

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**INFLUENCIA DEL HISTORIAL TÉRMICO EN LA
RESPUESTA DE *Pocillopora verrucosa* AL ESTRÉS POR
TEMPERATURAS ELEVADAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

SAMANTHA GABRIELA MERCADO CERVANTES

Ensenada, Baja California, México, Enero de 2015

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

INFLUENCIA DEL HISTORIAL TÉRMICO EN LA RESPUESTA DE *Pocillopora*
verrucosa AL ESTRÉS POR TEMPERATURAS ELEVADAS

TESIS

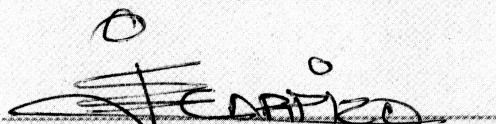
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

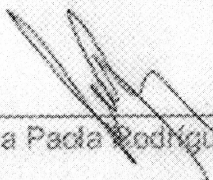
SAMANTHA GABRIELA MERCADO CERVANTES

Aprobada por:



Dr. Eugenio de Jesús Carpizo Huarte

Director de Tesis


Dra. Alma Paola Rodríguez Troncoso

Sinodal



Dr. Pedro Medina Rosas

Sinodal


Dr. Julio Alberto Villaescusa Celaya

Sinodal

DEDICATORIA

A Dios, que ha estado siempre junto a mí, que me ha dado las fuerzas para seguir
adelante y ha puesto todo en mi camino para que realice mis sueños.

Que me permitió terminar esta etapa rodeada por todas aquellas personas, que me
ayudaron a superarme y a crecer, pero sobre todo por este mágico mundo que pones en
mis pies para descubrirlo cada día.

Millones de gracias por reflejar en todo lo que tengo tu amor hacia mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eugenio Carpizo Ituarte, mi director de tesis, por la amistad, la confianza y el apoyo que me brindó desde el inicio, además por todos los consejos y el montón de paciencia.

Al Dr. Julio Villaescusa Celaya, por su tiempo, sus comentarios y aportaciones que enriquecieron el presente trabajo.

Al Dr. Pedro Medina Rosas, por su apoyo en la parte experimental de la investigación y por las facilidades para realizar mi estancia en el Centro Universitario de la Costa (CUC).

A la Dra. Paola Rodríguez Troncoso, por el apoyo incondicional durante la realización de este trabajo y por los consejos que fueron fundamentales para terminar con éxito la presente investigación.

Al Dr. Amílcar Cupul, por adoptarme como una estudiante más de su laboratorio, por su apoyo y por las facilidades brindadas durante mi estancia en Puerto Vallarta.

A mis compañeros de laboratorio, en especial a Alejandro por ser mi maestro en la parte molecular y a Karlitos por ser parte central en esta aventura desde un inicio.

A mis compañeros del posgrado, por su apoyo y por compartir tantos momentos de alegría, especialmente a Dore por ser mi confidente, amiga y maestra.

A mis profesores y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Marinas y del Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Particularmente a Eddy por ser mi amigo, mi paño de lágrimas, y mi guía de turista por Ensenada.

A mis compañeros del CUC Jeimy, Lucy, Torto, Diana, Luz, Rosa, Angelita y Alonso, por su tiempo, por siempre estar al pendiente de lo que necesitaré y hacerme sentir en familia.

A los investigadores del CUC, la M en C. Ma. Carmen, al Dr. Saúl, al Dr. Vega, a la Dra. Olimpia y al Biol. Abraham, por facilitarme el uso del equipo y material necesario para desarrollar el experimento.

A mis padres, por el amor y el apoyo que siempre me han brindado, por creer en mí y querer cumplir cada uno de mis sueños. Agradezco también a toda mi familia (hermanos, primos y tíos) por siempre interesarse en mi bienestar, en especial Maricruz y Yatsil, por siempre estar cerca de mí.

I. ÍNDICE GENERAL

	Página
I. Índice General	I
II. Índice de Figuras	III
III. Índice de Tablas	V
IV. Resumen	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1. Área de Recolecta	13
5.2 Recolecta de Muestras	14
5.3 Diseño Experimental	15
5.3.1. Instalación de los acuarios experimentales	16
5.3.2. Aclimatación de fragmentos de <i>P. verrucosa</i>	16
5.3.3. Periodo experimental de estrés térmico	17
5.4 Análisis de Muestras	18
5.4.1 Índice RNA/DNA	18
5.4.2 Lípidos totales	19
5.4.3 Densidad de simbiontes	19
5.4.4 Concentración de clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i>)	20
5.5 Influencia del Historial Térmico en la Respuesta de <i>P. verrucosa</i>	21
5.6 Análisis Estadístico	21
6. RESULTADOS	22
6.1 Índice RNA/DNA	24

6.2. Lípidos totales	27
6.3.Densidad de simbioses	30
6.4.Concentración de clorofila <i>a</i>	33
6.5. Influencia del historial térmico en la respuesta de <i>P. verrucosa</i>	38
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	51
9. LITERATURA CITADA	53
10. ANEXOS	61

II. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Historia de los eventos de Blanqueamiento a nivel global	5
Figura 2. Localización geográfica de Punta de Mita	13
Figura 3. Esquema del diseño experimental	15
Figura 4. Diagrama de unidades utilizadas y método de preservación para los distintos marcadores utilizados	18
Figura 5. Temperatura registrada para cada tratamiento durante el periodo de experimentación	22
Figura 6. Evidencias físicas de estrés en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> expuestos a 31.5°C	23
Figura 7. Valores del Índice RNA/DNA en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico	25
Figura 8. Valores del Índice RNA/DNA para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual, estandarizados respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C)	26
Figura 9. Concentración de lípidos totales en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico	29
Figura 10. Valores del contenido de lípidos totales para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual estandarizados respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C)	30
Figura 11. Densidad de simbiontes en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico	32

Figura 12. Valores de la densidad de simbiontes para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual estandarizados respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C)	33
Figura 13. Concentración de Chla en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico	35
Figura 14. Valores de la concentración de Chla para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual estandarizados respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C)	36
Figura 15. Correlación entre la concentración de Chla y la densidad de simbiontes en los fragmentos de <i>P. verrucosa</i>	37
Figura 16. Temperaturas registradas para Bahía de Banderas durante el periodo anual correspondiente al que estuvieron sujetos los fragmentos de <i>P. verrucosa</i> muestreados por Rodríguez–Troncoso et al. (2010a) y en el presente estudio	39

III. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Índice RNA/DNA de fragmentos de <i>P. verrucosa</i> expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías).	24
Tabla II. Lípidos totales en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías).	27
Tabla III. Comparación del contenido de lípidos totales en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> entre los distintos tratamientos (Prueba post hoc Duncan).	27
Tabla IV. Densidad de <i>Symbiodinium</i> en fragmentos de <i>P. verrucosa</i> expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías).	30
Tabla V. Concentración de Chla por célula de <i>Symbiodinium</i> en fragmentos <i>P. verrucosa</i> expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías).	34
Tabla VI. Tabla comparativa entre el presente estudio y un estudio equivalente reportado por Rodríguez–Troncoso et al. (2010a) en el Parque Nacional Islas Marietas (PNIM).	38

IV. RESUMEN

Uno de los cambios más importantes en el clima es el incremento gradual de la temperatura media de los océanos así como la frecuencia y magnitud de fenómenos ENSO. Ambos fenómenos han sido los responsables de los mayores eventos de blanqueamiento y mortalidad coralina a nivel global. No obstante, diversas especies de corales alrededor del mundo han mostrado una mayor tolerancia térmica ante periodos de estrés térmico contemporáneos. En la región de Punta de Mita, que fue una de las localidades más afectadas por el fenómeno ENSO 97–98 en el Pacífico mexicano, los corales muestran una mayor tolerancia a periodos de elevadas temperaturas similares e incluso mayores que las registradas en los años 1997–98.

Con el fin de evaluar la respuesta fisiológica de colonias del coral *Pocillopora verrucosa* residentes de Punta de Mita al estrés térmico en laboratorio, se sometieron fragmentos de *P. verrucosa* a diferentes temperaturas. Para lo anterior, se utilizaron dos temperaturas que se han documentado como adecuadas para el desarrollo de los corales (26°C, 29.5°C) y una que ha resultado ser estresante para esta especie dentro de Bahía de Banderas (31.5°C). Como indicadores de la respuesta al estrés térmico se utilizó el índice RNA/DNA, el contenido de lípidos totales, la densidad de simbiontes y la concentración de clorofila *a* (Chl*a*). En forma particular, la respuesta observada se comparó con la reportada en un estudio equivalente al presente trabajo, con la finalidad de obtener una aproximación de cómo influye el historial térmico en la respuesta térmica de *P. verrucosa* en esta región. Los resultados del presente estudio muestran que los organismos expuestos a 31.5°C incrementaron su índice RNA/DNA y concentración de lípidos totales, como

posible respuesta de mitigación y/o reparación de daños celulares. Asimismo se registró un incremento en su densidad de simbioses y una tendencia a disminuir en su concentración de Chl a , posiblemente como resultado de un mecanismo de fotoaclimatación de *Symbiodinium*. De igual manera, la diferencia entre la respuesta observada en el presente estudio respecto a la documentada anteriormente en un estudio equivalente con corales de la misma especie obtenidas de áreas aledañas a las del presente estudio, podría estar determinada por la discrepancia del historial de eventos de estrés ambiental y antropogénico.

Palabras clave: Cambio climático, *Pocillopora verrucosa*, *Symbiodinium*, aclimatación, temperatura.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, la Tierra ha presentado cambios naturales en el clima que varían anualmente. Sin embargo, en los últimos 100 años el planeta se ha calentado de manera acelerada, debido a los incrementos de gases de efecto invernadero en la atmósfera, principalmente dióxido de carbono (CO₂) antropogénico, lo cual está provocando alteraciones en el clima (IPCC, 2013). Se sabe, que desde el comienzo de la era industrial, el incremento en la concentración del CO₂ ha causado un aumento en la temperatura promedio del océano de 0.74°C, un aumento del nivel medio del mar aproximadamente de 2 mm por año a nivel global y una disminución en el pH del 0.1 (IPCC, 2013).

Una consecuencia del aumento del CO₂ en la atmósfera, es el incremento gradual de la temperatura media de los océanos, así como el incremento en la frecuencia y magnitud de fenómenos ENOS (El Niño–Oscilación del Sur) que han provocado cambios en la distribución, abundancia, fisiología reproducción y supervivencia de los organismos (Pörtner, 2002). Los arrecifes coralinos son particularmente vulnerables a estos cambios, los cuales se han asociado con distintas afectaciones, tales como: disminución de la capacidad y desincronización reproductiva, mayor vulnerabilidad a enfermedades, decrementos en su metabolismo, lo que provoca una síntesis reducida de proteínas al igual que deformaciones físicas y blanqueamiento (Andersson et al., 2011; Erez et al., 2011; Spalding y Brown, 2015).

En conjunto con el cambio climático, las actividades antropogénicas locales (sobrepesca, actividades turísticas y descargas de aguas contaminadas) amenazan a los

arrecifes coralinos a nivel global. Recientes estimaciones muestran que su efecto sinérgico ha causado la degradación del 75% de los arrecifes coralinos en el mundo (Hoegh-Guldberg, 2014; Spalding y Brown, 2015). Los daños que puedan causar los fenómenos naturales son reversibles con el tiempo, sin embargo, estas perturbaciones antropogénicas disminuyen la capacidad de resiliencia de los corales (Bruno y Selig, 2007), por lo que bajo los futuros escenarios del cambio climático aunado al incremento de las presiones antropogénicas, se pone en riesgo la supervivencia del sistema y de los servicios que brindan estos ecosistemas a los 275 millones de personas que viven asociados a ellos (Spalding y Brown, 2015).

Los corales mantienen una relación de simbiosis mutualista con una población de dinoflagelados del género *Symbiodinium* spp., que le provee ventajas nutricionales a su coral hospedero, al transferirle hasta el 95% de sus productos fotosintéticos (en forma de glicerol y aminoácidos); por su parte el coral, le brinda nutrientes inorgánicos esenciales para la fotosíntesis (amonio y fosfato), un ambiente con alta luminosidad y refugio (Muscattine, 1990). Esta simbiosis generalmente es estable, pero se ha observado que ciertos cambios en su ambiente, como por ejemplo el aumento de la temperatura, repercuten en el equilibrio de esta asociación simbiótica (Wooldridge, 2009; Spalding y Brown, 2015).

En condiciones de estrés térmico por calor, se ha propuesto que esta simbiosis se rompe debido a la inhibición de la fotosíntesis y respiración, y el daño al Fotosistema II de *Symbiodinium*, con el subsecuente incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) lo que provoca estrés oxidativo al holobionte y culmina en el blanqueamiento del coral (Mayfield y Gates, 2007; Richier et al., 2008).

El blanqueamiento coralino, es una respuesta mostrada por los corales al estrés, que involucra la degradación o pérdida de pigmentos fotosintéticos en el alga simbiote y/o la expulsión o decremento del número de células de este dinoflagelado en el tejido del coral hospedero (Wooldridge, 2009). A pesar de que son varias las causas de que este fenómeno ocurra (cambios de salinidad, sedimentación, turbidez, alta radiación solar, baja temperatura), las altas temperaturas han sido las responsables de los mayores eventos de blanqueamiento y mortalidad coralina a nivel global (Dandan et al., 2015).

Actualmente, se ha demostrado que existe una correlación positiva entre los periodos históricos de anomalías térmicas con la respuesta observada por los corales en periodos con similares condiciones recientes. Varios estudios han mostrado que colonias sobrevivientes de eventos ENSO, muestran una mayor tolerancia térmica en eventos similares posteriores. Gran parte de estos esfuerzos se ha dedicado a entender los mecanismos de aclimatación y/o adaptación, y respuestas fisiológicas tanto del coral hospedero como de su dinoflagelado simbiote, lo que ha permitido mostrar una mayor resistencia ante condiciones consecutivas de estrés similares a las que en el pasado estuvieron expuestos los organismos (Carilli et al., 2012; Coles y Riegl, 2013; Grottoli et al., 2014; Dandan et al., 2015).

Por otra parte, el uso de bioindicadores metabólicos ha sido de gran utilidad para entender la respuesta al estrés fisiológico en corales. Uno de los índices metabólicos utilizados en la actualidad es la relación RNA/DNA; este índice se basa en que, la cantidad de DNA por célula es constante en los organismos de una misma especie y esta cantidad no varía en condiciones de estrés (ej. cambios en las condiciones ambientales). Por otro lado, la mayor concentración de RNA en la célula (~90%) es ribosómico y su

concentración está en función del grado de síntesis de proteínas (Hill et al., 2006). Por lo tanto el índice RNA/DNA se puede considerar como un indicador de la actividad metabólica de la célula (Olivares–Bañuelos et al., 2014).

La concentración de lípidos totales ha sido empleada como un indicador preciso de la capacidad específica de cada especie para resistir a periodos de estrés. Lo anterior se debe a que parte de la energía translocada de *Symbiodinium* a su hospedero, es almacenada en forma de lípidos y utilizada en condiciones de estrés (Grottoli et al., 2014). Otros marcadores fisiológicos que han sido ampliamente utilizados son la densidad de simbiontes y su concentración de clorofila *a* (Chl*a*) (pigmento fotosintético más abundante en *Symbiodinium*) ya que han resultado ser buenos indicadores del estado y de procesos de aclimatación del holobionte (Mayfield et al., 2013a).

El uso de estos marcadores no solo permite comprender la respuesta de los corales al estrés, sino que, al ser ampliamente utilizados, permite comparar con estudios anteriores de la región y tener una aproximación de cómo influye su historia térmica en la capacidad de resiliencia de los corales.

En este sentido, el presente estudio tiene dos propósitos, por un lado, conocer la respuesta fisiológica de las colonias de *P. verrucosa* residentes en Punta de Mita, y por el otro lado, deducir la influencia de su historia térmica, comparando la respuesta observada con la documentada en colonias de la misma especie del Parque Nacional Islas Marietas (PNIM) 7 años atrás por Rodríguez–Troncoso et al. (2010a).

2. ANTECEDENTES

El primer evento masivo de blanqueamiento se registró en comunidades coralinas del Mar Caribe, del Pacífico Occidental y Ecuatorial Oriental (Coffroth et al., 1989) durante los años 1982–83 como consecuencia del fenómeno ENSO que se desarrolló en este periodo, provocando mortalidades de hasta el 99% en las costas de Panamá (Glynn y D’Croz, 1990). Posterior a este evento se han registrado tres eventos de blanqueamiento a nivel global (ENSOs 1997-98; 2010; 2014-15) que han ido aumentando en frecuencia e intensidad (Fig. 1) (Thompson y Woesik, 2009).

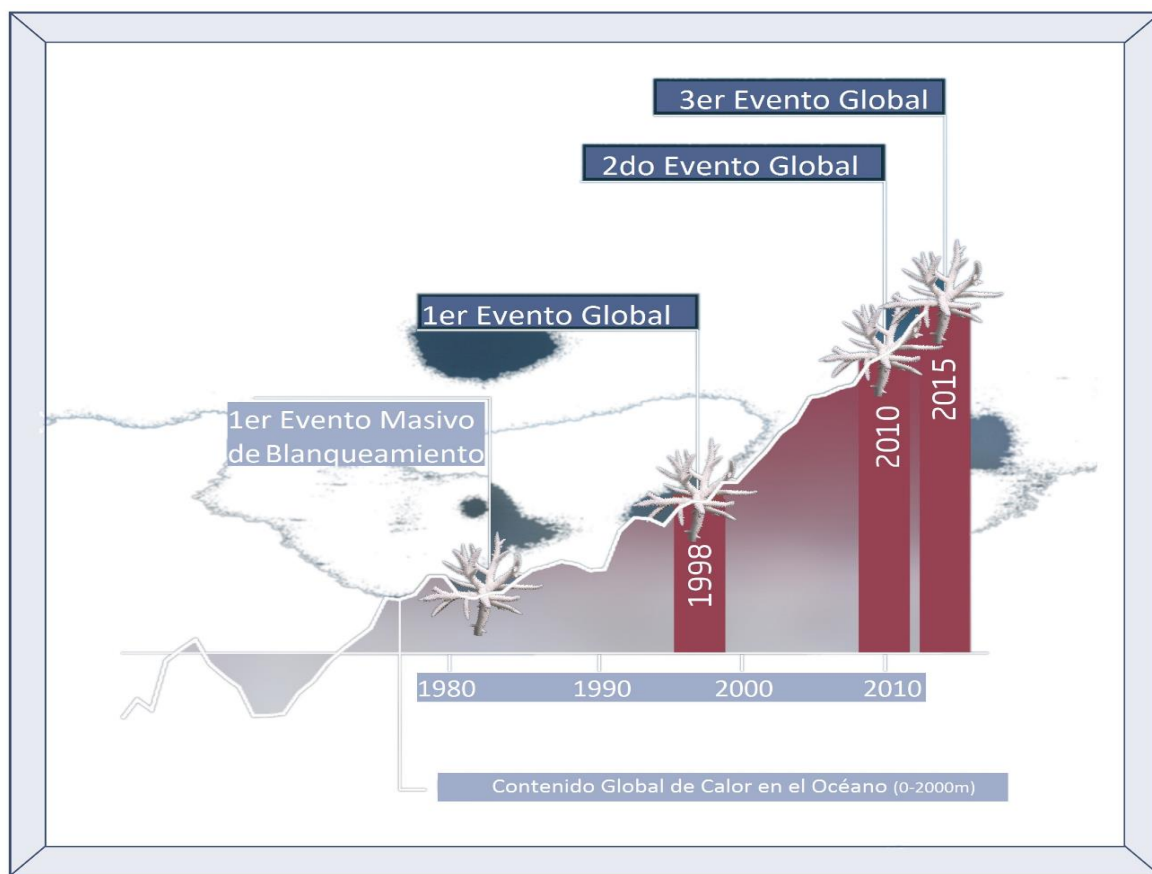


Figura 1. Historia de los eventos de Blanqueamiento a nivel global. Modificado de <http://www.globalcoralbleaching.org> (consulta: 15 de noviembre de 2015).

Diversos autores han observado que en corales que fueron afectados en el pasado por algún fenómeno ENSO y se encuentran en regiones con alta variabilidad térmica, muestran una mayor tolerancia durante periodos anómalos de temperatura posteriores (Middlebrook et al., 2008; Coles y Riegl, 2013; Grottoli et al., 2014; Dandan et al., 2015). Por ejemplo, se ha observado que especies del género *Porites* presentes en localidades sujetas a eventos de calentamiento frecuentes y con una amplia variabilidad de la temperatura, son más termotolerantes que aquellas que se encuentran en zonas donde los eventos de calentamiento son ocasionales y su temperatura es más constante (Carilli et al., 2012). Análogamente, Glynn et al. (2001) reportan que la mortalidad coralina observada en el Pacífico Ecuatorial Oriental durante los años 1982–83 fue mayor (52–97%) que en los años 1997–98, a pesar de que la intensidad y duración del fenómeno fue similar en las dos ocasiones.

Se ha demostrado que esta aclimatación térmica (“memoria”) involucra diferentes procesos: i) cambios en metabolismo y fisiología del holobionte; ii) sustitución del dinoflagelado simbiote nativo por un clado más termotolerante; iii) mayores reservas energéticas; iv) alimentación heterótrofa y v) dominancia de individuos más resistentes a altas temperaturas (Baird et al., 2008; Thompson y Woesik, 2009; Brown y Cossins, 2011). Así mismo, otros estudios documentan que esta aclimatación puede ocurrir en un periodo de tiempo menor a dos años, como se ha sido reportado para colonias del coral *Acropora hyacinthus* residentes del Parque Nacional de Samoa Americana (Palumbi et al., 2014) y que existe la posibilidad de transferir esta tolerancia térmica a generaciones posteriores (Brown et al., 2015; Spalding y Brown, 2015).

En zonas con fluctuaciones constantes de la temperatura, *Montastraea annularis* mantiene una mayor tasa metabólica que en zonas con temperatura más uniforme, lo que le confiere una mayor resistencia al blanqueamiento (Castillo y Helmuth, 2005). Del mismo modo se ha observado que algunas especies como *Porites divaricata* después de un episodio de blanqueamiento incrementan sus reservas energéticas al igual que la densidad y dominancia de un clado de *Symbiodinium* (clado A4) más tolerante al calor, lo que les permite minimizar el estrés sufrido durante periodos de calentamiento (Grottoli et al., 2014). A nivel fisiológico, se encontró que posterior a un evento de elevadas temperaturas e intensidad lumínica, el coral *Goniastrea aspera* presenta altos niveles de proteínas de choque térmico y antioxidantes, así como, una mayor eficiencia del ciclo de xantofilas en su dinoflagelado simbiote (Brown et al., 2002).

Uno de los géneros más susceptible al blanqueamiento es *Pocillopora*, sin embargo, las especies de este género son capaces de recuperarse y aclimatarse rápidamente a cambios en su ambiente, por lo que se considera que este género es altamente resiliente (Baird et al., 2008). Durante el fenómeno El Niño del 2010, comunidades coralinas de *Pocillopora spp.*, presentaron una mortalidad aproximada de 12% en Singapur (área fuertemente afectada por El Niño 98) que fue significativamente menor a la observada al sur de Malasia donde se registró una mortalidad del 87% (área no afectada por eventos ENSO previamente) (Guest et al., 2012).

Colonias de *Pocillopora damicornis* en Panamá, además de presentar un menor grado de afectación por El Niño 98 comparado en el ocurrido en los años 1982–83, mostraron una mayor presencia de *Symbiodinium* clado D en comparación con años anteriores (Glynn et al., 2001). Congéneres de esta especie en Taiwán muestran ser

capaces de aclimatarse a temperaturas de 30°C (1°C por encima del promedio de las temperaturas diarias en verano); tanto el coral como su simbiote mostraron una aclimatación a nivel molecular aumentando la expresión de HSP (Mayfield et al., 2013a). Además en esta misma especie, se ha registrado que colonias sobrevivientes de eventos ENSO presentan una mayor densidad de *Symbiodinium* en su tejido (Cunning y Baker, 2013) y ha ido aumentando su cobertura en arrecifes de la Polinesia Francesa (Pratchett et al., 2013).

Las comunidades coralinas del Pacífico mexicano (PM) se vieron fuertemente afectadas por el ENSO 97–98, particularmente la zona norte de Bahía de Banderas, donde los efectos de este fenómeno causaron el 96% de mortalidad coralina siendo el género *Pocillopora* el mayor afectado (Carriquiry et al., 2001; Reyes–Bonilla et al., 2002). Un estudio realizado por Carriquiry y Reyes–Bonilla (1997) anterior a este evento, documenta un estado saludable y sin evidencia de blanqueamiento para las comunidades residentes al norte de la Bahía. De manera contrastante, los arrecifes menos afectados fueron los de Baja California Sur (Reyes–Bonilla et al., 2002), sin embargo, los corales de esta zona se vieron afectados por El Niño 87–88 que provocó una mortalidad del 15% de *Pocillopora* spp (Reyes–Bonilla, 1993). Otros eventos de blanqueamiento observados dentro de Bahía de Banderas en el PNIM se dieron en los años 2006, 2008, 2010 y 2011 (Rodríguez–Troncoso y Cupul–Magaña, 2013a).

A pesar de que las especies del género *Pocillopora* resultaron ser las más susceptibles a blanquearse y presentaron altas tasas de mortalidad, hoy en día son las principales especies constructoras de los arrecifes del PM (Reyes–Bonilla, 2010). Se ha observado que estas especies presentan una gran flexibilidad para aclimatarse a cambios

en su ambiente, por ejemplo, *Pocillopora capitata* mantiene altos niveles de antioxidantes durante los meses de verano (Liñán–Cabello et al., 2010) y responde de manera inmediata a incrementos bruscos de temperatura, aumentando la síntesis de antioxidantes, mientras que su dinoflagelado simbiote responde con un aumento de pigmentos fotoprotectores (Flores–Ramírez y Liñán–Cabello, 2007). También se observó un incremento en su metabolismo y en la concentración de proteínas al estar expuesta en condiciones de bajo pH (Delgadillo–Nuño et al., 2014).

En Punta de Mita al igual que en el resto del PM, *P. verrucosa* es la especie dominante (Reyes–Bonilla et al., 2008) y actualmente ha incrementado su cobertura en esta zona (observación personal) al igual que en el PNIM (Rodríguez–Troncoso y Cupul–Magaña, 2013) en comparación con *P. damicornis*, que era la especie más abundante antes del ENSO 97–98 (Reyes–Bonilla y Carriquiry, 1997). Lo anterior ha llevado a predecir, que en escenarios del cambio climático global, *P. verrucosa* extenderá su límite de distribución, al ser una especie altamente termotolerante y resiliente (Reyes–Bonilla et al., 2008).

Los mecanismos de aclimatación o adaptación que le confieren a *P. verrucosa* la gran tolerancia térmica están pobremente estudiados. Estudios recientes en colonias de esta especie presentes en el Mar Rojo muestran que, aquellas expuestas de manera natural a condiciones de temperaturas elevadas (33°C) y alta concentración de nutrientes, mantienen altas concentraciones de lípidos y proteínas, un metabolismo más bajo y una mayor producción de mucus que aquellas expuestas a temperaturas entre 21–27°C y con baja concentración de nutrientes (Sawall et al., 2015). Además, el simbiote predominante en esta región *Symbiodinium microadriaticum* (clado A1), sostiene altos niveles de Chla

mientras aumenta la producción de pigmentos fotoprotectores durante los meses más cálidos (Sawall et al., 2014)

En Bahía de Banderas, se ha evidenciado que *P. verrucosa* mantiene una relación simbiótica con *Symbiodinium* clado D (LaJeunesse et al., 2010; Rodríguez–Troncoso et al., 2014) que es un clado resistente al estrés y oportunista. Este clado, se han encontrado en corales que habitan en ambientes con alta variabilidad térmica y turbidez, y/o en individuos en recuperación de blanqueamiento (LaJeunesse, 2007). Además en periodos de altas temperaturas le confiere a su hospedero una mayor tolerancia a largo plazo (Brown et al., 2015).

Por su parte, Rodríguez–Troncoso et al. (2010a, b; 2013b; 2014), desarrollaron una serie de estudios experimentales con el objetivo de conocer la respuesta de *P. verrucosa* ante cambios en la temperatura. Estos autores documentan que en circunstancias de estrés térmico por calor (31°C), *P. verrucosa* incrementa su síntesis de lípidos y del antioxidante *CuZn–superóxido dismutasa* (CUZnSOD) como respuesta aguda al estrés (Rodríguez–Troncoso et al., 2013b), mientras que el estrés crónico provoca la expulsión de sus simbiontes y la disminución en su contenido de lípidos totales (Rodríguez–Troncoso et al., 2010a). Por otro lado, ante el estrés por frío (18.5°C), esta especie responde con un decremento en su contenido de lípidos totales y de clorofila *a*, mientras que la densidad de *Symbiodinium* incrementa (Rodríguez–Troncoso et al., 2014).

Particularmente en Punta de Mita son escasos los estudios que se tienen sobre la ecología y biología de la comunidad coralina posterior a El Niño 97–98, el presente estudio es el primero en hacer un esfuerzo experimental para conocer la respuesta fisiológica de las colonias sobrevivientes de *P. verrucosa* ante altas temperaturas,

simulando condiciones a las que se encuentran sujetas durante eventos ENSO. Además, se pretende entender la influencia que puede haber tenido su historia térmica en su respuesta tomando como punto de referencia o comparación el estudio realizado por Rodríguez – Troncoso et al. (2010a).

3. HIPÓTESIS

- Los fragmentos de *P. verrucosa* expuestos a estrés térmico (31.5°C), responderán fisiológicamente con una disminución en su índice RNA/DNA, en su contenido de lípidos totales, en su densidad de simbiontes y estos en su concentración de clorofila *a*, como resultado de su respuesta al estrés y esta respuesta será diferente que los fragmentos expuestos a 26°C y 29.5°C.
- La discrepancia entre el historial térmico de las colonias de Punta Mita respecto a las del PNIM, se evidenciará en una respuesta fisiológica diferente, mostrando una mayor tolerancia al estrés térmico los fragmentos de Punta de Mita (el presente trabajo) y muy posiblemente con una mayor resistencia al blanqueamiento.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta fisiológica de *Pocillopora verrucosa* ante el aumento gradual de la temperatura en condiciones de laboratorio y estimar la influencia de su historial térmico en su respuesta.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar cambios: i) en el índice RNA/DNA; ii) en el contenido de lípidos totales; iii) en la densidad de *Symbiodinium*; y iv) en la concentración de clorofila *a*, previo al blanqueamiento.
- Comparar la respuesta fisiológica de *P. verrucosa* obtenida en el presente estudio, con los resultados para la misma especie en el Parque Nacional Islas Marietas dentro de Bahía de Banderas 7 años antes, en donde las condiciones térmicas fueron diferentes.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. Área de Recolecta

Punta de Mita es una provincia del estado de Nayarit y representa el límite noroeste de la Bahía de Banderas (Fig. 2). Esta zona se caracteriza por presentar una plataforma que se extiende aproximadamente 15 km mar adentro (Salinas y Bourillon, 1998), un fondo marino formado principalmente por arenas (Carriquiry et al., 2001) y una profundidad menor a 25 m (Platas y Filonov, 2007).

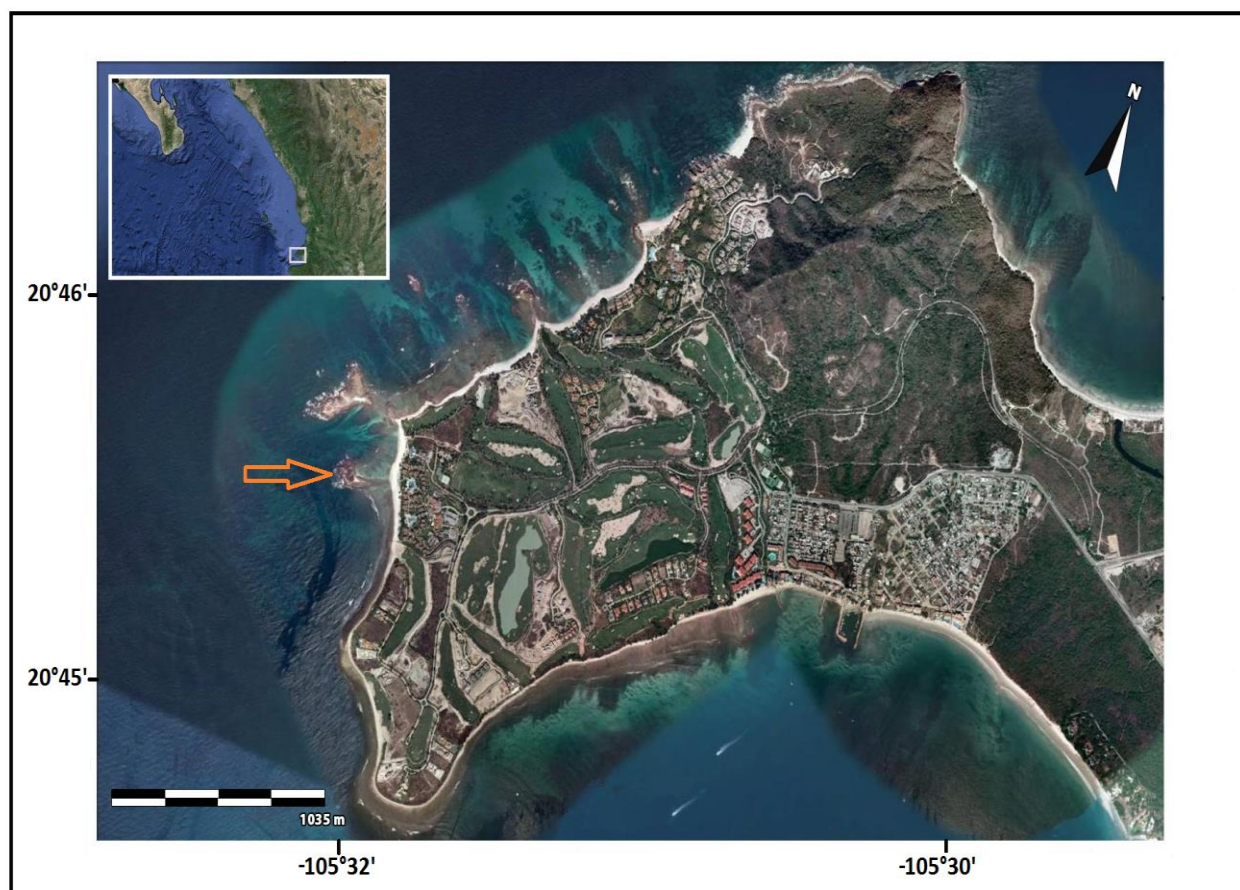


Figura 2. Localización geográfica de Punta de Mita. La flecha indica la zona de recolecta.

Bahía de Banderas es el punto de convergencia de tres importantes sistemas de corrientes, la Corriente de California (transporta masas de agua fría y de baja salinidad, con dirección al sur), la Corriente de Costa Rica (trae consigo masas de agua caliente y salinidad intermedia, fluye hacia el norte) y la Masa de agua del Golfo de California (superficial, con aguas cálidas y de alta salinidad, que fluye hacia el sur) (Wyrki, 1976), lo anterior da lugar a cambios estacionales en el patrón de circulación y de temperatura en esta zona (De la Lanza, 1991). Particularmente, la circulación en Punta de Mita es más restringida que en el resto de la Bahía, debido a que en la zona comprendida entre las Islas Marietas y Punta de Mita, se encuentra un banco de arena sumergido que obstaculiza el intercambio de las masas de agua entre esta región y el mar abierto (Platas y Filonov, 2007).

A pesar de que no se cuentan con datos históricos que permitan establecer el régimen térmico de Punta de Mita, se han registrado aproximaciones de la variabilidad de la temperatura en un periodo de tres años (junio 05–marzo 08). En este periodo se reporta una temperatura promedio de 26.4°C y una variabilidad temporal que va de 20.8°C (marzo) a 30.6°C (septiembre) (Nava–Bravo, 2008).

5.2. Recolecta de Muestras

La recolecta de muestras se realizó en el mes de marzo del 2015. Por medio de buceo SCUBA, se colectaron 126 fragmentos de *P. verrucosa* aproximadamente de 5 cm a una profundidad promedio de 3 m en un área aproximada de 50 m². Posterior a su recolecta, los fragmentos fueron transportados en una hielera con agua de mar al

Laboratorio de Ecología Marina (LEM) del Centro Universitario de la Costa (CUC) de la Universidad de Guadalajara (UdeG). Una vez en el laboratorio, los fragmentos se colocaron de manera al azar en los respectivos acuarios como se menciona a continuación.

5.3. Diseño Experimental

El diseño experimental, consistió en tres tratamientos y cada uno con 3 réplicas. El primer tratamiento denominado como control (26°C), el cual permaneció a la misma temperatura registrada *in situ* al momento de la recolecta de los fragmentos; en el segundo tratamiento (29.5°C), la temperatura se aumentó a 29.5°C y finalmente, el tercer tratamiento (31.5°C) se mantuvo a 31.5°C (Fig. 3a), debido a que estudios previos en la región de estudio documentan que a 31°C colonias de *P. verrucosa* son susceptibles al blanqueamiento (Rodríguez– Troncoso et al. 2010a).

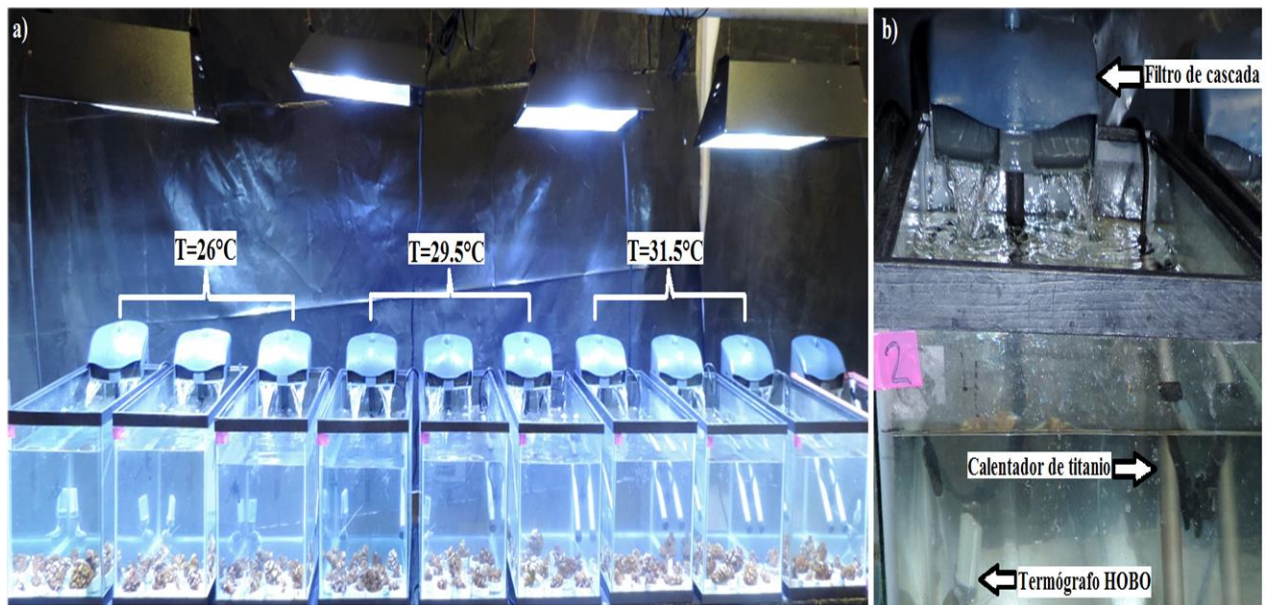


Figura 3. Esquema del diseño experimental. a) distribución de los tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C) y b) herramientas utilizadas para el mantenimiento de los acuarios (filtro de cascada, calentador de titanio y termógrafo HOBOTermometer) durante el periodo experimental.

5.3.1. Instalación de los acuarios experimentales

Previo a la recolecta de muestras, se instalaron 9 acuarios (3 réplicas por tratamiento) con capacidad de 40 litros. Cada acuario se llenó con agua de mar filtrada a 20 μm y con una salinidad inicial de 35 ppm. Cada uno contó con filtro de castada, un calentador de titanio, un termógrafo (HOBO) programado para tomar la temperatura cada 10min y luz artificial con focos Hammilton ($\lambda = 420\text{--}460$) (Fig.3b). Los acuarios se mantuvieron en las condiciones previamente descritas por un periodo de 6 días a una temperatura de $26 \pm 0.5^\circ\text{C}$, de acuerdo a la temperatura registrada *in situ* en el PNIM una semana antes de la recolecta.

5.3.2. Aclimatación de fragmentos de *P. verrucosa*

La temperatura registrada *in situ* al momento de la recolecta coincidió con la que se mantuvo en los acuarios ($26 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Los organismos se aclimataron a esta temperatura por un periodo de 15 días y a un ciclo de luz: oscuridad de 10:14 horas, este se mantuvo a lo largo del experimento. Se colocaron al azar 14 fragmentos por acuario (total 126 fragmentos) y a partir de este momento hasta el final del experimento, se realizaron evaluaciones cada hora para evaluar el estado físico de los fragmentos y poder detectar cualquier signo de estrés visible (ej. cambios en el color, pólipos contraídos, desprendimiento de tejido). Además cada hora se tomaron mediciones de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH de los acuarios. Cabe resaltar, que en el caso del pH no fue posible obtener datos confiables por lo que los valores obtenidos no se reportan en los resultados.

5.3.3. Periodo experimental de estrés térmico

Posterior al periodo de aclimatación de los fragmentos, se dio inicio al experimento. El tratamiento control permaneció constante a $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, mientras que en los tratamientos 2 y 3 la temperatura se incrementó de manera gradual a lo largo de 10 horas hasta alcanzar un máximo de $29.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ en el primer día de experimentación. Esta temperatura se mantuvo constante en el tratamiento 2. Siguiendo el mismo procedimiento, en el segundo día se aumentó la temperatura del tratamiento 3 hasta 31.5°C la cual se mantuvo hasta el final del experimento. A lo largo del presente manuscrito, se hace referencia a cada tratamiento de acuerdo a su temperatura (T 26°C , T 29.5°C y T 31.5°C).

Se realizaron 14 evaluaciones para dar seguimiento a la respuesta fisiológica que presentaron los fragmentos de *P. verrucosa*. Los tiempos de dichas evaluaciones fueron: 0, 3, 6, 11, 24, 27, 30, 35, 48, 60, 84, 120, 168 y 226 horas. El tiempo 0 corresponde al inicio del periodo experimental, antes de iniciar el incremento de la temperatura en los tratamientos 29.5°C y 31.5°C . En cada evaluación se retiró un fragmento de cada acuario, se dividió en porciones de $\sim 1\text{ cm}^2$ y se preservó según los requerimientos de preservación para el marcador fisiológico correspondiente como se muestra en la figura 4. Las muestras preservadas para la concentración de Chla se analizaron en las instalaciones del CUC, mientras que, las muestras preservadas para el índice RNA/DNA, lípidos totales y densidad de simbioses se transportaron al Laboratorio de Ecología y Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) para su posterior análisis.

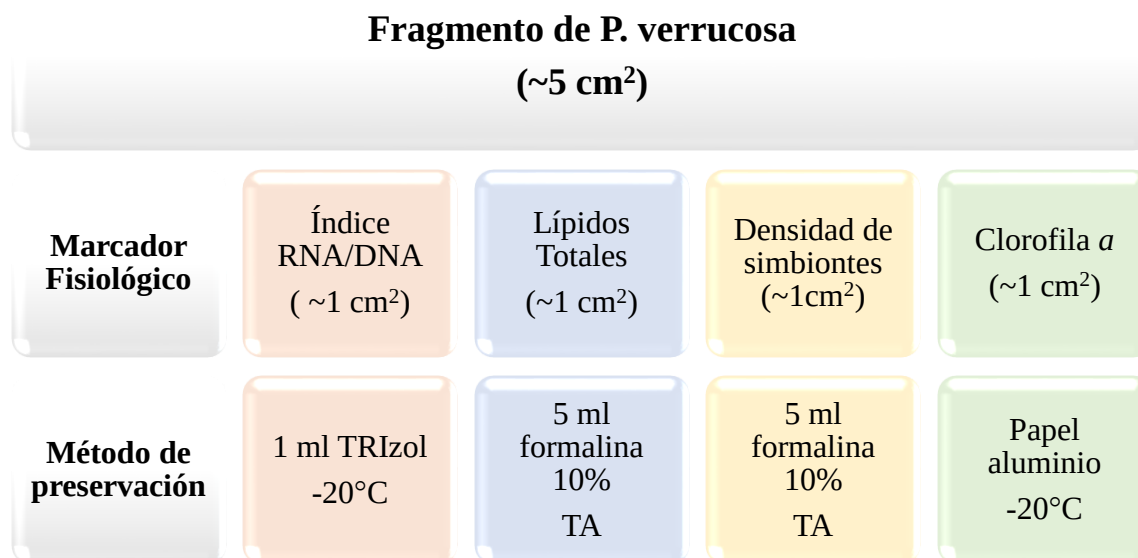


Figura 4. Diagrama de unidades utilizadas y método de preservación para los distintos marcadores utilizados. El fragmento se subdividió en porciones de 1 cm² para cada marcador fisiológico utilizado (índice RNA/DNA, lípidos totales, densidad de simbiontes y concentración de clorofila *a*) y se preservó en TRIzol (índice RNA/DNA), formalina al 10% con agua de mar (lípidos totales y densidad de simbiontes) o papel aluminio (clorofila *a*) a una temperatura de -20°C o temperatura ambiente (TA).

5.4. Análisis de muestras

5.4.1. Índice RNA/DNA

Para extraer los ácidos nucleicos de las muestras preservadas y homogenizadas en TRIzol, se utilizó el protocolo recomendado por el fabricante (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) con modificaciones realizadas por Delgadillo–Nuño (2014) (Anexo I). La calidad y concentración final de los ácidos nucleicos se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop. El índice RNA/DNA se calculó mediante la siguiente formula:

$$\text{RNA/DNA} = \frac{[(\text{RNA ng}/\mu\text{l})(\text{vol})]}{[(\text{DNA ng}/\mu\text{l})(\text{vol})]}$$

Donde:

vol= Volumen final de resuspensión.

5.4.2. Lípidos totales

Primeramente, se descalcificó el tejido de los fragmentos de *P. verrucosa* utilizando ácido acético al 10%, se enjuagaron con agua destilada y se dividió en tres porciones de 1 cm² cada una (una porción fue utilizada para determinar la densidad de *Symbiodinium*). Cada porción de tejido se colocó en un tubo de 2 ml previamente pesado y se incubó en estufa a una temperatura constante de 60°C por 18 horas. Posterior a este tiempo, se pesó para conocer el peso seco de la muestra y se prosiguió con la extracción de lípidos totales siguiendo el protocolo propuesto por Folch (1957) modificado por Rodríguez-Troncoso (2010a). En el presente estudio se realizaron las siguientes modificaciones: i) el tejido se macero en solución cloroformo: metanol (2:1) y se dejó reposar por 5 horas; ii) cuando se terminó de filtrar el sobrenadante, se agregaron 200 µl de solución cloroformo: metanol al papel filtro para recuperar los lípidos que pudiesen haber quedado en él; y iii) la muestra se evaporó en un concentrador centrifugo (CentriVap) a 45°C por 60 min. Una vez que, se obtuvieron los lípidos se secaron en la estufa a 60°C por 12 horas, posteriormente se realizó el pesado final (Anexo II). El análisis de cada muestra se hizo por duplicado. Los resultados corresponden a la media $\pm$ error estándar (EE) y se expresan en gramos de lípidos totales por gramos de peso seco (g·gps⁻¹ $\pm$ EE).

5.4.3. Densidad de simbioses

Una porción de tejido (1 cm²) previamente descalcificado se homogeneizó en 2 ml de agua de mar filtrada hasta 1µm e irradiada con UV. Se tomó una alícuota del homogeneizado y se colocó en un hematocitómetro para llevar a cabo el conteo de células

de *Symbiodinium* con la ayuda de un microscopio. Se efectuaron 8 conteos por muestra. Los resultados se expresan como número de células de *Symbiodinium* por centímetro cuadrado ($\text{cél} \cdot \text{cm}^{-2} \pm \text{EE}$), lo cual se calculó de la siguiente manera (Schoen 1988).

$$\text{Cél} \cdot \text{ml}^{-1} = (\bar{X})(0.0001)$$

$$\text{Cél} \cdot \text{cm}^2 = \text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}(V_T)$$

Donde:

$\bar{X}$ = media de la muestra (n=8)

0.0001 = volumen del hematocitómetro (ml)

V_T = volumen total del homogenizado

5.4.4. Concentración de clorofila *a*

Para la extracción de *chl a* se utilizó el método empleado por Rodríguez – Troncoso et al. (2014). El fragmento de coral congelado ($\sim 1 \text{ cm}^2$) se colocó en un tubo de 15 ml cubierto con papel aluminio, se añadieron 5 ml de metanol y se incubó por 24 h a -20°C . Posteriormente, se retiró el fragmento y el extracto fue centrifugado a 1,500 g por 5 min a 4°C . Se transfirió el sobrenadante a viales color ámbar los cuales fueron almacenados a -20 hasta su posterior análisis. Utilizando un espectrofotómetro, se midieron las absorbancias del sobrenadante a 750 nm, 664 nm y 630 nm y la concentración de *chl a* se calculó utilizando la ecuación propuesta por Parsons et al. (1984):

$$\text{Chla} = 11.85 * (D_{664} - D_{750}) - 0.08 * (D_{630} - D_{750})$$

Finalmente, la concentración de *chl a*, se estandarizó en función de la densidad de simbioses que se obtuvo para cada fragmento ($\text{pg chl a} \cdot \text{cél}^{-1}$).

5.5. Influencia del Historial Térmico en la Respuesta de *P. verrucosa*

Los resultados obtenidos se compararon con los reportados por Rodríguez–Troncoso et al. (2010a), debido a que estos autores realizaron un estudio equivalente al nuestro con colonias de *P. verrucosa* del PNIM. Además, se analizó la temperatura superficial del mar (TSM) de Bahía de Banderas de los periodos junio 2007- 2008 y marzo 2014- 2015 con la finalidad de tener una aproximación de las condiciones térmicas a las cuales estuvieron sujetos los fragmentos de coral antes de ser colectados en los dos distintos estudios. Los datos de la TSM se obtuvieron utilizando los satélites Advanced Very High Resolution Radiometer (AVHRR) y Modis on Aqua a una resolución nominal de 4 km por pixel (<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov>). Los datos se muestran como el promedio mensual.

5.6. Análisis Estadístico

Inicialmente, se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza de los datos, se procedió a realizar de manera individual para cada marcador fisiológico (índice RNA/DNA, contenido de lípidos totales, densidad de simbiontes y concentración de Chl a) un análisis de varianza (ANOVA) con la finalidad de determinar diferencias entre los tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C), el tiempo de exposición al estrés térmico (evaluaciones) y su interacción. Paralelamente, se buscó si existía correlación entre los marcadores fisiológicos mediante el Coeficiente de Correlación de Spearman. Las pruebas estadísticas y las gráficas se realizaron mediante el programa Sigma Plot V. 11.0.

6. RESULTADOS

Durante el periodo de aclimatación, los fragmentos de *P. verrucosa* permanecieron a una temperatura constante de $26 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y en este tiempo no mostraron signos de estrés visible. Al dar inicio el experimento, la temperatura se mantuvo constante a 26°C en el tratamiento control, mientras que en el tratamiento 1 (29.5°C) y 2 (31.5°C) permaneció a $29 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y $31.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ respectivamente (Fig. 5).

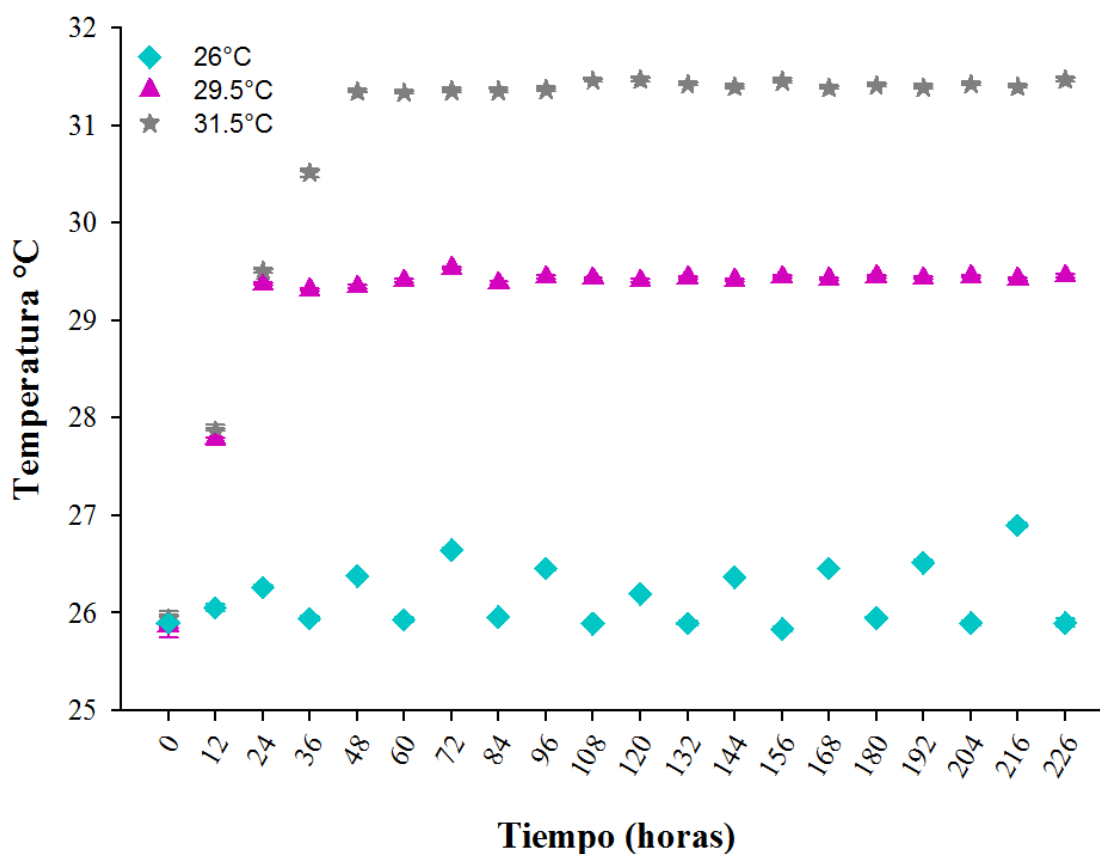


Figura 5. Temperatura (media $\pm$ error estándar) registrada para cada tratamiento (26°C , 29.5°C y 31.5°C) durante el periodo de experimentación (tiempo). Se expresa en intervalos de 12 horas.

Por su parte la salinidad mantuvo un valor típico de 35 ± 0.5 ppm y el oxígeno disuelto fluctuó en un rango de $5.18 - 6.95 \text{ mg/l}^{-1}$ en los distintos tratamientos.

Al final del experimento se observaron evidencias físicas de estrés como desprendimiento de tejido, pólipos contraídos y pérdida de coloración en los fragmentos expuestos a 31.5°C (Fig. 6).

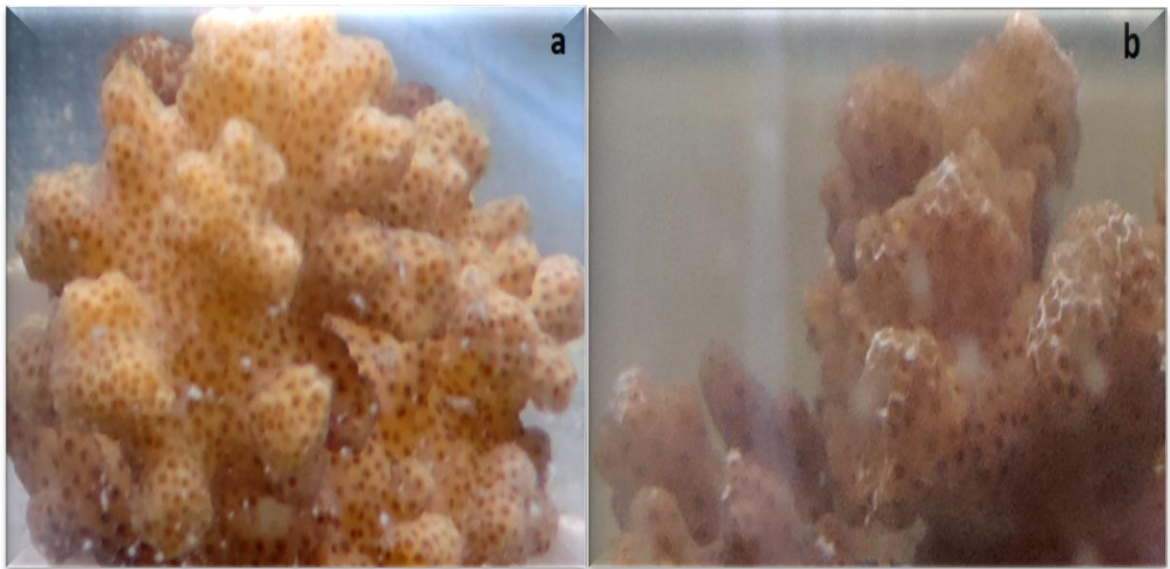


Figura 6. Evidencias físicas de estrés en fragmentos de *P. verrucosa* expuestos a 31.5°C . a) pólipos contraídos y b) pérdida de coloración.

6.1. Índice RNA/DNA

Los valores del índice RNA/DNA fueron similares entre tratamientos y variaron significativamente durante el periodo de duración del experimento (Tabla I).

Tabla I. Índice RNA/DNA de fragmentos de *P. verrucosa* expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías). Variables comparadas: tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C) y tiempo de evaluación (0, 3, 6, 11, 24, 27, 30, 35, 48, 60, 84, 120, 168 y 226). GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, $P < 0.050$. Texto subrayado= diferencias significativas.

Fuente de variación	GL	SC	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperatura	2	0.428	0.296	0.745
Tiempo	13	24.066	2.557	<u>0.005</u>
Temperatura x Tiempo	26	10.094	0.536	0.962

El tratamiento 31.5°C presentó una media de 0.95 ± 0.99 , así como un incremento del 91% (2.23 ± 1.19) respecto al valor inicial (1.16 ± 0.40) del experimento (Fig. 7c). La media observada para los tratamientos 26°C y 29.5°C fue menor en comparación con el tratamiento de 31.5°C; los valores observados fueron 0.82 ± 0.139 y 0.80 ± 0.11 respectivamente (Fig. 7a, b).

Debido a que los valores del índice RNA/DNA no mostraron una tendencia clara en ninguno de los tratamientos (Fig. 7), se estandarizó el promedio de los valores del índice RNA/DNA obtenidos en cada evaluación en los tratamientos 29.5°C y 31.5°C respecto a la media del tratamiento control (26°C) con la finalidad de obtener un patrón más claro del comportamiento del índice RNA/DAN en los tratamientos en que se subió la temperatura.

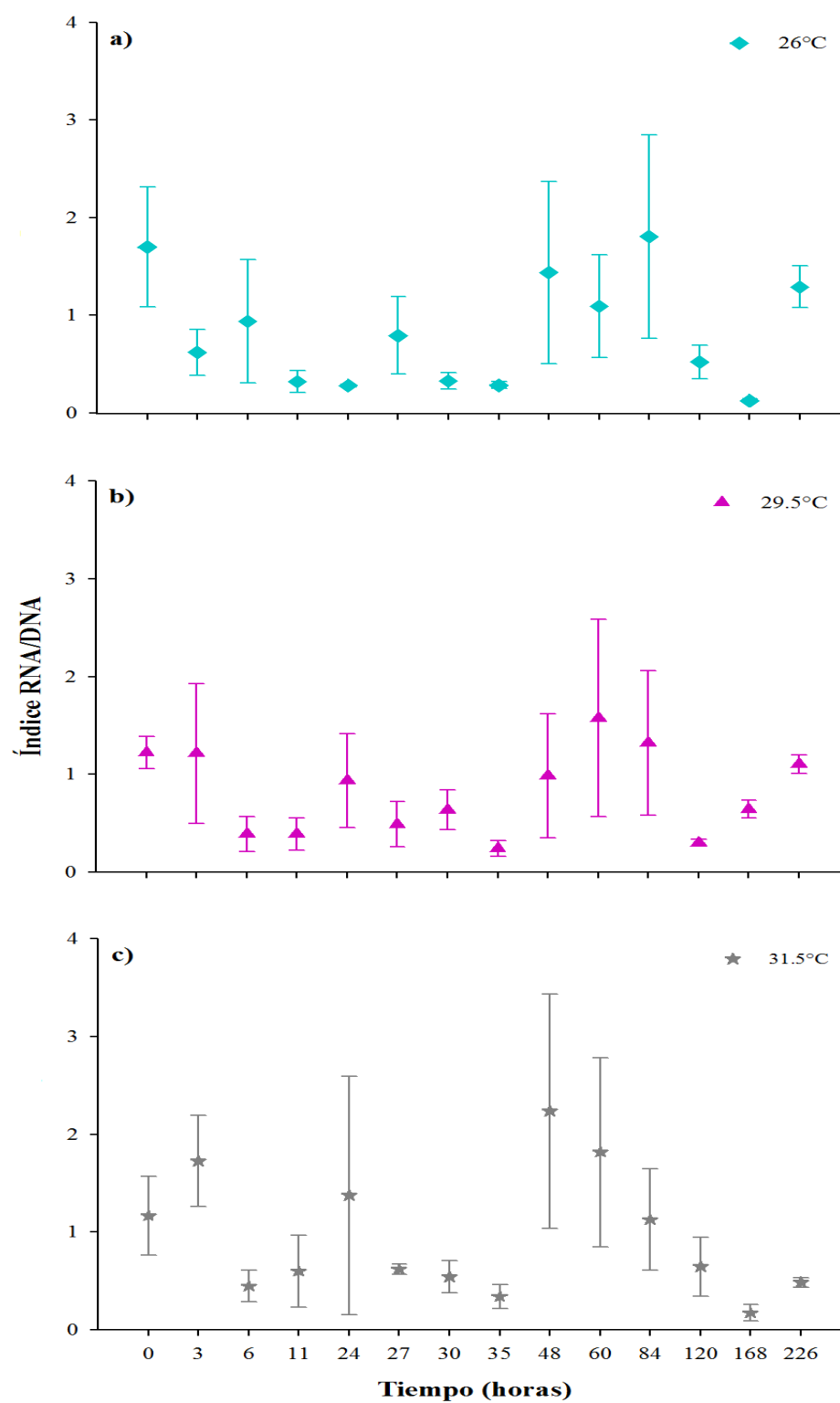


Figura 7. Valores del Índice RNA/DNA en fragmentos de *P. verrucosa* para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico, 26°C (a), 29.5°C (b) y 31.5°C (c). Los valores se expresan como la media $\pm$ error estándar del tamaño de la muestra (n=3).

La figura 8, muestra los datos de los tratamientos 29.5°C y 31.5°C estandarizados respecto al promedio de los valores del tratamiento 26°C. Se observó una clara disminución del índice a partir de las 6 horas de continua exposición en el tratamiento de 31.5°C; de igual manera, presentó valores mayores en comparación con el tratamiento 29.5°C, antes de que iniciara el descenso en estas primeras 6 horas. Sobresalieron tres aumentos del índice RNA/DNA a las 3, 24 y 48 horas de exposición en el tratamiento de 31.5°C.

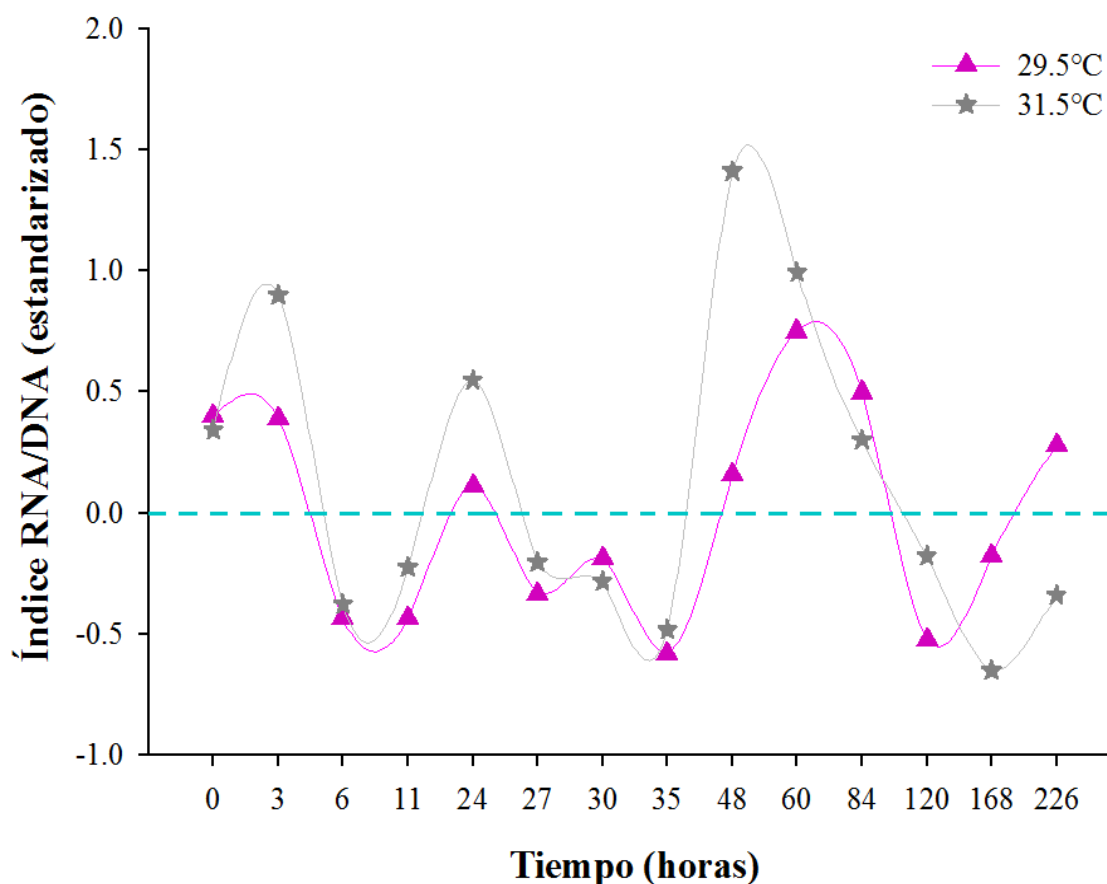


Figura 8. Valores del Índice RNA/DNA estandarizados para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C).

Cabe resaltar que los demás marcadores fisiológicos (contenido de lípidos totales, densidad de simbiontes y concentración de Chl a) se realizó el mismo procedimiento para estandarizar los valores de los tratamiento 29.5°C y 31.5°C respecto a la media de los datos del tratamiento 26°C.

6.2. Lípidos Totales

La concentración de lípidos totales se vio afectada tanto por la temperatura como por el periodo de exposición (Tabla II).

Tabla II. Lípidos totales en fragmentos de *P. verrucosa* expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías). Variables comparadas: tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C) y tiempo de evaluación (0, 3, 6, 11, 24, 27, 30, 35, 48, 60, 84, 120, 168 y 226). GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, $P < 0.050$. Texto subrayado= diferencias significativas

Fuente de variación	GL	SC	F	P
Temperatura	2	0.0157	3.324	<u>0.039</u>
Tiempo	13	0.169	5.523	<u><0.001</u>
Temperatura x Tiempo	26	0.0672	1.095	0.357

La prueba post hoc de Duncan mostró que el tratamiento de 31.5°C fue significativamente diferente al control de 26°C y el tratamiento de 29.5°C (Tabla III).

Tabla III. Comparación del contenido de lípidos totales en fragmentos de *P. verrucosa* entre los distintos tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C) (Prueba post hoc Duncan). DM= Diferencia de medias, Texto subrayado= diferencias significativas.

Tratamientos Comparados	DM	p	q	P
26°C vs 29.5°C	0.000434	2	0.0572	>0.050
26°C vs 31.5°C	0.0237	3	3.270	<u><0.050</u>
29.5°C vs 31.5°C	0.0232	2	3.002	<u><0.050</u>

La concentración de lípidos totales fue variable en los distintos tratamientos. El tratamiento 31.5°C mostró un incremento significativo del 66.5% ($0.158 \pm 0.033 \text{ g} \cdot \text{gps}^{-1}$) a las 27 horas de exposición comparado con el observado al inicio ($0.095 \pm 0.016 \text{ g} \cdot \text{gps}^{-1}$) y al final ($0.036 \pm 0.01 \text{ g} \cdot \text{gps}^{-1}$) del experimento (Fig. 9c), mientras que la concentración inicial y final para el tratamiento 26°C fueron $0.170 \pm 0.036 \text{ g} \cdot \text{gps}^{-1}$ y $0.094 \pm 0.012 \text{ g} \cdot \text{gps}^{-1}$ respectivamente (Fig. 9a, b). En el tratamiento 29.5°C se observó un aumento del 129% ($0.225 \text{ g} \cdot \text{gps}^{-1}$) respecto al valor inicial ($0.098 \pm 0.046 \text{ g} \cdot \text{gps}^{-1}$). Cabe resaltar, que este valor no representa la media de las réplicas biológicas (n=3) si no que, representa solo el valor de una sola muestra (Fig. 9b) debido a que se tuvieron problemas durante el análisis de las muestras.

Al estandarizar los datos de los tratamientos se observó que el tratamiento 29.5°C presentó mayores valores a partir de las 27 horas y hasta el final del experimento en comparación del tratamiento 31.5°C (Fig. 10). Este último, presentó tres incrementos a las 3, 27 y 120 horas de exposición y una marcada disminución en su concentración de lípidos totales posterior a este tiempo (Fig. 10).

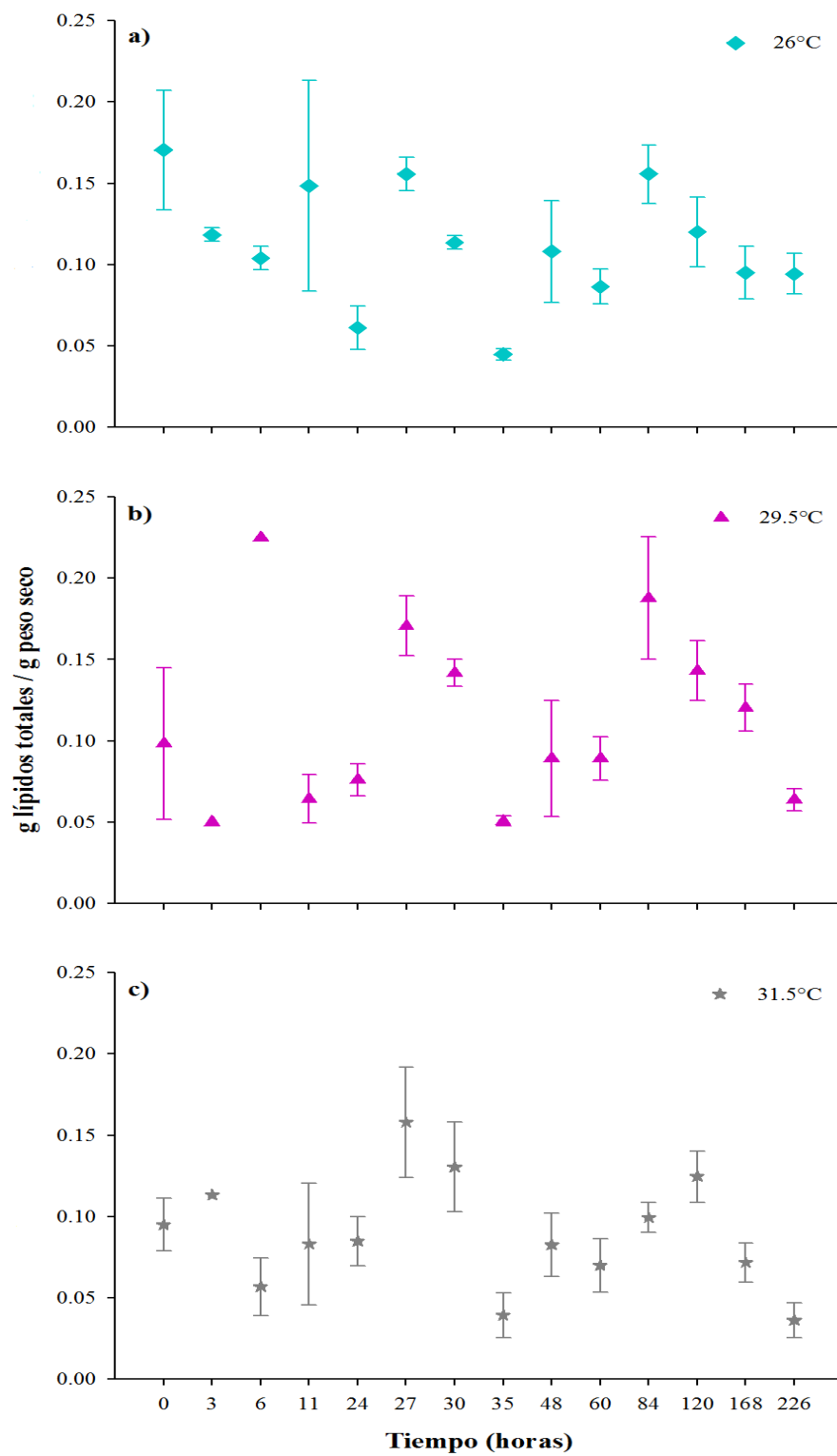


Figura 9. Concentración de lípidos totales en fragmentos de *P. verrucosa* para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico, 26°C (a), 29.5°C (b) y 31.5°C (c). Los valores se expresan como la media $\pm$ error estándar del tamaño de la muestra (n=3).

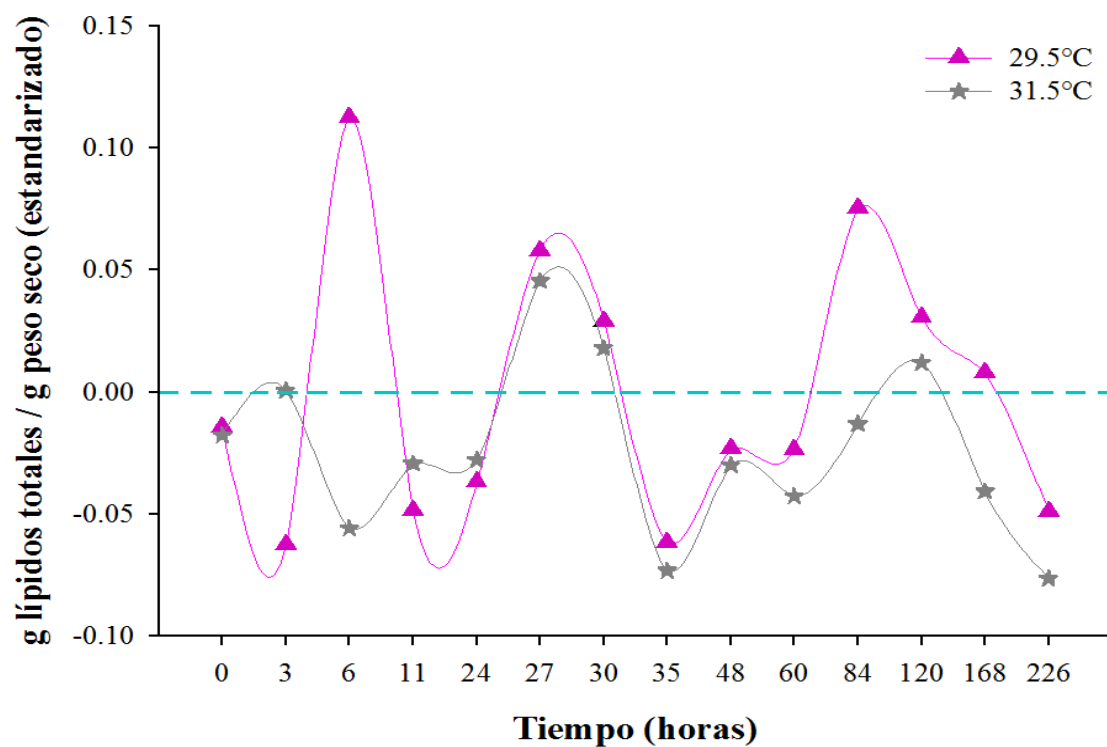


Figura 10. Valores del contenido de lípidos totales estandarizados para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C).

6.3. Densidad de Simbiontes

La densidad de *Symbiodinium* se vio afectada por el periodo de exposición y su interacción con la temperatura (Tabla IV).

Tabla IV. Densidad de *Symbiodinium* en fragmentos de *P. verrucosa* expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías). Variables comparadas: tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C) y tiempo de evaluación (0, 3, 6, 11, 24, 27, 30, 35, 48, 60, 84, 120, 168 y 226). GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, $P < 0.050$. Texto subrayado= diferencias significativas

Fuente de variación	GL	SC	F	P
Temperatura	2	1.042E+012	0.562	0.572
Tiempo	13	3.226E+013	2.677	<u>0.003</u>
Temperatura x Tiempo	26	4.667E+013	1.936	<u>0.013</u>

Los distintos tratamientos variaron significativamente durante el periodo de experimento y mostraron una media muy similar. El mayor valor se observó en el tratamiento 26°C ($3.41 \times 10^6 \pm 0.20$ cél/cm⁻²) mientras que el menor valor ($3.19 \times 10^6 \pm 0.23$ cél/cm⁻²) se registró en el tratamiento de 31.5°C (Fig. 11). A diferencia de los tratamientos 26°C y 29.5°C, los fragmentos expuestos a 31.5°C tendieron a incrementar su densidad de simbiontes alcanzando un valor de $3.90 \times 10^6 \pm 0.51$ cél/cm⁻² en la última evaluación y fue mayor que los observados en los tratamientos 26°C y 29.5°C en el mismo tiempo (Fig. 11). De igual manera se observó que la densidad de *Symbiodinium* disminuyó en los tiempos en que se incrementó la temperatura, esto es, a las 3 (tratamiento 29.5°C y 31.5°C) y 27 horas (tratamiento 31.5°C) de haber dado inicio al experimento (Fig. 11b, c).

Los datos estandarizados mostraron que la menor densidad de simbiontes se presentó en el tratamiento de 31.5°C durante las primeras horas de exposición (Fig. 12), además se pudo observar que la densidad de *Symbiodinium* tiendó a incrementar más que en el tratamiento de 29°C (Fig. 12).

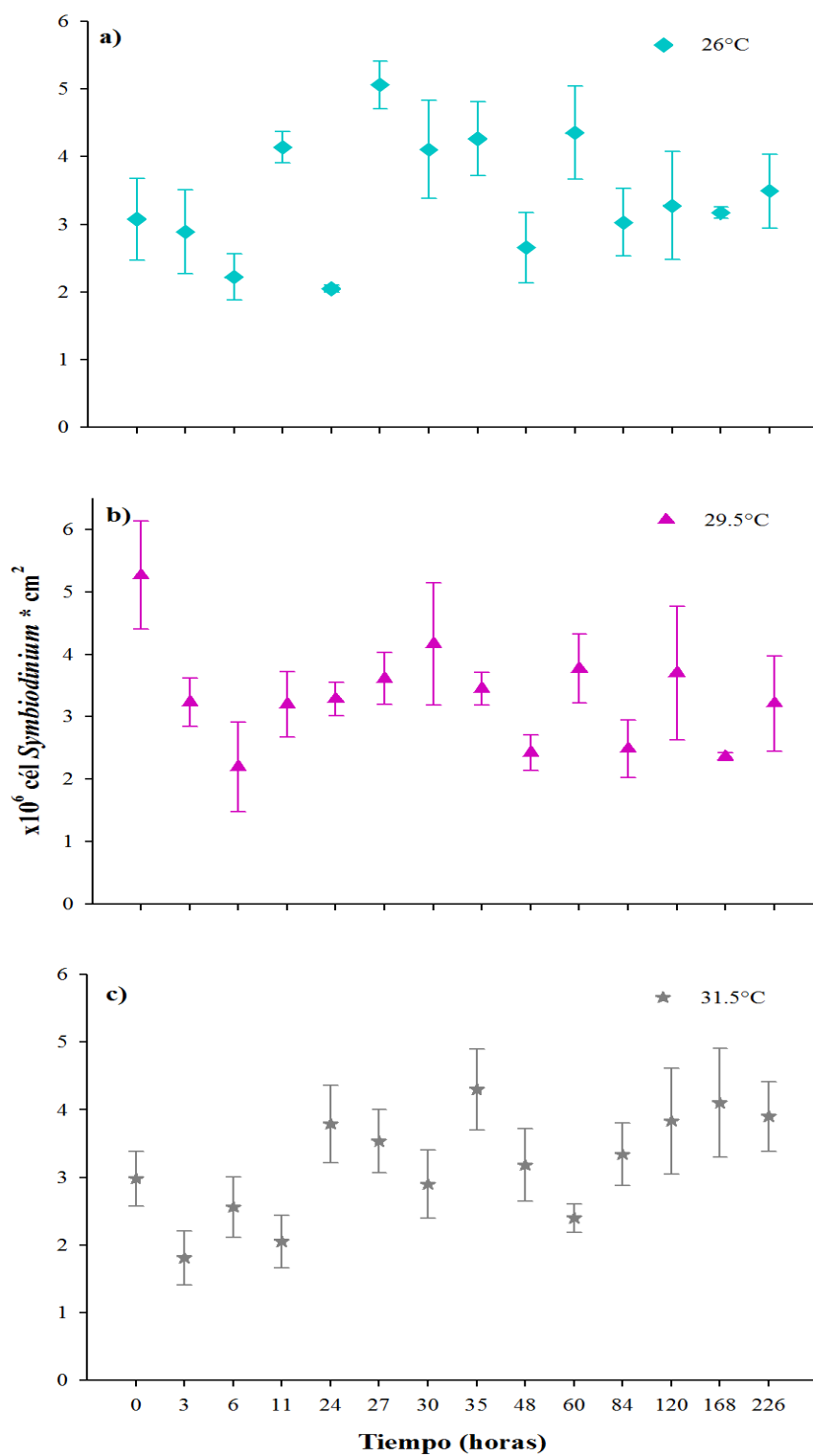


Figura 11. Densidad de simbiositos en fragmentos de *P. verrucosa* para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico, 26°C (a), 29.5°C (b) y 31.5°C (c). Los valores se expresan como la media $\pm$ error estándar del tamaño de la muestra (n=3).

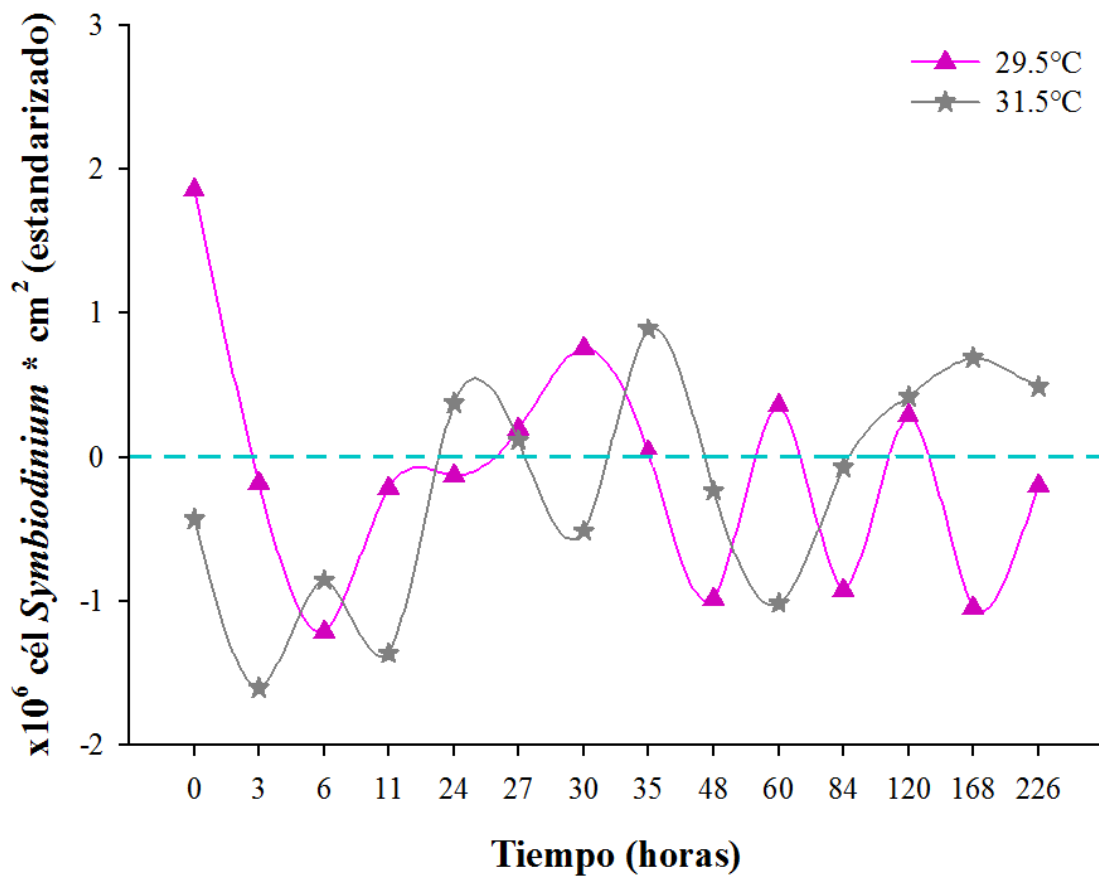


Figura 12. Valores de la densidad de simbioses estandarizados para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C).

6.4 Concentración de Clorofila *a*

Al igual que la densidad de simbioses, el contenido de Chla por célula de *Symbiodinium* varió significativamente durante el periodo de exposición, aunque no en respuesta a la temperatura ni a su interacción con el tiempo en los tres tratamientos (Tabla V; Fig. 13). Las medias observadas fueron 2.21 ± 0.14 , 2.54 ± 0.18 y 2.61 ± 0.16 pg Chla·cél para los tratamientos 26°C, 29.5°C y 31.5°C respectivamente.

Se registró un incremento a las 6 horas de exposición en los distintos tratamientos (Fig. 13).

Tabla V. Concentración de Chla por célula de *Symbiodinium* en fragmentos *P. verrucosa* expuestos a distintas temperaturas (ANOVA de dos vías). Variables comparadas: tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C) y tiempo de evaluación (0, 3, 6, 11, 24, 27, 30, 35, 48, 60, 84, 120, 168 y 226). GL= grados de libertad, SC= suma de cuadrados, $P < 0.050$. Texto subrayado= diferencias significativas

Fuente de variación	GL	SC	<i>F</i>	<i>P</i>
Temperatura	2	3.828E-012	2.155	0.122
Tiempo	13	2.852E-011	2.470	<u>0.007</u>
Temperatura x Tiempo	26	1.733E-011	0.750	0.794

Los datos estandarizados mostraron una mayor concentración de Chla en los fragmentos expuestos a 31.5°C hasta las 11 horas en comparación con el tratamiento 29.5°C, posterior a este tiempo la concentración de Chla tendió a ser mayor en este último (Fig. 14). Se observaron dos incrementos, a las 3 y 11 horas de haber dado inicio al experimento en el tratamiento de 31°C (Fig. 14).

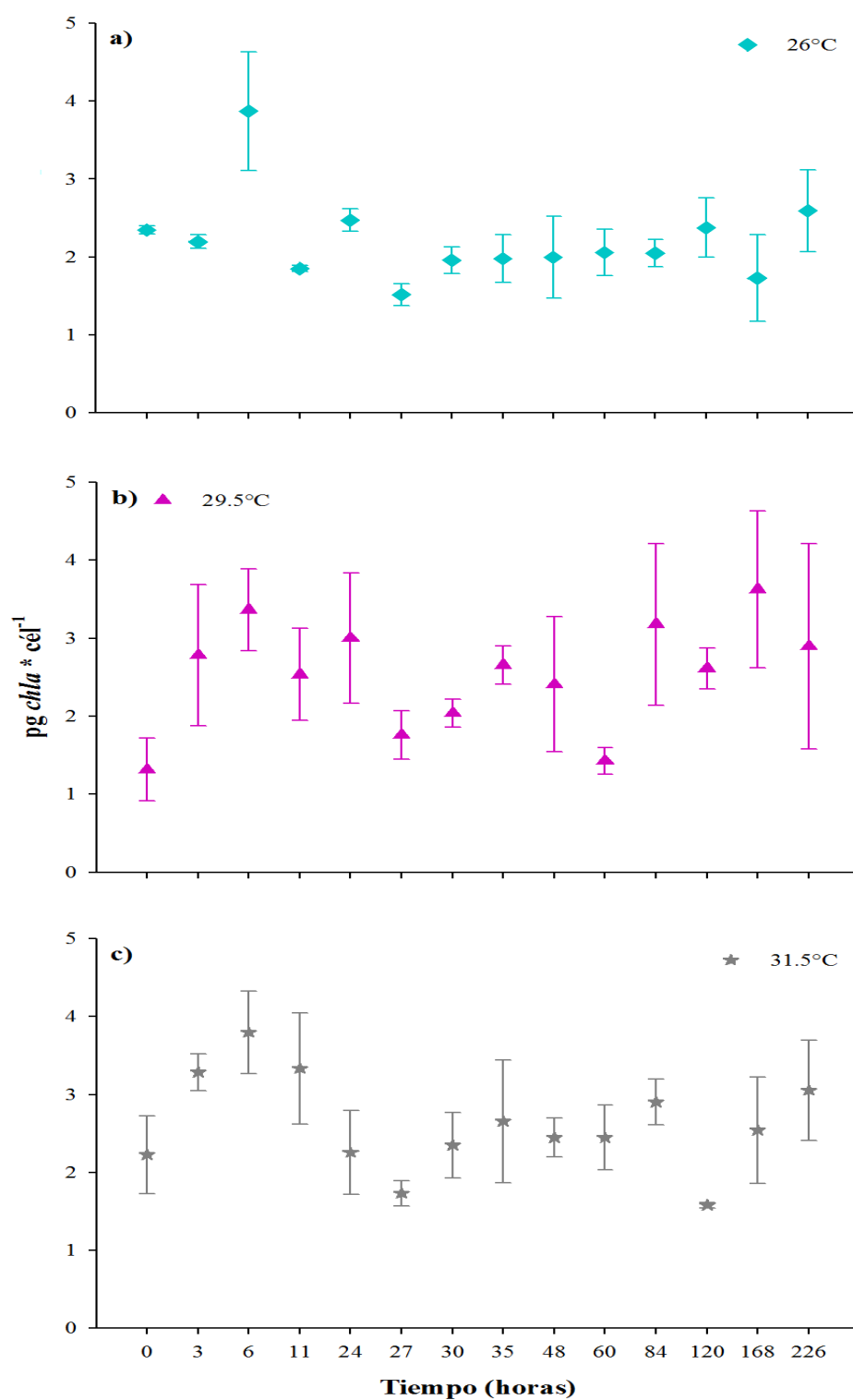


Figura 13. Concentración de Chl a en fragmentos de *P. verrucosa* para cada tratamiento durante el tiempo de exposición al estrés térmico, 26°C (a), 29.5°C (b) y 31.5°C (c). Los valores se expresan como la media $\pm$ EE del tamaño de la muestra (n=3).

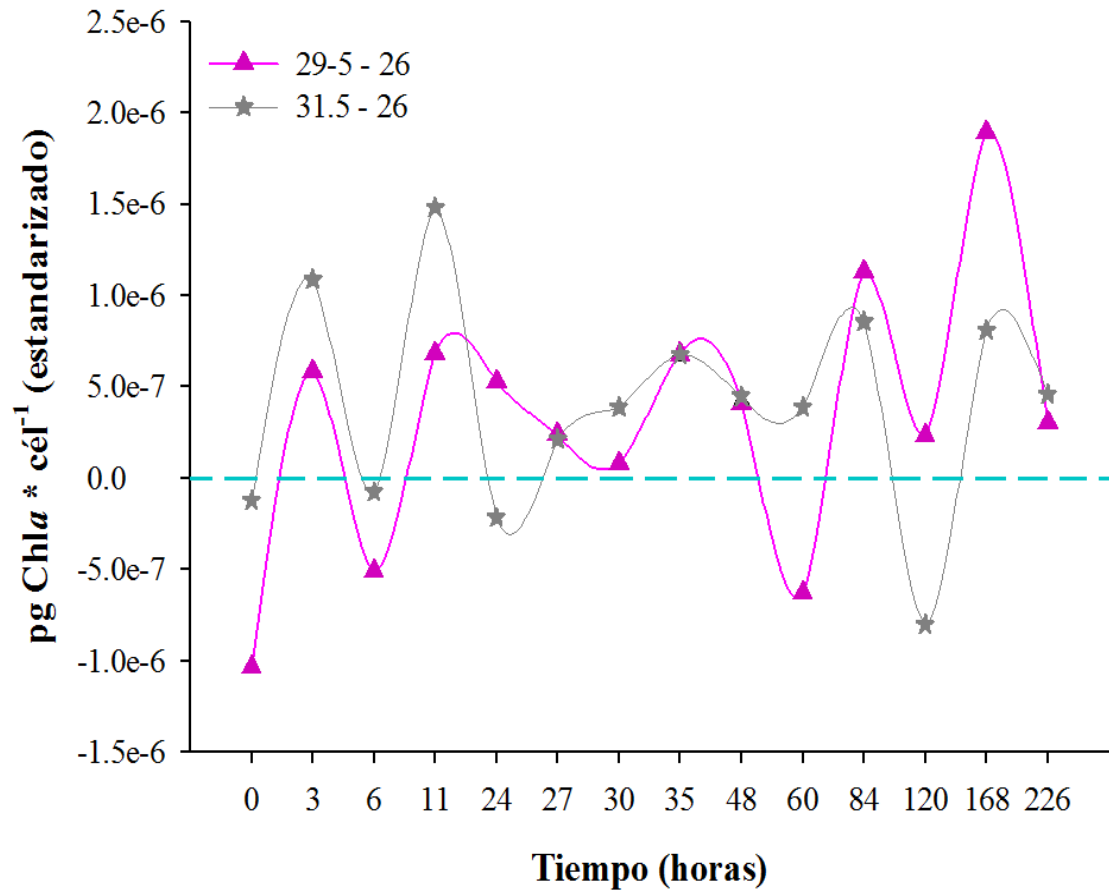


Figura 14. Valores de la concentración de Chl a estandarizados para los tratamientos 29.5 °C y 31.5°C de manera individual, respecto al valor promedio del tratamiento control (26°C).

De igual manera, la concentración de Chl a mostró una correlación negativa con la densidad de *Symbiodinium* (Fig. 15).

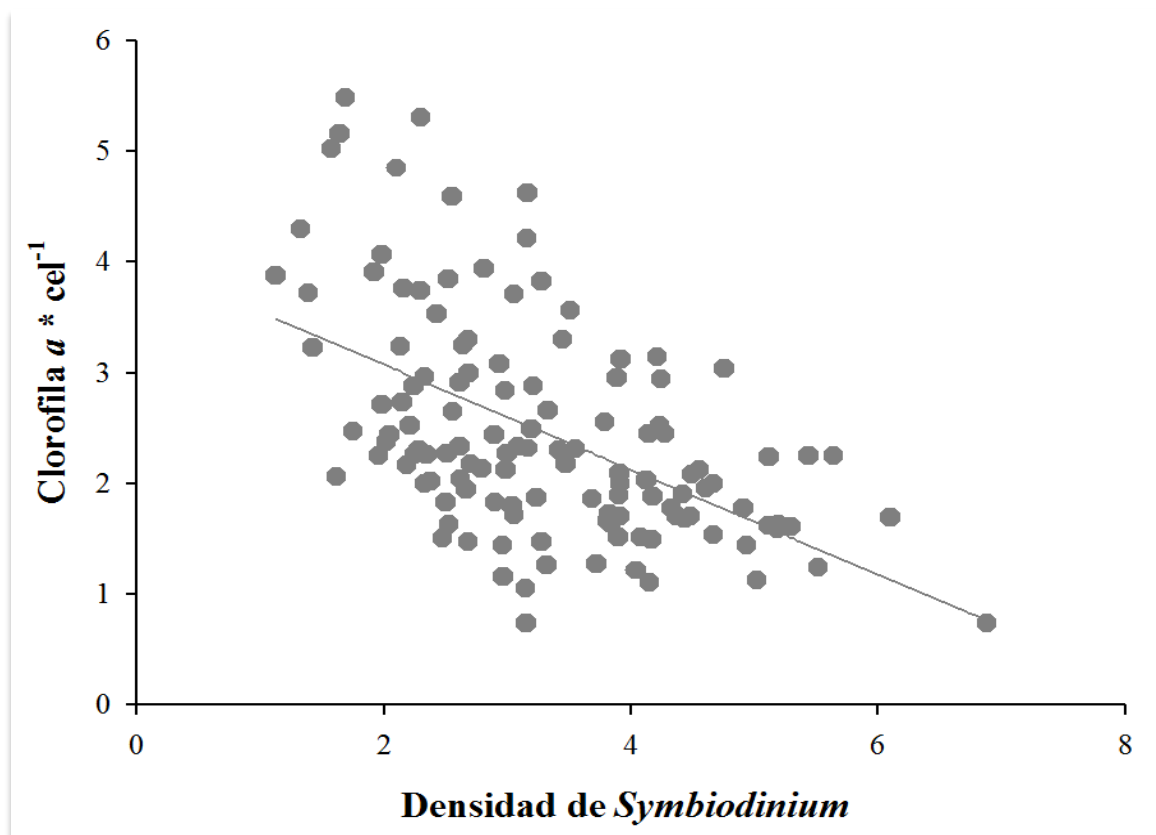


Figura 15. Correlación entre la concentración de Chla y la densidad de simbioses en los fragmentos de *P. verrucosa* expuestos en los tratamientos (26°C, 29.5°C y 31.5°C) en el periodo de experimentación.

6.5. Influencia del Historial Térmico en la Respuesta Fisiológica de *Pocillopora verrucosa*

Las principales diferencias encontradas entre el presente estudio y el realizado por Rodríguez- Troncoso et al (2010) se resumen en la Tabla VI.

Tabla VI. Tabla comparativa entre el presente estudio y un estudio equivalente dentro de Bahía de Banderas (Rodríguez – Troncoso et al. 2010a) en el Parque Nacional Islas Marietas (PNIM). Las diferencias se encontraron en las condiciones de colecta, en el diseño experimental y en los resultados obtenidos. Los signos - y + significan disminución y aumento respectivamente.

	Rodríguez – Troncoso et al (2010a)	Presente estudio
Colecta de fragmentos de <i>Pocillopora verrucosa</i>		
Área de estudio	PNIM	Punta de Mita
Temperatura	29°C	26°C
Profundidad	5 m	3 m
Diseño Experimental		
Periodo de aclimatación de los organismos (días)	10	15
Duración del experimento (horas)	198	226
Temperatura de los tratamientos	Control: 27°C T1: 28°C T2: 31°C	Control: 26°C T1: 29.5°C T2: 31.5°C
Resultados		
Evaluación visual	Blanqueamiento evidente	Inicio perdida de coloración
Lípidos totales (porcentaje)	Control: -42% T1: -42% T2: -90%	Control: -45% T1: -36% T2: -62%
Densidad de simbiontes (porcentaje)	Control: -15% T1: -38% T2: -82%	Control: +13% T1: -39% T2: +30%

Entre las diferencias, resalta que los organismos muestreados en el presente estudio se encontraban expuestos a mayores temperatura debido al fenómeno El Niño, mientras que los muestreados por Rodríguez- Troncoso et al (2010) estaban bajo condiciones típicas registradas para el PNIM (Fig. 16).

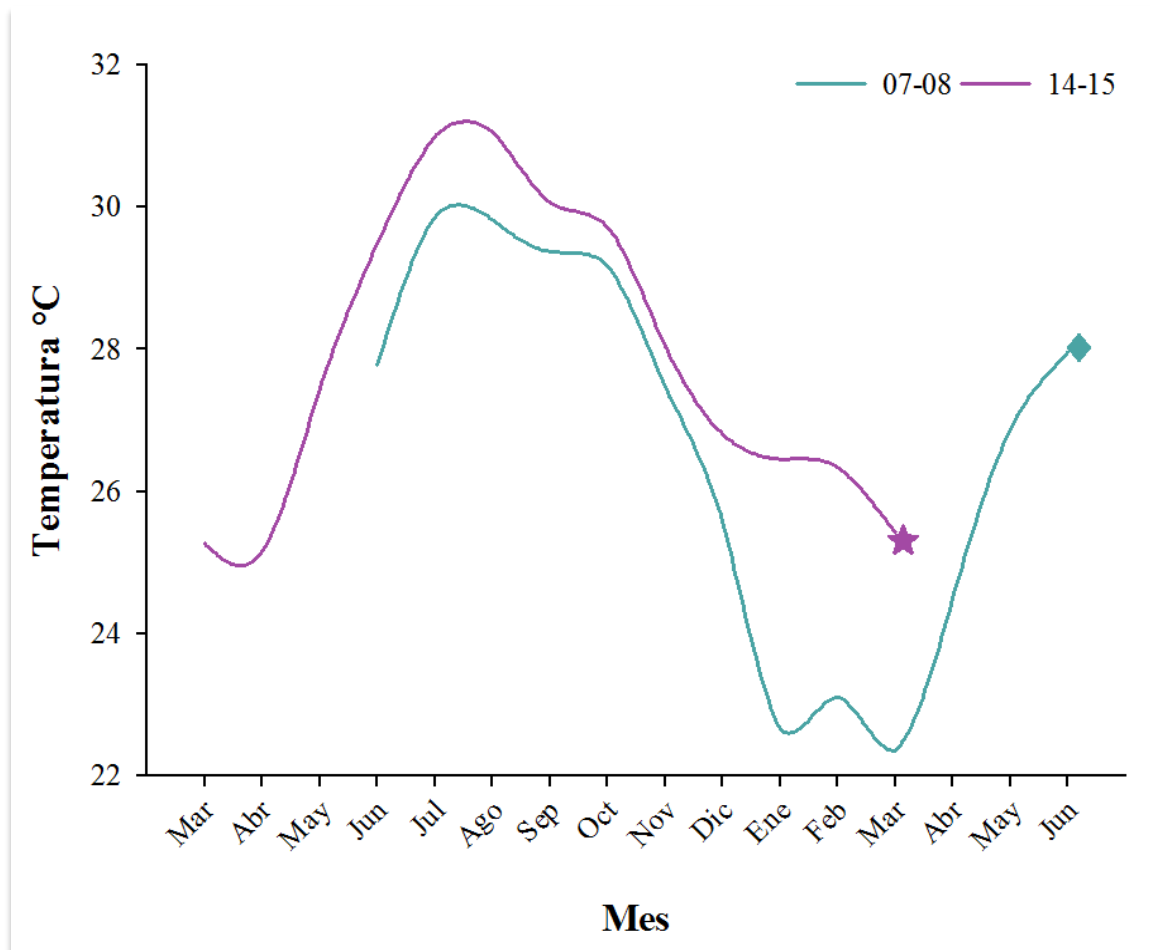


Figura 16. Temperaturas (promedio mensual) registradas para Bahía de Banderas durante el periodo anual correspondiente al que estuvieron sujetos los fragmentos de *P. verrucosa* muestreados por Rodríguez-Troncoso et al. (2010a) durante junio 2007 a junio 2008 (07-08 en la figura) y en el presente estudio de marzo 2014 a marzo 2015 (14-15 en la figura). La forma de estrella (el presente estudio) y diamante (estudio de Rodríguez-Troncoso et al. 2010) representan las temperaturas en el momento de la recolecta de los fragmentos en los estudios referidos.

1. DISCUSIÓN

Los resultados experimentales del presente trabajo muestran que la respuesta fisiológica de *P. verrucosa* difiere al estar expuesta a temperaturas adecuadas para mantener un estado saludable (26°C y 29.5°C) con respecto a temperaturas sub- optimas o estresantes (31.5°C). De igual manera se encontraron diferencias entre la respuesta de los fragmentos expuestos a condiciones de estrés térmico (31.5°C) en este estudio, con lo reportado por Rodríguez- Troncoso et al. (2010a) en un estudio equivalente al presente trabajo.

En general, los valores observados de cada indicador fisiológico (índice RNA/DNA, contenido de lípidos totales, densidad de simbiontes y concentración de chl_a) concuerdan con los documentados previamente para esta especie (Rodríguez- Troncoso et al., 2010a, b, 2014; Delgadillo–Nuño 2015) y otros pocilopóridos del Pacífico mexicano en condiciones de estrés (Flores–Ramírez y Liñán–Cabello, 2007; Liñán–Cabello et al., 2010; Delgadillo–Nuño et al., 2014).

Los fragmentos expuestos a 31.5°C, mostraron la habilidad de responder de manera inmediata incrementando su actividad metabólica como posible resultado de una mayor síntesis proteínas de choque térmico (HSP, “heat shock proteins” por sus siglas en inglés) y de antioxidantes para hacer frente al estrés térmico. Sin embargo, la reducción de su metabolismo general es mayor que la síntesis de HSP y antioxidantes, por lo que los valores del índice RNA/DNA tienden a disminuir. Al respecto se conoce que la inducción de proteínas de choque térmico, así como la regulación de la actividad enzimática son respuestas típicas de aclimatación que presentan los corales ante el estrés térmico, y que

éstas producen cambios en el metabolismo basal de los organismos (Gates y Edmunds, 1999; Ainsworth et al., 2008).

La respuesta observada en el presente estudio, concuerda con lo observado por Mayfield et al. (2013b) quienes expusieron colonias de *P. damicornis* a una temperatura constante de 31.5°C, mismas que respondieron con un aumento gradual del índice RNA/DNA hasta el séptimo día de exposición, posteriormente los valores del índice decayeron drásticamente. La diferencia entre ambos estudios, se puede deber a que el tiempo y magnitud de respuesta puede variar entre especies inclusive en la misma especie (Carilli et al., 2012). Así mismo, esta respuesta podría justificarse con lo observado en colonias de *P. verrucosa* del PNIM, que en condiciones de estrés térmico experimental incrementa de manera exponencial la producción de la enzima antioxidante CuZn-superóxidodismutasa (CuZnSOD) a partir de las 24 horas de exposición continua a 31°C (Rodríguez- Troncoso et al., 2013b).

De igual manera, se observaron incrementos en la síntesis de lípidos, posiblemente como mecanismo para mitigar o reparar daños en las membranas celulares y tratar de mantener su homeostasis en estas nuevas condiciones térmicas, como también lo reportan Rodríguez- Troncoso et al. (2010b) para colonias de *P. verrucosa* del PNIM por shock térmico. Estos autores mostraron que en *P. verrucosa* el daño al tejido es evidente a partir de que la concentración de lípidos comienza a descender, lo que podría sustentar el comportamiento del contenido de lípidos totales en el presente estudio. También, se ha observado un cambio en la composición de lípidos en corales en condiciones de estrés térmico en Islas Gilbert y en Bahía NhaTrang, así como en corales blanqueados de Okinawan, donde se reporta que la concentración de algunas clases de lípidos estructurales

(ej. Fosfolípidos) incrementa mientras que disminuyen algunas clases de lípidos de reserva (ej. Triacilglicerol) (Yamashiro et al., 2005; Carilli et al., 2012; Imbs y Yakovleva, 2012).

La densidad de *Symbiodinium* fue afectada significativamente por la interacción de la temperatura con el tiempo de exposición. Este efecto se pudo ver a las 3 horas de haber iniciado a subir la temperatura en los tratamientos 29.5°C y 31.5°C donde se registra un decremento significativo en la densidad de simbioses. Esta disminución en la densidad de simbioses posiblemente fue debido, a que el incremento de la temperatura favorece el rápido crecimiento del alga simbiote (Davy et al., 2012), así como de su tasa fotosintética (Iglesias- Prieto et al., 1992) y consecuentemente una mayor producción de ROS (Brown y Cossins, 2011). El exceso de ROS es translocado al coral hospedero, por lo que el coral responde expulsando una cierta cantidad de células de *Symbiodinium* para dejar de recibir el exceso de ROS.

Varios autores coinciden que la facultad de poder reaccionar de manera inmediata ante cualquier disturbio le brinda al organismo una mayor probabilidad de supervivencia durante este periodo (Ainsworth et al., 2008; Brown y Cossins, 2011). Lo anterior podría explicar que todos los fragmentos *P. verrucosa* expuestos a 31.5°C sobrevivieron hasta el final del periodo experimental sin llegar a blanquearse. Esto se pudo observar, en el claro aumento de su índice RNA/DNA y concentración de lípidos totales, y en la expulsión de simbioses que se registró a las tres horas de haber dado inicio al periodo experimental.

El que disminuyera el contenido de lípidos totales en los organismos expuestos a 31.5°C a pesar de mostrar una alta densidad de simbioses en sus tejidos y estos a su vez una concentración de Chla similar a los tratamientos a 26°C y 29.5°C, es lo opuesto a lo encontrado por Rodríguez-Troncoso et al. (2010a). Estos autores observaron a lo largo

del periodo de experimentación (198 horas), que los organismos expuestos de manera continua a 31°C disminuían su contenido de lípidos y su densidad de simbiontes progresivamente desde la primera evaluación, registrando una pérdida al final del experimento del 89.7% y 82% respectivamente, culminando en el blanqueamiento de los corales.

A diferencia del estudio mencionado (Rodríguez-Troncoso et al., 2010a) donde la baja concentración de lípidos totales se debió a la pérdida de *Symbiodinium*, en el presente trabajo pudo ser consecuencia de una respuesta de fotoaclimatación del endosimbionte. Al respecto se conoce, que durante el proceso de fotoaclimatación, el dinoflagelado simbionte invierte mayor energía en tratar de mantener su tasa metabólica y sustentar los cambios que ocurren en diversos procesos fotosintéticos que pueden repercutir en su eficiencia fotosintética (Davies, 1984; Iglesias- Prieto et al., 1992) limitando o inhibiendo la translocación de nutrientes a su hospedero. El coral al dejar de recibir fotosintatos por parte de su endosimbionte, utiliza los lípidos almacenados para cubrir sus necesidades metabólicas (Borell et al., 2008; Towle et al., 2015), reduciendo así sus reservas energéticas. Lo anterior ya ha sido reportado para las especies de coral *Acropora digitifera* y *Acropora spicifera* que en condiciones anómalas de temperatura, muestran una alta densidad de simbiontes y una baja concentración de lípidos, al mismo tiempo que incrementan su alimentación heterotrófica (Hinrichs et al., 2013).

Se ha propuesto que la fotoinhibición es un mecanismo de aclimatación para evitar daños al FSPII (Wooldridge, 2009; Krämer et al., 2013). En las primeras etapas de este proceso provocado por un aumento en la temperatura, *Symbiodinium* se fotoaclimata reduciendo el tamaño y/o el número de unidades fotosintéticas (PSU, por sus siglas en

inglés) además se lleva a cabo una mayor síntesis de pigmentos fotoprotectores (ej. carotenoides) en comparación con pigmentos fotosintéticos (Iglesias- Prieto y Trench, 1992), afectando negativamente el contenido de Chla por célula. Lo anterior podría justificar la disminución del contenido de Chla que se observó durante las primeras horas de experimentación. Este mecanismo ya se ha observado en colonias de *P. verrucosa* presentes en los arrecifes de Tahití. Durante el verano estas colonias mostraron una mayor concentración de pigmentos fotoprotectores que de pigmentos fotosintéticos en comparación con las muestras tomadas en invierno (Maritorena et al., 2002); sin embargo, cabe resaltar que son datos de un solo muestreo por temporada y que a diferencia del presente estudio, no representan una respuesta ante un factor de estrés.

Además lo anterior se apoya en la relación negativa que se observó entre la densidad de *Symbiodinium* y su concentración de Chla en el tratamiento a 31.5°C, ya que es una respuesta típica de un proceso de aclimatación del dinoflagelado simbiote ante el estrés térmico por altas temperaturas (Krämer et al., 2013).

Sin embargo, antecedentes para *P. verrucosa* en campo (Sawall et al., 2015) durante el blanqueamiento, o para otros pociloporidos en laboratorio (Mayfield et al., 2013b) previo al blanqueamiento, mostraron una baja densidad de simbiontes con una alta concentración de Chla por célula de *Symbiodinium*, un patrón contrario a lo observado en el tratamiento a 31.5°C. Esta diferencia se podría deber, a que en comparación con los resultados obtenidos por Sawall et al. (2015), nuestros resultados muestran la respuesta previa al blanqueamiento y que en campo otros factores podrían influir en la susceptibilidad del holobionte a blanquearse, como la intensidad de luz y la alimentación heterotrófica (Towle et al., 2015). Mientras que la diferencia entre la respuesta de *P.*

verrucosa (presente estudio) con la de *P. damicornis* (Mayfield et al., 2013b) podría deberse a una respuesta específica de cada especie. Además, el tiempo de exposición (9 días) como el intervalo de tiempo (no mayor a 3 días) entre cada toma de muestras durante el presente estudio, fue menor al periodo experimental (14 días) y al intervalo de tiempo (7 días) entre cada evaluación utilizado por Mayfield et al. (2013b).

De igual manera, el que no disminuyera claramente la densidad de *Symbiodinium* y la concentración de Chla en el tejido del hospedero durante el tiempo de experimentación (226 horas), muestra una gran capacidad de aclimatación del alga simbiote ante las altas temperaturas y podría sustentar la hipótesis de que la susceptibilidad de los corales ante distintos disturbios está determinada en gran parte por la fisiología del dinoflagelado simbiote (LaJeunesse et al., 2010). Al respecto se conoce que las colonias de *P. verrucosa* residentes de Bahía de Banderas están asociadas a *Symbiodinium* clado D (LaJeunesse et al., 2010; Rodríguez- Troncoso et al., 2014), que es uno de los clados más tolerantes a fluctuaciones térmicas y resistentes al estrés ya que se ha encontrado asociado en ambientes de alta turbidez y variabilidad térmica (LaJeunesse, 2007). Por lo anterior se asume que el dinoflagelado es capaz de aclimatarse a condiciones de alta luz que provoca el aumento de la temperatura, y se refleja en su permanencia en el tejido del hospedero a pesar de que disminuye o detiene el flujo de fotosintatos al coral, debido a que requiere mayor energía para mantener su homeostasis en las nuevas condiciones externas.

Al respecto, Cunning y Baker (2013) mencionan que esta estrategia de aclimatación de mantener altas densidades de simbiotes vuelve a los corales más vulnerables ante diversos estresores ambientales que inducen el blanqueamiento, lo cual

justificaría que *P. verrucosa* en el área de estudio sea una de las especies más sucesibles a blanquearse (Carriquiry et al., 2001). Sin embargo, esta estrategia se asocia con la memoria que se produce en los corales debido a eventos de estrés en el pasado.

Al respecto, Brown et al. (2015) mostraron que colonias del coral *Coelastrea aspera* con un historial de eventos de estrés por altas temperatura e irradiancia exhiben una alta densidad de *Symbiodinium* y, una mayor resiliencia durante periodos de estrés térmico posteriores. De igual modo, Middlebrook et al. (2008) reportan que colonias de *Acropora aspera* previamente expuestas a altas temperaturas mostraron una menor pérdida de simbiontes durante el experimento de estrés térmico por calor, que aquellas que no fueron sometidas a mayores temperaturas previas al inicio del experimento. En este contexto, se debe resaltar que las colonias muestreadas estuvieron expuestas a elevadas temperaturas a causa del fenómeno El Niño que provocó anomalías positivas en la temperatura mayores a 3°C durante el verano 2014 en el Pacífico mexicano; dicho fenómeno se prolongó hasta el 2015 y durante el mes de marzo (mes en que se realizó la colecta de muestras) se registraron anomalías positivas $\geq 1^{\circ}\text{C}$ (CONAGUA, 2015). Por lo que la presencia de una alta densidad de *Symbiodinium* en el tejido del coral en condiciones de estrés térmico por calor podría asociarse a esta “memoria” del organismo.

Las condiciones ambientales también influyen en la fisiología de los organismos, los que podría también explicar las diferencias en la respuesta del presente estudio con la observada por Rodríguez- Troncoso et al 2010a. En este contexto, a pesar de que no se ha documentado con detalle, se sabe que el régimen térmico es mayor en Punta de Mita que en el PNIM. En Punta de Mita se han registrado temperaturas en invierno de 25°C y en verano de 31.5°C (Platas y Filonov, 2007), alcanzando temperaturas hasta de 33°C de

manera sostenida durante el mes de septiembre (Rodríguez- Troncoso, comunicación personal). Mientras que en el PNIM oscilan de 23°C (marzo) a 30.5°C, llegando a registrar temperaturas de 33°C por periodos cortos en el mes de septiembre que es el mes más cálido registrado para Bahía de Banderas (CONANP, 2008).

La disparidad entre regímenes térmicos se puede deber principalmente a dos procesos físicos, i) debido a que en la zona de Punta de Mita, la circulación es restringida y ii) que los ambientes en donde hay presencia de coral en este sitio se caracterizan por ser ambientes más someros, donde las especies del género *Pocillopora* se encuentran distribuidas ente 1 – 5 metros de profundidad. Por su parte, en el PNIM, esta misma especie se observa hasta 12m de profundidad (Rodríguez– Troncoso et al., 2010b) y a diferencia de Punta de Mita, el parque se caracteriza por poseer una circulación abierta. Esta característica le da al PNIM una dinámica en la cual se presentan fenómenos como ondas internas que producen cambios abruptos en la temperatura de hasta 3°C así como la presencia de aguas de surgencias que causan temperaturas por debajo de 23°C (Platas y Filonov, 2007; CONANP, 2008). Por esta razón, las comunidades coralinas del PNIM deben estar aclimatadas a cambios bruscos y de periodos cortos en la temperatura, mientras que las comunidades de Punta de Mita deben ser capaces de soportar altas temperaturas por periodos largos, lo que justificaría la diferencia en la respuesta fisiológica de *P. verrucosa* entre estos estudios.

Además del régimen térmico, otros factores ambientales (luz, salinidad y acidificación) influyen en la tolerancia térmica del holobionte (Kuanui et al., 2015; Dunne y Brown, 2001; Anthony et al., 2007 y Brown et al., 2011), estos factores suelen variar más en arrecifes costeros (ej. Punta de Mita) que en los insulares (ej. PNIM). Además, las

comunidades de Punta de Mita se ven sujetas a mayores presiones antropogénicas (sedimentación, eutrofización y contaminación) que las comunidades de PNIM.

Se ha observado que en sinergia con la temperatura, las bajas salinidades reducen la supervivencia de corales expuestos a cambios bruscos de temperatura, mientras que las altas intensidades de luz causan una sustancial pérdida de simbiontes y al igual que la sedimentación, causan bajas tasas de crecimiento y altas tasas de mortalidad (Coles y Jokiel., 1978; Flores et al., 2012). Por su parte Dam et al. (2015) documentan que la presencia de herbicidas causa un decremento en la eficiencia fotosintética de *Symbiodinium* clado D expuestos a temperaturas elevadas. Lo anterior sugiere que las colonias de *P. verrucosa* deben poseer una gran capacidad de respuesta ante todos estos estresantes y poder desarrollarse en las condiciones marginales de la zona.

No obstante, el historial térmico de la comunidad coralina ha permitido el proceso de aclimatación de los corales en esta región determinando en gran parte el grado de afectación y de recuperación que presentan ante eventos de estrés (Carilli et al., 2012). En este sentido, es importante mencionar que las condiciones ambientales a las que estaban sujetos los fragmentos de *P. verrucosa* muestreados por Rodríguez-Troncoso et al. (2010a) eran las típicas registradas para la zona, mientras que los organismos muestreados en el presente estudio estuvieron expuestos en el sitio de recolecta a condiciones anómalas de la temperatura producto del fenómeno El Niño que según varios especialistas ha sido el más intenso a nivel global (NOAA). Estas condiciones anómalas pudieron haber generado en los fragmentos expuestos en este trabajo, una memoria de corto plazo que les permitió mostrar una mayor tolerancia térmica en comparación con la observada en las colonias del PNIM utilizadas previamente por Rodríguez-Troncoso et al. (2010a).

Además, teniendo en cuenta los antecedentes mencionados (ej. Middlebrook et al., 2008; Carilli et al., 2012; Brown et al., 2011) se puede argumentar que la respuesta fisiológica que mostró *P. verrucosa* también está determinada por su historial térmico. Estas colonias son sobrevivientes del fenómeno El Niño 97-98 que provocó una mortalidad del 96% de las especies del género *Pocillopora* en Bahía de Banderas, resaltando que Punta de Mita fue la zona más afectada de la región (Carriquiry et al., 2001). Posterior a este fenómeno, se registró en el 2006 un evento moderado El Niño para las costas mexicanas que provocó el blanqueamiento de las comunidades coralinas de Baja California Sur (LaJeunesse et al., 2007). Asimismo, se observó durante el fenómeno La Niña 08 el blanqueamiento de los corales residentes del PNIM (Cupul– Magaña y Calderón– Aguilera, 2008). Todos estos eventos debieron generar una “memoria” a largo plazo que les permite una mayor tolerancia a temperaturas que sobrepasan o se encuentran en el borde de su límite como la temperatura más alta utilizada en el presente estudio.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el historial térmico genera una “memoria” en la respuesta fisiológica de los organismos ampliando su umbral térmico lo que les permite aclimatarse a altas temperaturas y sobrevivir a eventos de estrés térmico de gran intensidad y duración (Furby et al., 2013; Rodolfo– Metalpa et al., 2014; Dandan et al., 2015) y reafirma que *P. verrucosa* es una especie altamente resiliente (Reyes-Bonilla et al., 2008) en la zona de Punta de Mita.

Sin embargo, para reforzar esta hipótesis será importante contar con datos de la temperatura *in situ* y de la condición del arrecife a largo plazo; del mismo modo, será necesario evaluar la respuesta fisiológica de las colonias presentes en Punta de Mita, debido a que la diferencia entre la respuesta observada en el presente estudio respecto con la

registrada en colonias de *P. verrucosa* del PNIM, puede ser el resultado de una aclimatación local.

El presente estudio es el primero en documentar la respuesta térmica de *P. verrucosa* en la zona de estudio, así como el primero en hacer un esfuerzo para conocer la influencia del historial térmico en la respuesta fisiológica de corales en los arrecifes mexicanos. Por lo cual se pretende que los resultados obtenidos sirvan como una herramienta que ayude a comprender cambios en la dominancia de la comunidad coralina de esta zona y en particular de Punta de Mita; la respuesta térmica que presenta *P. verrucosa* en Bahía de Banderas y sirva como línea base para un monitoreo constante de la comunidad coralina en la zona de estudio, y finalmente como referencia del estado de salud de esta especie previo y durante el blanqueamiento en todas sus zonas de distribución en el Pacífico mexicano.

8. CONCLUSIONES

La respuesta de los corales en el tratamiento 31.5°C en comparación con los tratamientos 26°C y 29.5°C mostró, una disminución significativa en el contenido de lípidos totales, una tendencia a disminuir del índice RNA/DNA y de la concentración de *chl a* y un incremento en la densidad de simbioses.

Los organismos a 31.5°C mostraron incrementos en el índice RNA/DNA y en el contenido de lípidos totales muy posiblemente como una respuesta de mitigación y/o reparación de daños celulares ocasionados por el estrés térmico.

La densidad de *Symbiodinium* y la concentración de *Chl a* en el tejido del coral hospedero observada en el tratamiento 31.5°C, muestran la capacidad de aclimatación del endosimbionte a elevadas temperaturas durante periodos prolongados de tiempo, debido a que no se documentó su expulsión al final del experimento.

Los bajos valores de lípidos totales en los organismos expuestos a estrés térmico (31.5°C) al final del experimento, se podrían deber a una respuesta de fotoaclimatación del endosimbionte, ya que este mecanismo conlleva un gasto energético extra, lo que limita la translocación de nutrientes a su hospedero.

La estrategia de aclimatación de los fragmentos de *P. verrucosa* de mantener a sus simbioses en condiciones de estrés térmico, puede asociarse a la "memoria" que pudiera producir eventos históricos de estrés en la fisiología de los corales.

La diferencia entre la respuesta observada en el presente estudio respecto a la documentada por Rodríguez-Troncoso et al. (2010a), podría estar determinada por la discrepancia del historial de eventos de estrés ambiental y antropogénico.

Los bioindicadores utilizados fueron buenos descriptores de la respuesta del holobionte (índice RNA/DNA y contenido de lípidos totales) y de la dinámica del dinoflagelado simbiote (densidad de simbioses y concentración de Chl*a*) en condiciones de estrés térmico.

9. LITERATURA CITADA

- Ainsworth, T. D., O. Hoegh-Guldberg, S. F. Heron, W. J. Skirving, & W. Leggat. 2008. Early cellular changes are indicators of pre-bleaching thermal stress in the coral host. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 364, 63–71
- Andersson A.J., F.T. Mackenzie, J.P. Gattuso. 2011. Effects of Ocean Acidification on Benthic Processes, Organisms and Ecosystems. En: Gattuso J.P., L. Hansson. (Ed). *Ocean Acidification*. OXFORD University Press, New York. 122-153pp.
- Anthony K.R.N., S.R. Connolly, O. Hoegh-Guldberg. 2007. Bleaching, energetic, and coral mortality risk: Effects of temperature, light and sediment regime. *Limnol Oceanogr* 52, 716-726.
- Baird, A. H., R. Bhagooli, P. J. Ralph, & S. Takahashi. 2008. Coral bleaching: the role of the host. *Trends in Ecology & Evolution*. 24, 16–20
- Borell, E. M., A. R. Yuliantri, K. Bischof. & C. Richter. 2008. The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 364, 116–123
- Brown, B. E., C. A. Downs, R. P. Dunne, & S. W. Gibb (2002). Exploring the basis of thermotolerance in the reef coral *Goniastrea aspera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242, 119–129
- Brown, B. E., & A. R. Cossins. 2011. The potential for temperature acclimatisation of reef corals in the face of climate change. En: Dubinsky Z., N. Stambler. (Ed). *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer. 421–433
- Brown, B. E., R. P. Dunne, A. J. Edwards, M. J. Sweer, & N. Phongsuwan. 2015. Decadal environmental “memory” in a reef coral?. *Mar. Biol.* 162, 479–483
- Bruno, J. F., & E. R. Selig. 2007. Regional decline of coral cover in the Indo – Pacific: timing, extent, and subregional comparisons. *PloS ONE*. 2 (8): e711
- Carilli, J., S. D. Donner, & A. C. Hartmann. 2012. Historical temperature variability affects coral response to heat stress. *PLoS ONE*. 7(3): e34418

- Carriquiry, J. D., & H. Reyes–Bonilla. 1997. Estructura de la comunidad y distribución geográfica de los arrecifes coralinos de Nayarit, Pacífico de México. *Ciencias Marinas*. 23, 226–248
- Carriquiry, J. D., A. L. Cupul-Magaña, F. Rodríguez–Zaragoza, P. Medina–Rosas. (2001) Coral bleaching and mortality in the mexican Pacific during the 1997-98 El Niño and prediction from a remote sensing approach. *Bull Mar Sci*. 69, 237-249.
- Castillo, K. D., & B. S. T. Helmuth. 2005. Influence of thermal history on the response of *Montastrea annularis* to short-term temperature exposure. *Mar. Biol*. 148, 261–270
- Coffroth, M. A., H. K. Lasker, & J. K. Oliver. 1989. Coral mortality outside of the eastern Pacific during 1982–1983: relationship to El Niño. En: Glynn (Ed). *Global Consequences of the 1982–83 El Niño–Southern Oscillation*. Elsevier Oceanography Series. 554pp.
- Coles, S. L., & B. M. Riegl. 2013. Thermal tolerances of reef corals in the Gulf: A review of the potential for increasing coral survival and adaptation to climate change through assisted translocation. *Marine Pollution Bulletin*. 72, 323–332
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 2008. Programa de Conservación y Manejo: Parque Nacional Islas Marietas. México. 129pp
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2015. Coordinación General del servicio Meteorológico Nacional Gerencia de Meteorología y Climatología Subgerencia de Pronóstico a Mediano y Largo Plazo. Reporte del clima en México. Marzo 2015, Año 5 Número 3.
- Cunning, R., & A. C. Baker. 2013. Excess algal symbionts increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change*. 3, 259–262
- Cupul–Magaña, A., & L. Calderón–Aguilera. 2008. Cold water bleaching at Islas Marietas National Park, Nayarit, México. 15to Congreso Nacional de Oceanografía, Veracruz, México
- Dam, J. W. V., S. Uthicke, V. H. Beltran, J. F. Mueller, & A. P. Negri. 2015. Combined thermal and herbicide stress in functionally diverse coral symbionts. *Environmental Pollution*. 204, 271–279

- Dandan, S. S., J. L. Falter, R. J. Lowe, & M. T. McCulloch. 2015. Resilience of coral calcification to extreme temperature variations in the Kimberley region, northwest Australia. *Coral Reefs*. DOI 10.1007/s00338-015-1335-6
- Davies, P. S. 1984. The role of zooxanthellae in the nutritional energy requirements of *Pocillopora eydouxi*. *Coral Reef*. 2, 181–186
- Davy, S. K., D. Allemand, & V. M. Weis. 2012. Cell biology of cnidarian–dinoflagellate symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76, 229–261
- De la Lanza, G. (Comp). 1991. *Oceanografía de los Mares Mexicanos*. AGT Editor. S. A. 569pp.
- Delgadillo–Nuño, M. A., Liñán–Cabello, J. Reyes–Gómez, & O. Soriano–Santiago. 2014. Response to pH stress in the reef–building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Rev. Bio. Mar. Oce.* 49, 449–459
- Delgadillo–Nuño, M. A. 2015. Cambios estacionales en la expresión genética, metabolismo y simbiosis en el coral escleractinio (*Pocillopora verrucosa*) asociados a la respuesta de estrés en la costa de Colima, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. 89pp.
- Dunne, R. P., & B. E. Brown. 2001. The influence of solar radiation on bleaching of shallow water reef corals in the Andaman Sea, 1993–1998. *Coral Reefs* 20, 201–210
- Erez J., S. Reynaud, J. Silverman, K. Schneider, & D. Allemand. 2011. Coral calcification under ocean acidification and global change. En: Dubinsky Z., N. Stambler. (Ed). *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer. 151–176pp.
- Flores–Ramírez, L. A., & M. A. Liñán–Cabello. 2007. Relationships among thermal stress, bleaching and oxidative damage in the hermatypic coral, *Pocillopora capitata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146, 194–202
- Folch J. L. M. 1957. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journ. Biol. Chem.* 226, 497–506
- Furby, K. A., J. Bouwmeester, & M. L. Berumen. 2013. Susceptibility of central Red Sea corals during a major bleaching event. *Coral Reefs*. 32, 505–513

- Gates, R. D., & P. J. Edmunds. 1999. The physiological mechanisms of acclimatization in tropical reef corals. *Amer. Zool.* 39, 30–43
- Glynn, P.W., & L. D’Croz. 1990. Experimental evidence for high temperature stress as the cause of El Nino coincident mortality. *Coral Reefs*. 8, 181–191.
- Glynn P. W., J. L. Maté, A. C. Baker, & M. O. Calderón. 2001. Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997–1998 El Niño–Southern Oscillation event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982–1983 event. *Bull. Mar. Sci.* 69, 79–109
- Grottoli, A. G., M. E. Warner, S. J. Levas, M. D. Aschaffenburg, V. Schoepf, M. McGinley, J. Baumann, & Y. Matsui. 2014. The cumulative impact of annual coral bleaching can turn some coral species winners into losers. *Global Change Biology*. Doi: 10.1111/gcb.12658
- Guest, J. R., A. H. Bair, J. A. Maynard, E. Muttaqin, A. J. Edwards, S. J. Campbell, K. Yewdall, Y. A. Affendi, & L. M. Chou. 2012. Contrasting patterns of coral bleaching susceptibility in 2010 suggest an adaptive response to thermal stress. *PLoS ONE*. 7(3): e33353
- Hill, R. W., G. A. Wyse, & M. Anderson. 2012. *Animal Physiology*. Sinauer Associates, Inc.
- Hinrichs, S., N. L. Patten, R. J. N. Allcock, S. M. Saunders, D. Strickland, & A. M. Waite. 2013a. Seasonal variation in energy levels and metabolic processes of two dominant *Acropora* species (*A. spicifera* and *A. digitifera*) at Ningaloo reef. *Coral Reefs*. 32, 623–635
- Hoegh–Guldberg, O. 2014. Coral reef sustainability through adaptation: glimmer of hope or persistent mirage?. *Current Opinion in Environmental Sustainability*. 7, 127–133
- Iglesias–Prieto, R., J. L. Matta, W. A. Robins, & R. K. Trench. 1992. The photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 10302–10305

- Imbs, A. B., & I. M. Yakovleva. 2012. Dynamic of lipid and fatty acid composition of shallow–water corals under thermal stress: an experimental approach. *Coral Reefs*. 31, 41–53
- IPCC. Cambio Climático 2013: Bases Físicas. Resumen Para Responsables de Política. Contribución del grupo de trabajo I al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos Sobre el Cambio Climático. Suiza, 2013. 27 pp.
- Krämer, W. E., V. Schrameyer, R. Hill, P. J. Ralph, & K. Bischof. PSII activity and pigment dynamics of *Symbiodinium* in two Indo – Pacific corals exposed to short–term high–light stress. 2013. *Mar. Biol.* 160, 563–577
- Kuanui, P., S. Chavanich, V. Viyakarn, M. Omori, & C. Lin. 2015. Effects of temperature and salinity on survival rate of cultured corals and photosynthetic efficiency of zooxanthellae in coral tissues. *Ocean. Sci. J.* 50, 263–268
- LaJeunesse, T. C., H. Reyes-Bonilla, & M. E. Warner. 2007. Spring “bleaching” among *Pocillopora* in the Sea of Cortez, Eastern Pacific. *Coral Reefs* 26, 265–270.
- LaJeunesse, T. C., R. Smith, M. Walther, J. Pinzón, D. T. Pettay, M. McGinley, M. Aschaffenburg, P. Medina–Rosas, A. L. Cupul–Magaña, A. López–Pérez, H. Reyes–Bonilla, & M. E. Warner. 2010. Host–symbiont recombination versus natural selection in the response of coral–dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *Proc. R. Soc. B.* 277, 2925–2934
- Liñán–Cabello, M. A., L. A. Flores–Ramírez, T. Zenteno–Savin, N. O. Olguín–Monroy, R. Sosa–Avalos, M. Patiño–Barragan & A. Olivos–Ortiz. 2010. Seasonal changes of antioxidant and oxidative parameters in the coral *Pocillopora capitata* on the Pacific coast of Mexico. *Marine Ecology*. 31, 407–417
- Maritorena, S., C. Payri, M. Babin, H. Claustre, L. Bonnafoous, A. Morel, & M. Rodire. 2002. Photoacclimatization in the zooxanthellae of *Pocillopora verrucosa* and comparison with a pelagic algal community. *Oceanologica Acta*. 25, 125–134
- Mayfield, A.B., & R.D. Gates. 2007. Osmoregulation in anthozoan–dinoflagellate symbiosis. *Comp Biochemistry and Physiology, Part A* 147, 1–10

- Mayfield, A. B., T. Y. Fan, & C. S. Chen. 2013a. Physiological acclimation to elevated temperature in a reef-building coral from an upwelling environment. *Coral reefs*. 32, 909–921
- Mayfield, A. B., M. J. Chen, P. J. Meng, H. J. Lin, C. S. Chen, & P. J. Liu. 2013b. The physiological response of the reef coral *Pocillopora damicornis* to elevated temperature: results from coral reef mesocosm experiments in southern Taiwan. *Marine Biology Research*. 86, 1–11
- Middlebrook, R., O. Hoegh–Guldberg, & W. Leggat. 2008. The effect of thermal history on the susceptibility of reef-building corals to thermal stress. *Journ. Exp. Biol.* 211, 1050–1056
- Muscatine, L. 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. En: Dubinsky Z. (Ed). *Coral Reefs, Ecosystems of the World*. V 25. Elsevier Sci. Publ. Amsterdam. 75–87pp
- Olivares–Bañuelos, T., S. Figueroa–Flores, & E. Carpizo–Ituarte. 2014. Efecto del estrés en la respuesta ecofisiológica de la galleta de mar *Dendroaster excentricus* en el noroeste de México. *Ciencias Marinas*. 40, 133–147
- Palumbi, S. R., D. J. Barshis, N. Traylor–Knowles, & R. A. Bay. 2014. Mechanisms of reef coral resistance to future climate change. *Science*. 344, 895–898
- Plata, L., & A. Filonov. 2007. Marea interna en la parte noroeste de la Bahía de Banderas, México. *Ciencias Marinas*. 33, 197–215.
- Pörtner, H. O. 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchies of thermal tolerance in animals, *Comparative biochemistry and physiology a-molecular and integrative physiology*. 132, 739–761
- Pratchett, M. S., D. McCowan, J. A. Maynard, & S. F. Heron. 2013. Changes in bleaching susceptibility among corals subject to ocean warming and recurrent bleaching in Moorea, French Polynesia. *PLoS ONE*. 8(7): e70443
- Reyes–Bonilla, H. 1993. Coral reef bleaching at Cabo Pulmo reef, Gulf of California, Mexico. *Bull. Mar. Sci.* 52, 832–837

- Reyes–Bonilla, H., J. D. Carriquiry, G. E. Leyte–Morales, & A. L. Cupul–Magaña. 2002. Effects of the El Niño–Southern Oscillation and the anti El Niño event (1997–1999) on coral reefs of the western coast of Mexico. *Coral Reefs*. 21, 368–372
- Reyes–Bonilla, H., A. Ayala–Bocos, L. E. Calderón–Aguilera, M. D. Herrero–Pérezrul, M. D. Herrero–Perezrul, & P. C. González–Espinosa. 2008. Proyección de cambios en la temperatura del Golfo de California y efectos sobre la abundancia y distribución de especies arrecifales. En: 1ra Bienal de la Agenda de Investigación del Programa de Ordenamiento Ecológico Marino del Golfo de California (La Paz, Baja California Sur, México). Pp.
- Reyes–Bonilla, H., L. E. Calderón–Aguilera, G. Cruz–Piñón, R. A. López–Pérez, & P. Medina–Posas. 2010. Evaluación de la diversidad gama de corales arrecifales (Scleractinia) en el Pacífico de México. *Rev. Mex. Bio.* 81, 113–121.
- Richier, S., J. M. Cottalorda, M. Guillaume, C. Fernandez, D. Allemand, & P. Furla. 2008. Depth–dependant response to light of the reef building coral, *Pocillopora verrucosa*: Implication of oxidative stress. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 357, 48–56
- Rodolfo – Metalpa, R., M. O. Hoogenboom, C. Rottier, A. Ramos – Esplá, A. Baker, M. Fine, & C. Ferrier – Pagés. 2014. Thermally tolerant corals have limited capacity to acclimatize to future warming. *Glob. Change Biol.* 20, 3036–3049
- Rodríguez–Troncoso, A. P., E. Carpizo–Ituarte, & A. L. Cupul–Magaña. 2010a. Differential response to cold and warm water conditions in *Pocillopora* colonies from the Central Mexican Pacific. *Jour. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 391, 57–64
- Rodríguez–Troncoso, A. P., E. Carpizo–Ituarte, & A. L. Cupul–Magaña. 2010b. Respuesta al incremento abrupto de la temperatura (shock térmico) en el coral *Pocillopora verrucosa* en condiciones de laboratorio. *Ciencias Marinas*. 36, 91–98
- Rodríguez–Troncoso, A. P., & A. L. Cupul–Magaña. 2013a. Efecto del blanqueamiento en la cobertura coralina del Parque Nacional Islas Marietas. 7to Congreso Mexicano & 1er Congreso Panamericano de Arrecifes Coralinos, Mérida, Yucatán. (R). 131pp.

- Rodríguez-Troncoso, A. P., E. Carpizo-Ituarte, & A. L. Cupul-Magaña. 2013b. Daño oxidativo asociado al estrés térmico en *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano. *Ciencias Marinas*. 39, 113–118
- Rodríguez-Troncoso, A. P., E. Carpizo-Ituarte, D. T. Pettay, M. E. Warner, & A. L. Cupul-Magaña. 2014. The effects of an abnormal decrease in temperature on the eastern Pacific reef-building coral *Pocillopora verrucosa*. *Mar. Biol.* 161, 131–139
- Salinas, M. & L. Bourillón. 1988. *Taxonomía, Diversidad y Distribución de los Cetáceos de la Bahía de Banderas, México*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, departamento de Biología, México, D.F.
- Sawall, Y., A. Al-Sofyani, E. Banguera-Hinestroza, & C. Voolstra. 2014. Spatio – temporal analyses of Symbiodinium physiology of the coral *Pocillopora verrucosa* along large – scale nutrient and temperature gradients in the Red Sea. *PLoS ONE*. 9(8): e103179
- Sawall, Y., A. Al-Sofyani, S. Hohn, E. Banguera-Hinestroza, C. Voolstra, & M. Wahl. 2015. Extensive phenotypic plasticity of a Red Sea coral over a strong latitudinal temperature gradient suggests limited acclimatization potential to warming. *Scientific Reports*. 5: 8940
- Spalding, M. D., & B. E. Brown. 2015. Warm-water coral reefs and climate change. *Science* 350, 769–771
- Thompson, D. M., & R. V. Woesik. 2009. Corals escape bleaching in regions that recently and historically experienced frequent thermal stress. *Proc. R. Soc. B*. 276, 2893–2901
- Towle, E. K., R. Carlton, C. Langdon, & D. P. Manzello (accepted). *In-situ* measurement of metabolic status in three coral species from the Florida reef tract. *Regional Studies in Marine Science*
- Wyrtki, K. 1976. Circulation and water masses in the eastern Equatorial Pacific Ocean. *Int. J. Oceanol. Limnol.* 1, 117–147.

- Wooldridge, S. A. 2009. A new conceptual model for the warm-water breakdown of the coral-algae endosymbiosis. *Marine and Freshwater Research*. 60, 483–496
- Yamashiro, H., H. Oku, & K. Onaga. 2005. Effect of bleaching on lipid content and composition of Okinawan coral. *Fisheries Science*. 71, 448–453

10. ANEXOS

Anexo I. Extracción de Ácidos Nucleicos: Método TRIzol

(Protocolo recomendado por el fabricante () modificado por Delgadillo–Nuño)

Extracción RNA

- ✓ Incubar el homogenizado por 5min a temperatura ambiente (TA).
- ✓ Agregar 200 µl de cloroformo.
- ✓ Homogenizar invirtiendo el tubo por 15 seg e incubar a TA de 2-3 min.
- ✓ Centrifugar a 12,000 g por 15min a 4°C.
- ✓ Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.

*Almacenar la fase orgánica a 4°C toda la noche para la posterior extracción de ADN.

- ✓ Agregar 500 µl de isopropanol e incubar a -20°C toda la noche.
- ✓ Centrifugar a 12,000 g por 15min a 4°C.
- ✓ Remover el sobrenadante.
- ✓ Lavar el pellet con etanol al 75% en agua libre de RNasas y homogenizar por 15 seg.
- ✓ Centrifugar a 7,500 g por 5 min a 4°C.
- ✓ Retirar el sobrenadante.
- ✓ Secar el pellet al aire por 5min.
- ✓ Resuspender el pellet en agua libre de RNasas (1mm: 50–100 µl, 3 mm: 150–300 µl, 5 mm 350–500 µl).
- ✓ Incubar a 60°C por 10 min. ≤

Extracción DNA

- ✓ Remover cualquier remanente acuoso.
- ✓ Agregar 300 µl de etanol al 100%.
- ✓ Homogenizar invirtiendo el tubo e incubar 3 min a TA.
- ✓ Centrifugar a 2,000 g por 5 min a 4°C y descartar el sobrenadante.
- ✓ Lavar el pellet con 1 ml de solución 0.1M citrato de sodio – etanol al 10%.

Extracción DNA (continuación)

- ✓ Incubar 30 min a TA invirtiendo el tubo ocasionalmente.
- ✓ Centrifugar a 2,000 g por 5 min a 4°C.
- ✓ Remover y descartar el sobrenadante cuidadosamente.
- ✓ Repetir el lavado del pellet (pellet > 200 µl, repetir el lavado dos veces).
- ✓ Agregar de 2 ml de etanol al 75%.
- ✓ Incubar por 20 min a TA invirtiendo el tubo ocasionalmente.
- ✓ Centrifugar a 2,000 g por 5 min a 4°C y decantar el sobrenadante.
- ✓ Secar el pellet al aire por 5-10 min.
- ✓ Resuspender el pellet en solución Buffer TE de acuerdo al peso inicial del tejido (20 mg: 100– 200 µl; 50 mg 200–400 µl; >50mg: 600 µl).
- ✓ Centrifugar a 12,000 g por 10 min a 4°C.
- ✓ Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.

Verificar la calidad de los extractos y concentración final de los ácidos nucleicos en un espectrofotómetro NanoDrop.

Anexo II. Extracción de Lípidos Totales

(Protocolo Folch et al. 1957, modificado por Rodríguez-Troncoso 2010a)

Protocolo diseñado para muestras preservadas en formalina al 10% a temperatura ambiente.

Extracción de lípidos totales

- ✓ Descalcificar el tejido con solución de ácido acético al 10% y enjuagar con agua destilada.
- ✓ Dividir el tejido según las extracciones requeridas.
- ✓ Colocar la porción de tejido en un tubo previamente pesado y etiquetado.
- ✓ Pesar el tubo para conocer el peso húmedo de la muestra.
- ✓ Incubar las muestras en estufa a una temperatura continua de 60°C durante 18 horas.
- ✓ Pesar el tubo y registrar el peso seco de la muestra.
- ✓ Agregar 1 ml de solución cloroformo: metanol (2:1).
- ✓ Macerar y dejar reposar la muestra por 5 horas.
- ✓ Agregar 333 µl de solución cloruro de potasio (KCL) al 0.8%.
- ✓ Agitar en vortex y esperar a que las fases se separen.
- ✓ Decantar la fase superior.
- ✓ Lavar el sobrenadante agregando 500 µl de solución metanol: agua (1:1).
- ✓ Descartar la fase superior y repetir una vez más el lavado.
- ✓ Filtrar la muestra y pasarla a un tubo nuevo previamente pesado y etiquetado.
- ✓ Agregar 200 µl de solución cloroformo: metanol (2:1) al papel filtro.
- ✓ Evaporar el sobrenadante en un condensador centrífugo a 45°C por 60 minutos.
- ✓ Secar el sobrenadante a 60°C por 15 horas.
- ✓ Pesar el tubo para obtener el contenido lípidos totales.