantela debido a la reducción de la concentración de la proteína D1 (Aro *et al.*, 1993, Lesser & Farrell, 2004), y la acción de la RUBISCO, enzima encargada de la fijación del CO₂ (Lesser, 1996). En términos generales, elevados niveles de daño oxidativo generarán problemas asociados principalmente a la eficiencia fotosintética de los productores primarios (Ort & Kramer, 2009).

Los altos niveles de daño oxidativo de los pólipos provenientes del tratamiento físico (cambios térmicos) se originarían posiblemente debido que los incrementos de temperatura pueden generar una degradación de las mitocondrias del hospedador, específicamente en el complejo III de la

cadena transportadora de electrones, citocromo *c* y la actividad de la ATP sintetasa (Dunn *et al.*, 2012).

Considerando que obtuvimos individuos con bajos niveles de zooxantelas, nuestros resultados indican que los niveles de daño oxidativo a las proteínas no son significativamente diferentes cuando se comparan con los niveles observados en organismos con altos niveles de zooxantelas. Lo anterior sugiere que probablemente los niveles de daño proteico están principalmente siendo generados por la respuesta del hospedador a la radiación UV-B y que el aporte de los simbioses al daño celular es mínimo. Lo anterior se sustenta en que la foto-oxidación en animales es inducida principalmente por cromóforos presentes en la célula (e.g porfirinas, compuestos aromáticos o vitaminas) que pueden inducir la generación de daño oxidativo a las proteínas (Pattison *et al.*, 2012).

Consecuentemente, ROS es generado a vía fosforilación oxidativa y en bajas concentraciones es utilizado como moléculas de señalización celular. Sin embargo cuando los niveles aumentan, ellos inducen daño a las membranas internas de la mitocondria, afectando su permeabilidad, induciendo una pérdida de protones y la concomitante reducción en la generación de ATP (Brookes, 2005). Así, para evitar una reducción en el ATP disponible, animales debe interceptar ROS antes que se genere daño oxidativo, con el objetivo de proteger el centro productor de ATP.

En las distintas masas de agua se puede generar H₂O₂ por medio de la fotoactivación por UV-B del DOC y DOM (Abele-Oeschger *et al.*, 1997). Sin embargo, en el presente trabajo no se consideró debido a que se buscó entender si se generaba daño oxidativo, sin identificar cuáles eran las especies reactivas de oxígeno (ROS) específicas.

Claramente la respuesta defensiva frente a la creciente generación de ROS por exposición a la UV-B es a incrementar las defensas antioxidantes. Aunque esta línea defensiva celular está supeditada a la actividad antioxidante enzimática y no enzimática, en este estudio solo se determinó la capacidad antioxidante total. En cuanto a la capacidad antioxidante las anémonas controles presentaron elevados niveles de capacidad antioxidante (120 mg Trolox Eq PF g⁻¹), la cual no presentó diferencias significativas cuando fueron comparadas entre aquellos pólipos provenientes de los distintos niveles de simbiosis (físicos y químicos) y tratamientos de radiación (PAR y PAR+UV-B). Estudios llevados a cabo utilizando la anemona *A. tenebrosa*, indica que la exposición a la radiación UV-B genera incrementos significativos en los niveles de antioxidantes enzimáticos (e.g SOD, CAT, GPox, Gr) cuando estos son comparados con los organismos controles (PAR) (Cubillos *et al.*, 2014). En el presente estudio, *A. hermaphroditica* no evidenció cambios significativos en los niveles de capacidad antioxidante entre tratamientos, tiempo y niveles de simbiosis. Los valores reportados en este estudio son aproximadamente 50% más bajos que aquellos reportados por Cubillos *et al.* (2018) en el estuario del río Quempillén. En términos generales, la mantención de los mecanismos de defensa antioxidante es costosa en términos energéticos (Deneke *et al.*, 1983), por lo cual es necesario mantener los centros productores de energía.

Se ha observado que anemonas simbiontes poseen compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades antioxidantes y fotoprotectoras (Velioglu *et al.*, 1998, Lesser, 2006, Louis *et al.*, 2016). Así la relación entre la capacidad antioxidante del complejo holobionte con los niveles de compuestos fenólicos (correlación de Pearson, R²= 0.32), están positivamente correlacionados, por lo tanto, al haber un aumento en los compuestos fenólicos, se incrementa la capacidad antioxidante. Los valores de correlación en este estudio son aproximadamente 50% menor que

los reportados anteriormente para encontrada en *A. hermaphroditica* en terreno ($R^2= 0.6$) (Cubillos *et al.*, 2018).

Aun cuando los compuestos fenólicos (tocoferol, carotenoides, flavonoides, entre otros) poseen roles antioxidantes (Velioglu *et al.*, 1998), la relación presente en este trabajo es baja por lo que posiblemente la capacidad de interceptar está siendo otorgada por compuestos no enzimáticos provenientes del pólipo como pocilloporinas, microsporinas del tipo aminoácidos (MAAs), ácido ascórbico, carotenoides entre otros en los pólipos (Lesser, 2006, Richier *et al.*, 2010, Furla *et al.*, 2011).

Mientras que en *Symbiodinium* sp. produce como antioxidantes no enzimáticos exclusivamente carotenoides, peridinina, xantinas y compuestos fenólicos (Louis *et al.*, 2016). La respuesta antioxidante enzimática se ha observado en cnidarios durante periodos intensos y/o largos de estrés ambiental, observándose la generación de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPox) (Lesser, 2006, Lesser, 2011). Aunque estas enzimas no fueron determinadas en el actual estudio, es importante indicar que su actividad si está regulando la capacidad defensiva de *A. hermaphroditica*.

Complementariamente al uso de antioxidantes, vías de detoxificación celular como las de las glioxilasas han sido identificadas en invertebrados marinos como una vía para eliminar aldehídos citotóxicos como el metilglioxal que se genera durante la peroxidación lipídica. La vía funciona por medio de dos enzimas (glioxalasa I y II) que trabajan en conjunto para eliminar el metilglioxal, el cual si no es eliminado puede producir la generación de H_2O_2 (Cubillos *et al.*, 2016). Es posible que el uso de estas vías pueda haber minimizado los niveles de daño, lo cual es evidente durante 12 horas de exposición a la radiación UV-B. Es posible pensar que la célula está

invirtiendo elevados niveles de energía para sintetizar enzimas y compuestos antioxidantes para interceptar y neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS, e.g. $^1\text{O}_2$, O_2^- , OH^- , H_2O_2) y así evitar elevados niveles de daño oxidativo (Abele *et al.*, 2011).

En resumen, *A. hermaphroditica* es una anémona prácticamente sésil, que vive en ambientes estuarinos que se caracterizan por cambios en los estresores ambientales en periodo de horas y días. Su asociación con microalgas simbiotas puede ayudar a enfrentar prolongados periodos de radiación ambiental debido a que las zooxantelas otorgan al complejo holobionte sustancias sintetizadas para aminorar la producción de ROS, como antioxidantes y compuestos fotoprotectores, por lo que las anémonas con alto nivel de simbiotas generan menor daño oxidativo que los con bajo nivel de simbiotas, por lo tanto, se rechaza la primera hipótesis. Mientras que la segunda hipótesis es aceptada, puesto que la simbiosis pareciera favorecer a los pólipos por tener una mayor capacidad antioxidante puesto que se observó que el daño oxidativo independiente de la condición simbiótica puede tener fotooxidación inducida por los cromóforos presentes en la célula.

8. CONCLUSIÓN

El tiempo implicado en la obtención de organismos blanqueados por medio de liberación de zooxantelas fue menor en pólipos tratados por método físico que por el método químico. Por lo cual la concentración de células simbiotes liberadas al ambiente fue mayor en este tipo de organismos. Así, para la obtención de aposimbiontes de *A. hermaphroditica* para futuros trabajos se recomienda la utilización del tratamiento por shock térmico, pero por un periodo más prolongado.

La presencia de simbiote en la gastrodermis de *A. hermaphroditica* demostró ser una ventaja para los pólipos, puesto que genera un beneficio ante la exposición de radiación PAR y UV-R, debido al aporte de antioxidantes y compuestos fotoprotectores. Estudios posteriores deben ser llevados a cabo para determinar que, compuestos como antioxidantes enzimáticos y fotoprotectores, se encuentran en cada organismo que compone esta simbiosis.

El presente estudio en *Anthopleura hermaphrodítica*, es el primero en identificar la respuesta foto-oxidativa en adultos de la anemona estuarina expuesta a distintos niveles de simbiosis.

9. REFERENCIAS

- Abele-Oeschger, D., Tüg, H. & Röttgers, R. (1997). Dynamics of UV-driven hydrogen peroxide formation on an intertidal sandflat. *Limnology and oceanography*, 42, 1406-1415.
- Abele, D., Vazquez-Medina, J. P. & Zenteno-Savin, T. (2011). *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, John Wiley & Sons.
- Allemand, D. & Furla, P. (2018). How does an animal behave like a plant? Physiological and molecular adaptations of zooxanthellae and their hosts to symbiosis. *Comptes rendus biologiques*, 341, 276-280.
- Aro, E.-M., McCaffery, S. & Anderson, J. M. (1993). Photoinhibition and D1 protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant physiology*, 103, 835-843.
- Baker, A. C., Glynn, P. W. & Riegl, B. (2008). Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, coastal and shelf science*, 80, 435-471.
- Barott, K. L., Venn, A. A., Perez, S. O., Tambutté, S. & Tresguerres, M. (2015). Coral host cells acidify symbiotic algal microenvironment to promote photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 607-612.
- Belda-Baillie, C. A., Baillie, B. K. & Maruyama, T. (2002). Specificity of a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *The Biological Bulletin*, 202, 74-85.
- Bieri, T., Onishi, M., Xiang, T., Grossman, A. R. & Pringle, J. R. (2016). Relative contributions of various cellular mechanisms to loss of algae during cnidarian bleaching. *PLoS One*, 11, e0152693.
- Bischof, K., Gomez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U., Roleda, M. Y., Zacher, K. & Wiencke, C. (2006). Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 5, 141-166.
- Brookes, P. S. (2005). Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 12-23.
- Brown, B. E. (1997). Coral bleaching: causes and consequences. *Coral reefs*, 16, S129-S138.
- Brown, K. T., Bender-Champ, D., Kubicek, A., van der Zande, R., Achlatis, M., Hoegh-Guldberg, O. & Dove, S. G. (2018). The dynamics of coral-algal interactions in space and time on the southern Great Barrier Reef. *Frontiers in Marine Science*, 5, 181.

- Campbell, J. M. & Campbell, J. B. (1986). Matemática de laboratório: aplicações médicas e biológicas. *Matemática de laboratório: aplicações médicas e biológicas*.
- Corinaldesi, C., Marcellini, F., Nepote, E., Damiani, E. & Danovaro, R. (2018). Impact of inorganic UV filters contained in sunscreen products on tropical stony corals (*Acropora* spp.). *Science of The Total Environment*, 637, 1279-1285.
- Cowlin, M. (2012). Osmoregulation and the anthozoan-dinoflagellate symbiosis.
- Cubillos, V., Chaparro, O., Segura, C., Montory, J., Cruces, E. & Burritt, D. (2016). Isolation-hypoxia and re-oxygenation of the pallial cavity of female *Crepidatella dilatata* during estuarine salinity changes requires increased glyoxylase activity and antioxidant metabolism to avoid oxidative damage to female tissues and developing embryos. *Marine environmental research*, 119, 59-71.
- Cubillos, V., Ramírez, E., Cruces, E., Montory, J., Segura, C. & Mardones, D. (2018). Temporal changes in environmental conditions of a mid-latitude estuary (southern Chile) and its influences in the cellular response of the euryhaline anemone *Anthopleura hermaphroditica*. *Ecological Indicators*, 88, 169-180.
- Cubillos, V. M., Burritt, D. J., Lamare, M. D. & Peake, B. M. (2015). The relationship between UV-irradiance, photoprotective compounds and DNA damage in two intertidal invertebrates with contrasting mobility characteristics. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, 280-288.
- Cubillos, V. M., Lamare, M. D., Peake, B. M. & Burritt, D. J. (2014). Cellular changes associated with the acclimation of the intertidal sea anemone *Actinia tenebrosa* to ultraviolet radiation. *Photochemistry and photobiology*, 90, 1314-1323.
- Chaparro, O., Segura, C., Montiel, Y., Thompson, R. & Navarro, J. (2008). Variations in the quantity and composition of seston from an estuary in southern Chile on different temporal scales. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 76, 845-860.
- Dani, V., Priouzeau, F., Pagnotta, S., Carette, D., Laugier, J.-P. & Sabourault, C. (2016). Thermal and menthol stress induce different cellular events during sea anemone bleaching. *Symbiosis*, 69, 175-192.
- Davy, S. K., Allemand, D. & Weis, V. M. (2012). Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, 229-261.
- de la Coba, F., Aguilera, J., Korbee, N., de Gálvez, M. V., Herrera-Ceballos, E., Álvarez-Gómez, F. & Figueroa, F. L. (2019). UVA and UVB Photoprotective Capabilities of Topical Formulations Containing Mycosporine-like Amino Acids (MAAs) through Different Biological Effective Protection Factors (BEPFs). *Marine drugs*, 17, 55.

- de Orte, M. R., Clowez, S. & Caldeira, K. (2019). Response of bleached and symbiotic sea anemones to plastic microfiber exposure. *Environmental Pollution*.
- Deneke, S., Gershoff, S. & Fanburg, B. (1983). Potentiation of oxygen toxicity in rats by dietary protein or amino acid deficiency. *Journal of Applied Physiology*, 54, 147-151.
- DeSalvo, M. K., Sunagawa, S., Voolstra, C. R. & Medina, M. (2010). Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *Marine Ecology Progress Series*, 402, 97-113.
- Downs, C., McDougall, K. E., Woodley, C. M., Fauth, J. E., Richmond, R. H., Kushmaro, A., Gibb, S. W., Loya, Y., Ostrander, G. K. & Kramarsky-Winter, E. (2013). Heat-stress and light-stress induce different cellular pathologies in the symbiotic dinoflagellate during coral bleaching. *PLoS One*, 8, e77173.
- Dunn, S., Thomason, J., Le Tissier, M. & Bythell, J. (2004). Heat stress induces different forms of cell death in sea anemones and their endosymbiotic algae depending on temperature and duration. *Cell death and differentiation*, 11, 1213.
- 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, e39024.
- Fitt, W. & Pardy, R. (1981). Effects of starvation, and light and dark on the energy metabolism of symbiotic and aposymbiotic sea anemones, *Anthopleura elegantissima*. *Marine Biology*, 61, 199-205.
- Fransolet, D., Roberty, S. & Plumier, J.-C. (2012). Establishment of endosymbiosis: The case of cnidarians and Symbiodinium. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 420, 1-7.
- Fukumoto, L. R. & Mazza, G. (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- Furla, P., Richier, S. & Allemand, D. (2011). Physiological adaptation to symbiosis in cnidarians. *Coral Reefs: an Ecosystem in Transition*. Springer.
- Gabay, Y., Weis, V. M. & Davy, S. K. (2018). Symbiont Identity Influences Patterns of Symbiosis Establishment, Host Growth, and Asexual Reproduction in a Model Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *The Biological Bulletin*, 234, 1-10.
- Ganot, P., Moya, A., Magnone, V., Allemand, D., Furla, P. & Sabourault, C. (2011). Adaptations to endosymbiosis in a cnidarian-dinoflagellate association: differential gene expression and specific gene duplications. *PLoS genetics*, 7, e1002187.

- Glynn, P. W. (1984). Widespread coral mortality and the 1982–83 El Niño warming event. *Environmental Conservation*, 11, 133-146.
- Gordon, B. R. & Leggat, W. (2010). Symbiodinium—invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Marine drugs*, 8, 2546-2568.
- Goreau, T. J. & Hayes, R. L. (1994). Coral bleaching and ocean "hot spots". *Ambio-Journal of Human Environment Research and Management*, 23, 176-180.
- Gundlach, K. A. & Watson, G. M. (2019). The effects of symbiotic state and nutrient availability on the cnidom in the model sea anemone, *Exaiptasia diaphana*. *Marine Biology*, 166, 31.
- Häussermann, V. & Försterra, G. (2009). *Fauna marina bentónica de la Patagonia Chilena: guía de identificación ilustrada*, Nature in Focus.
- Hawkins, T. D., Krueger, T., Wilkinson, S. P., Fisher, P. L. & Davy, S. K. (2015). Antioxidant responses to heat and light stress differ with habitat in a common reef coral. *Coral Reefs*, 34, 1229-1241.
- Hawkins, T. D. & Warner, M. E. (2017). Warm preconditioning protects against acute heat-induced respiratory dysfunction and delays bleaching in a symbiotic sea anemone. *Journal of Experimental Biology*, 220, 969-983.
- Hörtnagl, P. H. & Sommaruga, R. (2007). Photo-oxidative stress in symbiotic and aposymbiotic strains of the ciliate *Paramecium bursaria*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6, 842-847.
- Kinzie, R. (1993). Effects of ambient levels of solar ultraviolet radiation on zooxanthellae and photosynthesis of the reef coral *Montipora verrucosa*. *Marine Biology*, 116, 319-327.
- Koivikko, R. (2008). Brown algal phlorotannins: improving and applying chemical methods.
- LaJeunesse, T. C., Parkinson, J. E., Gabrielson, P. W., Jeong, H. J., Reimer, J. D., Voolstra, C. R. & Santos, S. R. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, 28, 2570-2580.e6.
- Lehnert, E. M., Burriesci, M. S. & Pringle, J. R. (2012). Developing the anemone *Aiptasia* as a tractable model for cnidarian-dinoflagellate symbiosis: the transcriptome of aposymbiotic *A. pallida*. *BMC genomics*, 13, 271.
- Lesser, M. P. (1996). Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnology and oceanography*, 41, 271-283.

- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 253-278.
- Lesser, M. P. (2011). Coral bleaching: causes and mechanisms. *Coral reefs: an ecosystem in transition*. Springer.
- Lesser, M. P. & Farrell, J. H. (2004). Exposure to solar radiation increases damage to both host tissues and algal symbionts of corals during thermal stress. *Coral reefs*, 23, 367-377.
- Louis, Y. D., Kaullysing, D., Gopeechund, A., Mattan-Moorgawa, S., Bahorun, T., Dyllal, S. D. & Bhagooli, R. (2016). In hospite Symbiodinium photophysiology and antioxidant responses in *Acropora muricata* on a coast-reef scale: implications for variable bleaching patterns. *Symbiosis*, 68, 61-72.
- Matthews, J. L., Sproles, A. E., Oakley, C. A., Grossman, A. R., Weis, V. M. & Davy, S. K. (2016). Menthol-induced bleaching rapidly and effectively provides experimental aposymbiotic sea anemones (*Aiptasia* sp.) for symbiosis investigations. *Journal of Experimental Biology*, 219, 306-310.
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V. & Marcos, J. C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, 458, 69-71.
- Middlebrook, R., Hoegh-Guldberg, O. & Leggat, W. (2008). The effect of thermal history on the susceptibility of reef-building corals to thermal stress. *Journal of Experimental Biology*, 211, 1050-1056.
- Nii, C. M. & Muscatine, L. (1997). Oxidative stress in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella* (Carlgren, 1943): contribution of the animal to superoxide ion production at elevated temperature. *The Biological Bulletin*, 192, 444-456.
- Núñez-Pons, L., Avila, C., Romano, G., Verde, C. & Giordano, D. (2018). UV-protective compounds in marine organisms from the southern ocean. *Marine drugs*, 16, 336.
- Oakley, C. A., Durand, E., Wilkinson, S. P., Peng, L., Weis, V. M., Grossman, A. R. & Davy, S. K. (2017). Thermal shock induces host proteostasis disruption and endoplasmic reticulum stress in the model symbiotic cnidarian *Aiptasia*. *Journal of proteome research*, 16, 2121-2134.
- Ort, D. & Kramer, K. (2009). Photosynthesis. In: eLS (ed.) *Encyclopedia of life sciences*. John Wiley & Sons.
- Paredes-Molina, F., Cubillos, V., Montory, J. & Andrade-Villagrán, P. (2016). Are embryonic developing modes determinant in the acquisition and levels of photoprotective

- compounds in slipper limpets of the *Crepidatella* genus? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 162, 511-518.
- Pattison, D. I., Rahmanto, A. S. & Davies, M. J. (2012). Photo-oxidation of proteins. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11, 38-53.
- Paxton, C. W., Davy, S. K. & Weis, V. M. (2013). Stress and death of cnidarian host cells play a role in cnidarian bleaching. *Journal of Experimental Biology*, jeb. 087858.
- Pey, A., Zamoum, T., Christen, R., Merle, P.-L. & Furla, P. (2017). Characterization of glutathione peroxidase diversity in the symbiotic sea anemone *Anemonia viridis*. *Biochimie*, 132, 94-101.
- Rehman, A. U., Szabó, M., Deák, Z., Sass, L., Larkum, A., Ralph, P. & Vass, I. (2016). *Symbiodinium* sp. cells produce light-induced intra-and extracellular singlet oxygen, which mediates photodamage of the photosynthetic apparatus and has the potential to interact with the animal host in coral symbiosis. *New Phytologist*, 212, 472-484.
- Richier, S., Sabourault, C., Ferrier-Pagés, C., Merle, P.-L., Furla, P. & Allemand, D. (2010). Cnidarian–Dinoflagellate Symbiosis-Mediated Adaptation to Environmental Perturbations. In: Seckbach, J. & Grube, M. (eds.) *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Roopin, M., Henry, R. P. & Chadwick, N. E. (2008). Nutrient transfer in a marine mutualism: patterns of ammonia excretion by anemonefish and uptake by giant sea anemones. *Marine Biology*, 154, 547-556.
- Ros, M., Pernice, M., Le Guillou, S., Doblin, M. A., Schrameyer, V. & Laczka, O. (2016). Colorimetric detection of caspase 3 activity and reactive oxygen derivatives: Potential early indicators of thermal stress in corals. *Journal of Marine Biology*, 2016.
- Rosenberg, E. & Loya, Y. (2013). *Coral health and disease*, Springer Science & Business Media.
- Rowan, R., Knowlton, N., Baker, A. & Jara, J. (1997). Landscape ecology of algal symbionts creates variation in episodes of coral bleaching. *Nature*, 388, 265.
- Safaie, A., Silbiger, N. J., McClanahan, T. R., Pawlak, G., Barshis, D. J., Hench, J. L., Rogers, J. S., Williams, G. J. & Davis, K. A. (2018). High frequency temperature variability reduces the risk of coral bleaching. *Nature communications*, 9.
- Salama, A. M. & Pearce, R. S. (1993). Ageing of Cucumber and Onion Seeds: Phospholipase D, Lipoxygenase Activity and Changes in Phospholipid Content. *Journal of Experimental Botany*, 44, 1253-1265.

- Schoenberg, D. & Trench, R. (1980). Genetic variation in *Symbiodinium* (= *Gymnodinium*) *microadriaticum* Freudenthal, and specificity in its symbiosis with marine invertebrates. I. Isoenzyme and soluble protein patterns of axenic cultures of *Symbiodinium microadriaticum*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 207, 405-427.
- Schories, D., Reise, K., Sanamyan, K., Sanamyan, N., Clasing, E. & Reise, A. (2011). Actinian dominated intertidal mudflats: A new case of an extraordinary rare phenomenon from Southern Chile. *Journal of sea research*, 65, 304-314.
- Silverstein, R. N., Correa, A. M. & Baker, A. C. (2012). Specificity is rarely absolute in coral-algal symbiosis: implications for coral response to climate change. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279, 2609-2618.
- Silverstein, R. N., Cunning, R. & Baker, A. C. (2015). Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. *Global change biology*, 21, 236-249.
- Silverstein, R. N., Cunning, R. & Baker, A. C. (2017). Tenacious D: Symbiodinium in clade D remain in reef corals at both high and low temperature extremes despite impairment. *Journal of Experimental Biology*, 220, 1192-1196.
- Spano, C., Rozbaczylo, N., Häussermann, V. & Bravo, R. (2013). Redescrición de las anémonas de mar *Anthopleura hermaphroditica* y *Bunodactis hermafroditica* (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) de Chile. *Revista de biología marina y oceanografía*, 48, 521-534.
- Starzak, D. E., Quinnell, R. G., Nitschke, M. R. & Davy, S. K. (2014). The influence of symbiont type on photosynthetic carbon flux in a model cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Marine biology*, 161, 711-724.
- Stat, M. & Gates, R. D. (2011). Clade D Symbiodinium in Scleractinian Corals: A Nugget of Hope, a Selfish Opportunist, an Ominous Sign, or All of the Above? *Journal of Marine Biology*, 2011, 9.
- Steen, R. G. (1986). Evidence for heterotrophy by zooxanthellae in symbiosis with *Aiptasia pulchella*. *The Biological Bulletin*, 170, 267-278.
- Steen, R. G. & Muscatine, L. (1987). Low temperature evokes rapid exocytosis of symbiotic algae by a sea anemone. *The biological bulletin*, 172, 246-263.
- Takahashi, S., Nakamura, T., Sakamizu, M., Woesik, R. v. & Yamasaki, H. (2004). Repair machinery of symbiotic photosynthesis as the primary target of heat stress for reef-building corals. *Plant and Cell Physiology*, 45, 251-255.

- Thornhill, D. J., Daniel, M. W., 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, 50-56.
- Tolleter, D., Seneca, F. O., DeNofrio, J. C., Krediet, C. J., Palumbi, S. R., Pringle, J. R. & Grossman, A. R. (2013). Coral bleaching independent of photosynthetic activity. *Current Biology*, 23, 1782-1786.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Venn, A., Loram, J. & Douglas, A. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1069-1080.
- Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Roger, E., Foure, L., Duval, D., Mone, Y., Ferrier-Pages, C., Tambutte, E., Tambutte, S., Zoccola, D., Allemand, D. & Mitta, G. (2009). Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC Physiology*, 9, 14.
- 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, e46406.
- 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.
- Wang, J. & Douglas, A. E. (1998). Nitrogen recycling or nitrogen conservation in an alga-invertebrate symbiosis? *Journal of Experimental Biology*, 201, 2445-2453.
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 211, 3059-3066.
- Weis, V. M. & Levine, R. P. (1996). Differential protein profiles reflect the different lifestyles of symbiotic and aposymbiotic *Anthopleura elegantissima*, a sea anemone from temperate waters. *Journal of Experimental Biology*, 199, 883-892.
- Yellowlees, D., Rees, T. A. V. & Leggat, W. (2008). Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant, cell & environment*, 31, 679-694.