

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CICESE© 2025. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ecología Marina**

**Respuesta fisiológica en anémonas simbióticas y
aposimbióticas del género *Anthopleura*, en el intermareal
rocoso de Ensenada, Baja California.**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jesús Rodríguez Núñez

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Jesús Rodríguez Núñez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Codirector de tesis

Dr. Manuel Alejandro Delgadillo Nuño
Codirector de tesis

Dra. Clara Elizabeth Sánchez Galindo

Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera



Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Coordinador del Posgrado en Ecología Marina

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Jesús Rodríguez Núñez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ecología Marina

Respuesta fisiológica en anémonas simbióticas y aposimbióticas del género *Anthopleura*, en el intermareal rocoso de Ensenada, Baja California.

Resumen aprobado por:

Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Codirector de tesis

Dr. Manuel Alejandro Delgadillo Nuño
Codirector de tesis

Las anémonas del género *Anthopleura* mantienen una relación endosimbiótica con el dinoflagelado *Brevium muscatinei*, similar a la simbiosis coral-Symbiodiniaceae, con excepción de que las anémonas pueden subsistir sin sus endosimbiontes (aposimbiosis). Las anémonas simbióticas y aposimbióticas se ven expuestas a las mismas fluctuaciones ambientales, pero pueden presentar distintos mecanismos de respuesta fisiológica debido a la plasticidad fenotípica. Este estudio analiza dos marcas epigenéticas en *Anthopleura* sp. a lo largo de un ciclo anual, la metilación global del ADN (metilación) y el daño al ADN por estrés oxidativo (daño oxidativo), con el fin de identificar regulaciones epigenéticas relacionadas con la variabilidad estacional y el estado de la simbiosis. Para esto, en 2023-2024, se realizaron muestreos bimensuales durante la bajamar inferior en el intermareal rocoso de Ensenada, Baja California, México. Se recolectó tejido de cinco anémonas simbióticas y aposimbióticas, se cuantificó la densidad del endosimbionte y se determinó el porcentaje de metilación y daño oxidativo. Las anémonas simbióticas mostraron alta densidad endosimbionte a lo largo del año, con un incremento durante los meses con mayor temperatura y radiación solar (cálido-lumínico), mientras que las anémonas aposimbióticas mantuvieron bajas densidades durante el año, con excepción del mes más cálido-lumínico, en donde se presentó un estado de transición de aposimbiosis a simbiosis. En anémonas simbióticas, tanto la metilación como el daño oxidativo fue mayor durante los meses cálidos-lumínicos. Sin embargo, en anémonas aposimbióticas se observó un aumento en ambos marcadores cuando la luz y temperatura comenzaron a disminuir. Adicionalmente, se encontró una correlación positiva entre la metilación y el daño oxidativo ($p=0.006$, $r=0.1994$). Estos resultados reflejan los efectos de la variación ambiental estacional sobre la regulación epigenética en *Anthopleura*, posiblemente relacionados con la regulación de la simbiosis a lo largo del año. Emplear anémonas del género *Anthopleura* como modelo de estudio, resulta útil para establecer una línea base en la investigación epigenética en ecología de antozoos endosimbiontes, como los corales formadores de arrecifes, dada su importancia biológica y económica.

Palabras clave: *anémonas, simbiosis, intermareal rocoso, densidad endosimbionte, epigenética*

Abstract of the thesis presented by **Jesús Rodríguez Núñez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Marine Ecology.

Psychological response in symbiotic and aposymbiotic sea anemones of the genus *Anthopleura*, in the rocky intertidal zone of Ensenada, Baja California.

Abstract approved by:

Dr. Rafael Andrés Cabral Tena
Thesis codirector

Dr. Manuel Alejandro Delgadillo Nuño
Thesis codirector

The sea anemones of the genus *Anthopleura* have a facultative endosymbiotic relationship with the dinoflagellate *Breviolum muscatinei*, similar to symbiosis in coral-Symbiodiniaceae, with the exception that some anemones survive without their endosymbionts (aposymbiosis). The symbiotic and aposymbiotic anemone are exposed to the same environmental fluctuations. However, they can present different physiological response mechanisms due to their phenotypic plasticity. This study analyzed two epigenetic marks in *Anthopleura* sp. during an annual cycle: the global DNA methylation and DNA oxidative damage, to identify the epigenetic regulation mechanisms concerning seasonal variability and the state of symbiosis. In 2023-2024, bimonthly sampling was carried out during low tide in the rocky intertidal zone of Ensenada, Baja California, Mexico. The collected tissue of five symbiotic and aposymbiotic anemones was analyzed to determine endosymbiont density, global DNA methylation, and DNA damage. The symbiotic anemones had higher endosymbiont density during high-temperature and solar radiation months. In contrast, the aposymbiotic anemones present lower densities all over the year, except for the hottest month with high solar irradiation.. In symbiotic anemones, DNA methylation and oxidative damage were greater during the hottest and most solar-irradiated month of the year. However, in aposymbiotic anemones, an increase is observed in both epigenetic markers when the solar irradiation and the temperature begin to decrease. Additionally, a positive correlation was found between DNA methylation and oxidative damage ($p=0.006$, $r=0.1994$). These results reflected the effects of seasonal environmental variation on epigenetic regulation in *Anthopleura* sp., possibly related to the regulation of symbiosis throughout the year. Employing *Anthopleura* anemones as a study model proves helpful in establishing a baseline in ecological epigenetic research of endosymbiotic anthozoans, such as reef-building corals, given their biological role and economic importance.

Keywords: anemones, symbiosis, rocky intertidal zone, endosymbiont density, epigenetic

Dedicatoria

A cada una de las personas que me acompañaron día a día para que este trabajo llegara a este importante momento de mi vida, sin ustedes nada de esto sería posible. Y sé que en cada proyecto nuevo que me proponga, los llevaré conmigo y compartiré cada logro con ustedes. Gracias totales, María Antonieta, Elizabeth, Alejandro, Rafael.

Especial dedicatoria a las personas que trascendieron de este plano, pero los llevo dentro de mi mente y corazón.

Mi abuelo, Elfego Castillo y Hugo Alberto los extraño tanto y valoro todos los consejos de vida. Sé que donde se encuentren me guiarán en el camino correcto.

Montserrat (Mon), sé que un día nos volveremos a encontrar... y saldaremos esa comida pendiente.

*“Al final del viaje está el horizonte
Al final del viaje partiremos de nuevo
Al final del viaje comienza un camino”*

*Y si pudiera escuchar
Una última voz
Sería la de mi madre diciéndome:
<<Hijo siempre fuiste el mejor>>*

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al posgrado de Ecología Marina por brindarme la oportunidad de desarrollarme en lo académico y profesional, así como el apoyo suficiente y brindarme las herramientas necesarias para realizar este proyecto de investigación de tesis.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por otorgarme el apoyo económico para sustentar mis estudios de posgrado en Ensenada, Baja California (CVU:1191187).

El agradecimiento más sincero a mis directores de tesis, Dr. Rafael Andrés Cabral Tena y Dr. Manuel Alejandro Delgadillo Nuño, a quienes no solo admiro por ser mis mentores en este camino de crecimiento profesional, sino también por su paciencia, su dedicación a la vocación, su vasto conocimiento y sobre todo, por brindarme su amistad e impulsarme a superarme frente toda adversidad.

A mi comité de tesis Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez y el Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera, quienes me acompañaron en cada avance, siempre estando al pendiente de mis dudas. Así como agradecer el apoyo con su espacio de laboratorio, facilitándome las herramientas necesarias para poder desarrollar este proyecto de tesis.

A la persona a quien mi agradecimiento es invaluable, M. en C. Elizabeth Borbón Fuentes, simplemente gracias por estar en este lado del camino aun cuando las peores olas nos arrastran, siempre buscamos regresar al sendero para salir adelante. Gracias por no soltarme y ser ese apoyo incondicional de pareja, aprendiendo a ser adultos chiquitos.

Mi generación de posgrado fue rara, pero mi agradecimiento es infinito a los “Taquitos Perrones”. Elizabeth, Alejandra, Paola, Carolina y Cresar, cuando piensas que la amistad es utópica cada uno de ustedes rompió cada esquema dejando momentos inolvidables y con esa seguridad de que siempre la amistad es amigo, gracias por su luz.

Agradezco al equipo del Laboratorio de Genómica Funcional: Dra. Edna Sánchez, Román, Alexis, Sadot, Maye, Roberto, Paulina, Evelin, Claudia, Giselle, Alexa, Edson y demás compañeros por todo su apoyo,

asesoramiento y experiencia en buenas prácticas de laboratorio, así como su amistad y el compañerismo para alentar en cada paso, hicieron que me sintiera parte de un grupo unido de laboratorio.

Mi madre María Antonieta Núñez, agradecido siempre por todo tu amor incondicional, aun a la distancia siempre estar pendiente de mí y apoyarme en cada meta profesional. Gracias por ser la madre ejemplar de lucha y de criar, con todo tu afecto, a un hombre de bien.

A mis hermanos Sandra, Lidia, Ricardo, Tomas y mis sobrinos, mi familia porque siempre estuvieron pendientes de mí a la distancia de muchos kilómetros y siempre estuvieron ahí cuando más lo necesitaba para poder salir adelante en esta vida adulto independiente.

Agradecimiento a mi mentor de licenciatura, Dr. Justo Salvador, gracias por creer siempre en mí y apoyarme en mi desarrollo profesional.

Agradecimiento a mis amistades desde la preparatoria, universidad, compañeros de trabajos y todas esas personas que cruzaron en mi camino me dejaron valiosos momentos los cuales guardo y atesoro.

Y la lista sigue... Pero siempre habrá un momento personal para agradecer todo ese gran afecto que me ayudó a forjarme y a crecer de forma personal y profesional.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas.....	xi
Capítulo 1 Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.1.1 Simbiosis cnidarios-dinoflagelados	3
1.1.2 Intermareal rocoso del Pacífico nororiental	5
1.1.3 Especies de <i>Anthopleura</i> del intermareal rocoso de Ensenada, BC, Méx.....	6
1.1.4 Respuesta fisiológica en anémonas <i>Anthopleura</i>	7
1.1.5 Densidad simbionte en <i>Anthopleura</i>	10
1.1.6 Daño al ADN por estrés oxidativo en anémonas	11
1.1.7 Metilación del ADN en corales y anémonas	14
1.2 Justificación	16
1.3 Hipótesis	16
1.4 Objetivos	16
1.4.1 Objetivo general.....	16
1.4.2 Objetivos específicos.....	17
Capítulo 2. Metodología	18
2.1 Área de estudio.....	18
2.1.1 Bahía todos Santos, Baja California.....	18
2.1.2 Playa Tres Emes.....	18

2.2 Trabajo en campo	19
2.3 Trabajo en laboratorio	21
2.3.1 Lavado y homogeneización de tejido.....	21
2.3.2 Separación del tejido de anémona y células simbioses	21
2.3.3 Cuantificación de simbioses	22
2.3.4 Extracción de ADN.....	22
2.3.5 Cuantificación de la metilación global del ADN	23
2.3.6 Cuantificación del daño oxidativo (8-OHdG) del ADN	24
2.4 Trabajo de gabinete.....	25
Capítulo 3. Resultados	26
3.1 Caracterización ambiental temperatura y radiación lumínica	26
3.2 Densidad de simbioses	26
3.3 Análisis cuantitativo de la metilación global de ADN en anémonas	29
3.4 Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN en anémonas	31
3.5 Relación entre densidad endosimbionte e indicadores epigenéticos	33
Capítulo 4. Discusión	36
4.1 Primer registro de aposimbiosis en <i>Anthopleura</i> sp. en Baja California	36
4.2 Variabilidad estacional de la endosimbiosis en <i>Anthopleura</i> sp.	37
4.3 Metilación global del ADN	40
4.4 Daño al ADN por estrés oxidativo.....	44
Capítulo 5. Conclusiones	48
Literatura citada	50
Anexos	68

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1. Mapa del área de estudio, el recuadro rojo muestra la ubicación de Bahía de Todos Santos, al Norte del Pacífico Mexicano. El círculo azul muestra la ubicación del intermareal rocoso de Playa Tres Emes; entre Playa San Miguel y el Puerto pesquero de El Sauzal, al norte de Ensenada, B.C., México.....	19
Figura 2. Identificación visual de anémonas del género <i>Anthopleura</i> en pozas de marea formadas en el intermareal rocoso, la imagen muestra las diferencias de coloración. A) Anémona simbiótica, se caracteriza por presentar una coloración verde brillante en tentáculos; B) Anémona aposimbiótica, se caracteriza por presentar una coloración blanca en tentáculos; C) Anémona en estado de transición de aposimbiosis a simbiosis, fotografiada en el mes de agosto, que se caracteriza por presentar palidez y coloración morada en tentáculos.....	20
Figura 3. Variación temporal de la temperatura del agua (°C) y radiación lumínica (w/m ²) en el intermareal rocoso de la Playa Tres Emes, en Ensenada, Baja California.....	26
Figura 4. Densidad endosimbionte en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género <i>Anthopleura</i> entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la temperatura de la superficie del mar.....	27
Figura 5. Densidad endosimbionte en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género <i>Anthopleura</i> entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la radiación solar.	28
Figura 6. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN (5-mC%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género <i>Anthopleura</i> entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la temperatura de la superficie del mar.	30
Figura 7. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN (5-mC%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género <i>Anthopleura</i> entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la radiación solar.....	31
Figura 8. Análisis cuantitativo del daño al ADN (8-OHdG%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género <i>Anthopleura</i> entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la temperatura de la superficie del mar.....	32
Figura 9. Análisis cuantitativo del daño al ADN (8-OHdG%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y de transición del género <i>Anthopleura</i> entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la radiación solar.	33
Figura 10. Análisis de regresión lineal entre la metilación del ADN 5-mC% y el daño al ADN 8-OHdG%, con pendiente y su coeficiente de determinación.....	34
Figura 11. Análisis de regresión lineal entre la metilación del ADN 5-mC% y la densidad simbiote cel/mg, con pendiente y su coeficiente de determinación.....	34

Figura 12. Análisis de regresión lineal entre el daño al ADN 8-OHdG% y la densidad simbiote cel/mg, con pendiente y su coeficiente de determinación..... 35

Figura 13. Cantidad de fragmentos de ADN por gel de electroforesis. El carril 1 corresponde al marcador molecular QuickLoad 1 kb. En los carriles 3 – 7 se muestra fragmento de ADN en anémonas aposimbióticas. Los carriles 9 – 13 se muestra fragmento de ADN en anémonas simbióticas. La electroforesis se realizó a 80 volts por 40 min..... 69

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Caracteres diagnósticos en las especies de <i>Anthopleura</i> de Baja California, después de Barragan et al., (2019), Daly, (2004), Daly et al., (2017), J. D. Espinoza, (2023), Hand, (1955), Rudy et al., (2013), Sebens, (1984), Smith y Potts, (1987), Vassallo-Avalos, et al., (2020, 2020b, 2024).	8
Tabla 2. Densidad simbiote. Se incluyen los datos promedios de todos los meses procesados para las anémonas simbióticas, aposimbióticas y en estado de transición (agosto).....	27
Tabla 3. Prueba estadística post-hoc Dunn test, de la comparación de la densidad endosimbionte en anémonas simbióticas (s), aposimbióticas (a) y en transición (t) entre los meses de muestreo. Los valores que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) están marcados en negritas y señaladas con un *.	29
Tabla 4. Correlación de Pearson entre los indicadores de metilación global del ADN (5-mC%), el daño al ADN (8-OHdG%) y la densidad endosimbionte en anémonas del género <i>Anthopleura</i> . Las correlaciones se estimaron con una ($p < 0.05$), con un nivel de confianza del 95%. Número de pares de datos analizados (36) y el valor de la correlación (r).....	33
Tabla 5. Información complementaria de datos biológicos obtenidos en laboratorio: Metilación ADN, Daño al ADN densidad simbiote y parámetros físicos del intermareal.	68

Capítulo 1 Introducción

La zona del intermareal rocoso es una franja costera que se ve cubierta por agua durante la marea más alta y expuesta por la marea más baja. El intermareal rocoso es un ecosistema con una alta diversidad y productividad y de gran importancia para la regulación y estructura de las poblaciones y comunidades costeras (M. E. Johnson, 2024). Desempeña un papel crucial al proveer de espacios adecuados para el asentamiento y reclutamiento de diversos invertebrados marinos, además de ofrecer refugio a una amplia variedad de organismos bentónicos adultos y las fases larvarias planctónicas de numerosas especies (L. Ladah et al., 2005). Los organismos del intermareal rocoso presentan adaptaciones notables ante la alta heterogeneidad ambiental del ecosistema (Gómez-Gutiérrez y Guerra-Rivas, 2010; Sanders y Palumbi, 2011), que se caracteriza por variaciones extremas en la radiación solar, temperatura, salinidad, exposición al oleaje y una compleja estructura de interacciones bióticas como la competencia por espacio y depredación (Cornwell y Hernández, 2021; Dayton, 1971; Paine y Levin, 1981; Sebens y DeRiemer, 1977; Verde y McCloskey, 1996). Sin embargo, el equilibrio ecosistémico del intermareal rocoso se encuentra amenazado por diversas actividades antropogénicas, como la sobre explotación, la introducción de especies invasoras y el aporte de contaminantes (Mieszkowska et al., 2021; Schiel et al., 2004). Estas actividades, combinadas con problemas a mayor escala como eventos estacionales extremos y el cambio climático, generan alteraciones ambientales y ecológicas importantes (Mieszkowska et al., 2021).

Las anémonas marinas del género *Anthopleura* son habitantes frecuentes en las comunidades del intermareal rocoso y, particularmente en la costa del Pacífico nororiental, tienen una distribución amplia desde Alaska hasta Baja California Sur (Bingham et al., 2011; Cornwell y Hernández, 2021; Daly et al., 2017). La capacidad de las anémonas para acumular contaminantes como microplásticos y metales pesados, así como sus respuestas fisiológicas a los factores ambientales, proporcionan información valiosa sobre el estado de los ecosistemas marinos (Aksun Tümerkan, 2023; Kalsom y Mehman, 2020). Particularmente, el estado de la simbiosis entre ciertas especies de anémonas con dinoflagelados fotosintéticos de la familia Symbiodiniaceae puede reflejar cambios ambientales (Davy et al., 2012; T. C. LaJeunesse et al., 2018). Un ejemplo de esto es la relación mutualista entre las anémonas de mar del género *Antopleura* (Duchassaing de Fonbressin y Michelotti, 1860) con el dinoflagelado *Brevolium muscatinei* (*sensu* LaJeunesse et al., 2018), anteriormente clasificada como *Symbiodinium*, e identificada mediante el biomarcador ITS2 type B4 (LaJeunesse y Trench, 2000), la cual se ve influenciada por factores como el estrés térmico, la condición de marea y los aportes de agua dulce (Hossfeld et al., 2020; Ruggeri et al., 2024).

Una característica importante en las especies del género *Anthopleura* es la capacidad facultativa de su relación simbiótica, ya que en condiciones de poca luz, al encontrarse oculta en cavidades de grietas o cuevas de rocas, el número de células del simbiote disminuye significativamente (Muscantine, 1961; V. B. Pearse, 1974b), por lo que estos organismos pueden controlar su entorno lumínico y cumplir su funciones metabólicas sin la necesidad de albergar grandes densidades de simbiote (aposimbiosis), lo que da como resultado un fenotipo blanco debido a la ausencia de pigmentos fotosintéticos en sus tejidos (Dimond et al., 2013; Suggett et al., 2008). Por otro lado, para *Anthopleura*, la estabilidad de la endosimbiosis con sus dinoflagelados proporciona una ventaja metabólica dada la cantidad de carbono fijado por la actividad fotosintética, que puede representar hasta el 95% de la energía traslocada al hospedero (Koch et al., 2020; Leggat et al., 2002). Sin embargo, albergar simbioses conlleva el costo metabólico de la respuesta al estrés oxidativo, tanto enzimática como no enzimática (Asada, 2006; Cubillos et al., 2015, 2023; Lesser, 2006; McGinty et al., 2012), para hacer frente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), que producen daño celular en lípidos, proteínas, membranas y en el ADN (Cubillos et al., 2015, 2023; McGinty et al., 2012).

Tanto las anémonas simbióticas como las aposimbióticas, se encuentran expuestas, de manera natural, a los cambios físicos en la franja del intermareal rocoso, como lo son los períodos sucesivos de inmersión, desecación y exposición solar por efecto de las mareas (Bingham et al., 2011). De tal forma, las anémonas están sometidas a diversos factores de estrés fisiológico debido a los cambios constantes y extremos de las condiciones ambientales (Schiel et al., 2004). Por lo tanto, su capacidad de tolerar el estrés determina la distribución de esta especie y las relaciones simbióticas de sus fenotipos simbiótico y aposimbiótico, a lo largo del gradiente de zonación en el intermareal rocoso (Menge y Branch G. M., 2001). Por esta razón, las especies de *Anthopleura* han desarrollado respuestas fisiológicas que les permiten tolerar dichas fluctuaciones (Cubillos et al., 2015), a través de distintas respuestas biológicas compensatorias ante los cambios ambientales de corto plazo, que les proporciona una alta capacidad de aclimatación que puede dar lugar a características evolutivas heredables (adaptación) a largo plazo (Ghalambor et al., 2015).

Uno de los mecanismos que actúa en la regulación de las respuestas fisiológicas es la plasticidad fenotípica, es decir, en la capacidad de los organismos para modificar o alterar su fenotipo en respuesta a los cambios ambientales (Hochachka y Somero, 2002). La plasticidad fenotípica está mediada por factores epigenéticos, como la metilación del ADN, los ARN no codificantes (como los miARNs) y de las proteínas asociadas al ADN (histonas), en la cual, estas marcas de metilación en el ADN pueden ser heredables pero sin alterar la secuencia de nucleótidos del ADN (Castel y Martienssen, 2013; Li et al., 2018). Estas marcas epigenéticas son clave en la plasticidad fenotípica y permiten que, a partir del mismo material genético,

se produzcan múltiples cambios en la cromatina (Feil y Fraga, 2012; Greer y Shi, 2012) y en la metilación del ADN y ARN (Bird, 2002; Feil y Fraga, 2012), siendo la metilación del ADN el mecanismo epigenético más estudiado en cnidarios simbios (Putnam et al., 2016).

Considerando todos los aspectos previos, en este estudio se realizó un análisis comparativo de la respuesta fisiológica entre anémonas simbióticas y aposimbióticas del género *Anthopleura*, ante la variabilidad ambiental estacional, y ésta se correlacionó con las marcas epigenéticas. Particularmente, se evaluaron los cambios en la densidad de simbios, el porcentaje de metilación global del ADN y daño al ADN por estrés oxidativo en relación con la variación de la temperatura del mar y la irradiancia solar a lo largo de un ciclo anual (enero 2023 a enero 2024). Este enfoque permite comprender cómo los estados de simbios facultativa (simbios y aposimbios) influyen en la respuesta al estrés ambiental, lo que tiene una relevancia ecológica y evolutiva significativa, para estas y otras especies de cnidarios simbios como los corales formadores de arrecifes. Además, ayudará a comprender cómo los cnidarios simbios responden a las condiciones cambiantes de su entorno y mantienen la plasticidad fenotípica. Este conocimiento novedoso es crucial para entender su capacidad de aclimatación, supervivencia y distribución dentro de los ecosistemas marinos en los que habitan.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Simbios cnidarios-dinoflagelados

En estudios ecológicos, se ha identificado una gran complejidad en los procesos de simbios entre dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae con anémonas y corales (Casado-Amezúa et al., 2016; Jacobovitz et al., 2023; T. C. LaJeunesse et al., 2018; Nitschke et al., 2022). Entre estos, el intercambio de nutrientes, un entorno celular protegido y las respuestas a factores ambientales que permiten la prosperidad de estos invertebrados en los ecosistemas marinos (Cunning et al., 2015; Hoadley et al., 2021; Marzoni et al., 2024; Wong et al., 2021). La simbiosis Cnidaria-Symbiodiniaceae está influenciada por su diversidad genética, dinámicas ecológicas e interacciones biológicas (Cunning et al., 2018; Davies et al., 2023; Howe-Kerr et al., 2020; Howells, 2011). Estos procesos favorecen la supervivencia del cnidario y optimizan la eficiencia energética, a través de la fotosíntesis (Mohammad Aslam et al., 2023; Roberty et al., 2014), por medio de la cual los dinoflagelados reutilizan y reciclan los nutrientes inorgánicos y suministran el carbono orgánico necesario al hospedero (Casado-Amezúa et al., 2016; Huang et al., 2024;

Ros et al., 2020), contribuyendo al equilibrio metabólico del holobionte (cnidario, simbioses y microbiota). Sin embargo, los cambios en las condiciones ambientales, principalmente de luz y temperatura, pueden afectar la salud y el rendimiento del holobionte (Meyer y Weis, 2012; Stat et al., 2008; Technau et al., 2005).

Los dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae presentan diversas respuestas al estrés ambiental, térmico y lumínico, que implican cambios bioquímicos y fisiológicos (Iglesias-Prieto et al., 1992; Lesser, 2019; Rosic et al., 2024). Estudios en el Indo Pacífico encontraron una dominancia de *Cladocopium sp.* (anteriormente clado C) en corales sanos, mientras que en eventos de blanqueamiento estos fueron desplazados temporalmente por *Durussdinium* (clado D) (Berkelmans & van Oppen, 2006; Stat & Gates, 2011), los cuales presentan una mayor resistencia y resiliencia al calor debido a la duplicación del genoma completo (Dougan et al., 2022; Hoadley et al., 2016). Por lo tanto, desde una perspectiva de la biología celular, los estudios de la simbiosis Cnidaria-Symbiodiniaceae que emplean modelos de estudio y desarrollan técnicas moleculares permiten comprender cómo ésta simbiosis responde funcionalmente a los cambios en las condiciones ambientales, así como su capacidad de adaptación y aclimatación en el ecosistema (Denis et al., 2024; Jacobovitz et al., 2023; Lesser, 2019; Nitschke et al., 2022; Scharfenstein et al., 2023).

Particularmente, las anémonas simbióticas de diferentes regiones templadas y tropicales son excelentes organismos modelo de la simbiosis Cnidaria-Symbiodiniaceae (Bucher et al., 2016; Tortorelli et al., 2020). Además, son fáciles de manipular en entornos de laboratorio (Dungan et al., 2020; Weis, 2008). Un ejemplo que destacar son las anémonas del género *Anthopleura*, que, durante su ciclo de vida, cuando la anémona se reproduce sexualmente forma gametos y larvas carentes de dinoflagelados simbióticos, es durante su desarrollo que los organismos tienen la capacidad de hospedar de forma facultativa a sus simbioses (Weis et al., 2005), la simbiosis comienza durante la alimentación en las fases larvales (A. E. Bates et al., 2010; Bingham et al., 2014; Schwarz et al., 2002; Weis et al., 2005).

Desde los primeros estudios en la cuantificación de la expresión génica y proteica en anémonas *Anthopleura* (Weis y Levine, 1996), hasta las primeras investigaciones en las ciencias ómicas (Meyer y Weis, 2012), las especies de *Anthopleura* han proporcionado conocimientos sobre los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la simbiosis y la respuesta a factores de estrés como la temperatura, intensidad de la luz y estrés oxidativo (Chen et al., 2016; Mihirogi et al., 2023; Rådecker et al., 2018; Thornhill et al., 2013; Xiang et al., 2020). Por ejemplo, entre las características que comparten las anémonas *Anthopleura*, distribuidas en el Pacífico nororiental, es su asociación con el dinoflagelado

Breviolum muscatinei (anteriormente *Symbiodinium* Clado B), por lo que, los estudios recientes han demostrado que las distintas poblaciones de *Anthopleura* muestran tasas altas de flujo génico, lo que limita su adaptación local, salvo sus límites sur de su distribución y su simbionte *Breviolum muscatinei* exhiben fuerte estructura genética lo que sugiere una mayor capacidad de adaptación local especialmente en ambientes extremos como la temperatura y la radiación solar y su ubicación en la zona del intermareal (Cornwell et al., 2022; Cornwell & Hernández, 2021).

1.1.2 Intermareal rocoso del Pacífico nororiental

El intermareal rocoso del Pacífico Norte Oriental abarca varias regiones a lo largo de la costa occidental de Norteamérica incluyendo Canadá, E.E.U.U y México, particularmente desde Alaska hasta Baja California Sur, el cual se caracteriza por una elevada biodiversidad, complejidad estructural y heterogeneidad ambiental que afectan la distribución y zonación de las especies de peces, invertebrados y organismos autótrofos (Blanchette et al., 2008; Dayton, 1971). Además, existe una similitud significativa de especies presentes en estas áreas, correlacionada con los factores ambientales como la exposición al oleaje, niveles de marea, tasas de sedimentación y surgencias (Cruz-Motta et al., 2010), incluso considerando las distancias geográficas extensas que separan estas regiones (Blanchette et al., 2008).

Debido a la alta complejidad estructural y heterogeneidad ambiental, las comunidades de invertebrados marinos que habitaban en el intermareal rocoso presentan un equilibrio ecológico delicado regido por la competencia por el espacio disponible, la presión ejercida por la depredación y la aclimatación influenciada por las variables ambientales como el oleaje, mareas, sedimentación, temperatura, luz (Dayton, 1971; Blanchette et al., 2008) y además, la estructura y complejidad del ecosistema se ven seriamente afectados por las actividades antropogénicas locales y el cambio climático global, que generan variaciones significativas en la calidad de agua y un aumento en la temperatura el nivel del agua, dando como resultado cambios en la diversidad y distribución de las especies del intermareal (Kaplanis, 2023; Kaplanis et al., 2024).

En este contexto, por su alta complejidad esta tesis aborda la dinámica del intermareal rocoso del Pacífico Norte Oriental mediante el estudio de anémonas del género *Anthopleura* en estado simbiótico y aposimbiótico. Estos organismos actúan como bioindicadores del estado ambiental del intermareal y permiten analizar su relación con factores físicos, como la temperatura y la radiación solar, los cuales presentan variaciones a lo largo del año.

1.1.3 Especies de *Anthopleura* del intermareal rocoso de Ensenada, BC, Méx.

A lo largo de los hábitats del intermareal rocoso en el Pacífico nororiental, se ha estudiado la filogenia de Actiniidae Rafinesque, 1815, la Familia más grande conocida de anémonas de mar (Cnidaria: Anthozoa: Actinaria), que contiene más de 43 géneros y 200 especies (Carlgren, 1949). Particularmente, el género *Anthopleura* Duchassaing (Duchassaing de Fonbressin y Michelotti, 1860), que actualmente cuenta con 47 especies conocidas (Daly y Fautin, 2019), alberga algunas de las especies de anémonas de mar más estudiadas gracias a su diversidad, abundancia y distribución (Daly, 2004), ya que constituyen gran parte de las comunidades del intermareal rocoso y se pueden encontrar comúnmente tanto en hábitats templados como tropicales (Daly et al., 2017; Spano y Häussermann, 2017). Además, muestran características ecológicas y biológicas relevantes, como lo son sus respuestas fisiológicas al estrés térmico y lumínico, así como estrategias nutricionales que combinan depredación oportunista y simbiosis facultativa con dinoflagelados fotosintéticos Symbiodiniaceae (Ayala-Summano et al., 2017; Fitt et al., 1982).

A pesar del conocimiento extenso del género *Anthopleura* y la cantidad de estudios que utilizan a sus especies para comprender fenómenos ecológicos o biológicos, la diversidad y filogenia de este grupo apenas comienza a ser comprendida (Daly et al. 2017). Dentro de los primeros estudios filogenéticos, Smith y Potts, (1987) emplearon datos de electroforesis de enzimas (alozimas) para describir la presencia de tres especies coexistentes distribuidas en zona del intermareal del Pacífico nororiental: *A. elegantissima* Brandt, (1835), *A. xanthogrammica* Brandt, (1835) y *A. artemisia* Dana, (1846). Particularmente, *A. elegantissima* presenta la facultad de formar grupos clonales y formas solitarias con diferencias en reproducción (tanto sexual como asexual), frecuencia, distribución biogeográfica y microhábitat (Fitt et al., 1982; Francis, 1979; Hand, 1955). Lo que ocasionó un debate acerca de si las dos formas clonales y solitarias representan taxones aislados reproductivamente y, por lo tanto, constituyen dos especies distintas (Francis, 1979; McFadden et al., 1997; Smith y Potts, 1987). Un análisis filogenético posterior de alozimas determinó que la forma clonal conserva el binomio *A. elegantissima*, mientras que la forma solitaria se describe y se denomina como *Anthopleura sola* (Pearse y Francis, 2000). Estos resultados fueron confirmados utilizando genes mitocondriales 16S rDNA y citocromo oxidasa subunidad III (Geller y Walton, 2001).

En el caso de las especies *A. xanthogrammica* y *A. artemisia*, estas presentan distancias genéticas mayores entre sí y con respecto a sus congéneres *A. elegantissima* y *A. sola* (Smith y Potts, 1987; McFadden et al., 1997). Aunque las formas más grandes de *A. sola* a menudo se han confundido con *A. xanthogrammica*,

debido a su similitud en tamaño, morfología y hábitat (Smith y Potts, 1987). Además, recientemente se ha descrito la presencia de otros miembros del género *Anthopleura* en la costa del Pacífico nororiental, particularmente en México (Daly, 2004), como lo son: *Anthopleura dowii* Verrill, (1869), *A. radians* Spano y Häussermann, (2017), *A. mariae* sp. nov. Vassallo-Avalos et al., (2020) y *A. variata* sp. nov. Vassallo-Avalos et al., (2024). Lo que sugiere que las áreas de distribución de las especies de *Anthopleura* del Pacífico occidental pueden extenderse hacia el norte y superponer su distribución con los límites septentrionales de las especies del Pacífico nororiental (Carlgren, 1951). Entre estos registros, los de *A. dowii* y *A. variata* sp. nov., fueron documentados utilizando marcadores moleculares mitocondriales (ADNr 12S, ADNr 16S y COIII) y ribosomales (ADNr 18S, ADNr 28S); para la zona del intermareal de Ensenada, Baja California (Ayala-Summano et al., 2017) y la zona del intermareal de Cerritos, Baja California Sur (Vassallo-Avalos, et al. 2024). Mientras que los registros de *A. radians* y *A. mariae* sp. nov., respectivamente, en Punta Eugenia, Baja California Sur y Punta Morro, Baja California se realizaron únicamente a partir de la descripción de caracteres morfológicos e histológicos (Vassallo-Avalos, Acuña, et al., 2020; Vassallo-Avalos, González-Muñoz, et al., 2020b) y, por lo tanto, no figuran dentro de la filogenia molecular de *Anthopleura* (Daly et al., 2017; Vassallo-Avalos et al., 2024).

En términos biogeográficos del Pacífico Norte, los resultados de Daly et al. (2017), sugieren que hay al menos dos eventos de colonización de las especies de *Anthopleura* en el Pacífico nororiental y que estas abarcan dos grupos principales: un clado que incluye las especies: *A. dowii*, *A. elegantissima* y *A. sola*, (incluida *A. variata*, ver: Vassallo-Avalos, et al. 2024) y otro clado que incluye a *A. xanthogrammica* y *A. artemisia*. Las especies generalmente están asociadas entre sí en todos los análisis, aunque no corresponden a grupos hermanos y las inferencias sobre ellos son provisionales (Daly et al., 2017). En la Tabla 1 se resumen las diferencias en morfología, hábito simbiótico y reproducción de las seis especies de *Anthopleura* con distribución potencial en la zona del intermareal rocoso de Ensenada, Baja California, México. No obstante, muchas de las inconsistencias taxonómicas y filogenéticas en *Anthopleura* se derivan de problemas con la documentación e interpretación de sus características anatómicas (Daly et al., 2017).

1.1.4 Respuesta fisiológica en anémonas *Anthopleura*

Las anémonas de mar del género *Anthopleura* presentan una notable plasticidad en sus respuestas fisiológicas y conductuales aparentemente asociada con las relaciones simbióticas que establecen con endosimbiontes fotosintéticos: Symbiodiniaceae o Chlorophyta (Carlton, 2023; Hiebert et al., 2015).

Tabla 1. Caracteres diagnósticos en las especies de *Anthopleura* de Baja California, después de Barragan et al., (2019), Daly, (2004), Daly et al., (2017), J. D. Espinoza, (2023), Hand, (1955), Rudy et al., (2013), Sebens, (1984), Smith y Potts, (1987), Vassallo-Avalos, et al., (2020, 2020b, 2024)

Especie	Coloración	Tamaño (mm)	# Ciclos de tentáculos	Simbiontes	Reproducción asexual
<i>A. artemisia</i>	Columna negra, gris o marrón. Disco oral rojo, marrón, gris o negro. Tentáculos rojos, blancos, naranjas, negros o azules.	60-70	5	Ausentes	Fisión longitudinal
<i>A. dowii</i>	Columna oliva o pardusca. Disco oral verde, naranja o rosa alrededor de la boca, con líneas naranja, marrón, gris o violeta. Tentáculos gris, violeta o naranja con manchas anaranjadas	25–50 alto	5–6	Sin información	Fisión longitudinal
<i>A. elegantissima</i>	Columna verde oscuro a brillante. Disco oral verde, verde oscuro u oliva con un tinte gris o azul y líneas verde oscuro a rojo o marrón rojizo. Tentáculos grises oscuro a azulado o azul medio, verde o lavanda, con puntas rosadas o lavanda y puntos o bandas blancas.	8-42	5–6	Presentes	Fisión longitudinal
<i>A. mariae sp. nov.</i>	Columna verde parduzco, grisáceo o oliva con manchas rojas.	3–16 diam. 4–20 alto	4–5	Presentes	Sin evidencia
<i>A. sola</i>	Columna verdosa. Disco oral verde, verde oscuro u oliva con un tinte gris o azul. Tentáculos gris, oscuro, azul, verde o lavanda, puntas rosadas o lavanda con puntos o bandas blancas.	40	5–6	Presentes	Ausente
<i>A. xanthogrammica</i>	Columna verde o marrón verdoso oscuro a pálido. Disco oral verde, verde oscuro o azul verdoso, azul, gris azulado o gris. Tentáculos generalmente de un solo color verdoso, azulado o blanco,	60 -120	6	Presentes	Ausente

Cuando estas especies albergan endosimbiontes, subsisten como fotoautótrofas en condiciones óptimas de luz (Dimond et al., 2013; Suggett et al., 2012). Pero, cuando es necesario, son heterótrofas y se alimentan enteramente de presas y detritos (Bergschneider y Muller-parker, 2008; Hiebert y Bingham,

2012). En consecuencia, estas anémonas exhiben una alta plasticidad fenotípica relacionada tanto a su simbiosis como a factores genéticos y ambientales. Por ejemplo, los fenotipos de color varían entre y dentro de las especies de *Anthopleura* (Manchenko et al., 2000; Pearse y Francis, 2000), de acuerdo con la abundancia y la composición de sus simbioses (Bates, 2000; Bates et al., 2010), en adición a polimorfismos genéticos de coloración (Clarke et al., 2024) y factores de estrés (Staats et al., 2024). Por lo tanto, su función ecológica está determinada por esta variabilidad genética, fisiológica y ambiental (Saunders y Muller-Parker, 1997).

La plasticidad fenotípica en anémonas y particularmente en las de este estudio del género *Anthopleura* depende principalmente de las condiciones de radiación lumínica a las que se ven expuestas y su interacción con las variables relacionadas al cambio de marea e intercambio de agua dulce, como lo son, la temperatura, salinidad, pH y al consumo y producción de oxígeno y CO₂ (Dimond et al., 2017; Dykens y Shick, 1984; Shick y Dykens, 1984; Towanda y Thuesen, 2012; E. A. Verde y McCloskey, 2007; E. Verde y McCloskey, 2002; Woodhouse, 2014). Los experimentos de Pearse, (1974b), (1974a), demostraron una relación positiva en la fototaxis de anémonas con dinoflagelados simbioses en periodos de baja intensidad lumínica, en los que el organismo se mueve y expande sus tentáculos hacia la fuente de luz, y de fototaxis negativa en altas intensidades de luz, donde la anémona busca refugio y contrae sus tentáculos. Por otro lado, Pearse (1974a, 1974b), no encontró diferencias significativas en la fototaxis de las anémonas que carecían de simbioses, incluso en aquellas que previamente los habían albergado, aunque estas si se expandían y contraían con los cambios de luz como una posible respuesta condicionada. De igual modo, los estudios de Saunders y Muller-Parker, (1997), demostraron que existe un cambio en la densidad de células simbioses en *A. elegantissima* aumentando bajo condiciones de baja luz, mientras que no se ve afectada de forma significativa por la temperatura. Esto sugiere que la disponibilidad de luz es un factor clave en la regulación de su densidad dentro del hospedador.

La plasticidad en la relación simbiótica no solo influye en el comportamiento y la fisiología de *Anthopleura*, sino que también tiene implicaciones fundamentales para su metabolismo energético. Uno de los principales resultados de la relación simbiótica entre *Anthopleura elegantissima* y el dinoflagelado *Breviolum muscatinei*, es la transferencia directa de carbono fotosintético desde el simbiote hacia el hospedero (Engelbreton y Muller-Parker, 1999). Se ha estimado que entre el 60% al 99% del carbono fijado por la fotosíntesis (fotosintato) es transferido al hospedero, quien lo utiliza para en procesos metabólicos, de crecimiento y reproducción (Coffroth y Santos, 2005; Muscatine L. et al., 1984). La transferencia de fotosintetatos es facilitada por la enzima anhidrasa carbónica, cuya actividad es significativamente mayor en individuos simbióticos en comparación con los aposimbióticos (Leggat et al.,

2002; Weis y Reynolds, 1999). Además del carbono, los dinoflagelados simbioses transfieren otros productos como glicerol, lípidos y algunos aminoácidos que contribuyen al metabolismo del hospedero (Battey y Patton, 1984; Kellogg y Patton, 1983; Muscatine L. et al., 1994). Debido a su alta densidad poblacional en los tejidos del hospedero, estos simbioses se consideran los principales productores primarios en el ecosistema del intermareal rocoso (Muscatine, 1980), y desempeñan un papel crucial en los ciclos biogeoquímicos, particularmente en los procesos de remineralización y transformación de energía, similar al de las algas bentónicas y de vida libre (Barnes y Chalker, 1990; Muscatine y Weis, 1992).

Recientemente, el aumento en las temperaturas en los océanos, ha impulsado numerosos estudios en los cnidarios para describir el impacto que tiene el estrés térmico en organismos simbióticos y aposimbióticos. Se ha propuesto que la presencia de organismos fotosintéticos, como las microalgas, en condiciones de mayor temperatura y radiación lumínica, incrementa el estrés oxidativo en los cloroplastos, lo que provoca daño al fotosistema II (PSII), lo que generaría mayor producción en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lesser, 1997, 2006; Venn et al., 2008).

1.1.5 Densidad simbiote en *Anthopleura*

Los estudios de Saunders y Muller-Parker (1997), demostraron que existe un cambio en la densidad de simbioses en *A. elegantissima* en respuesta a los cambios de temperatura y luz y, por lo tanto, su función ecológica está determinada por la variabilidad ambiental. De igual modo, la plasticidad fenotípica en las anémonas depende principalmente de las condiciones de intensidad de luz a las que se vea expuesta. Los experimentos de Pearse, (1974), demostraron una relación positiva entre las anémonas con dinoflagelados simbioses en periodos de baja intensidad de luz y de forma negativa con altas intensidades de luz, en donde la anémona busca refugio. Por otro lado, Pearse (1974), no encontró diferencias significativas en el comportamiento de las anémonas que carecían de simbioses en relación con la intensidad de luz.

Los cnidarios albergan una amplia diversidad de simbioses pertenecientes a la familia *Symbiodinaceae*, cuya especificidad y densidad está influenciada por variables ambientales como la temperatura y la radiación lumínica, permitiendo la capacidad de adaptación y tolerancia a los cambios ambientales, además de que la mayoría de los huéspedes albergan un único tipo dominante de simbiote (LaJeunesse, 2002). En anémonas de mar del género *Anthopleura*, las poblaciones alojadas en el tejido pueden alcanzar densidades de varios millones o más por centímetro cuadrado de tejido del hospedero (Muscatine y Porter, 1977).

Los dinoflagelados del género *breviolum* son organismos que se han descrito como genéticamente diversos y ecológicamente exitosos en diferentes regiones tropicales (Goulet et al., 2008), así como en aguas templadas del Pacífico oriental, donde forma asociaciones simbióticas con cnidarios (Rodríguez-Lanetty et al., 2001) como las anémonas de mar.

En los estudios de Verde y McCloskey, (2001); Verde y McCloskey, (2002), realizaron comparaciones de fotosíntesis, respiración, y balance de carbono de *A. elegantissima*, con simbiontes de dinoflagelados y algas verdes en condiciones controladas. Verde y McCloskey (2001), estudiaron el efecto de la temperatura y demostraron que una temperatura elevada aumenta la fotosíntesis del simbiote, lo que se traduce en mayor traslocación de carbono fijado de forma significativa en simbiontes de dinoflagelados y, por otro lado Verde y McCloskey (2002) realizaron estudios sobre el efecto de la luz a temperatura constante, lo que demostró que la fotosíntesis se relaciona con la intensidad de luz para ambos simbiontes, con una tasa fotosintética mayor para dinoflagelados simbiontes.

Se han descrito pocos estudios sobre la dinámica estacional de la densidad simbiote en anémonas del género *Anthopleura* a lo largo de su distribución del intermareal del Pacífico nororiental. Uno de los trabajos que aborda este tema en la densidad simbiote es el de Verde y McCloskey, (2007), quienes reportaron que existe una variabilidad estacional en la densidad de simbiontes a lo largo de un periodo de muestreo, donde la densidad simbiote fue más alta durante el verano hasta principios del invierno (temporada cálida), y bajas durante la primavera y principios de verano (temporada baja), estas densidades se compararon con relación a los parámetros ambientales de temperatura del agua, intensidad de luz y duración de luz, así como parámetros fisiológicos y metabólicos como fotosíntesis, traslocación de carbono y respiración de la anémona. Por otro lado, con el trabajo de (Dimond et al., 2011), a pesar de que no encontraron diferencias significativas, se observó una tendencia en el aumento de la densidad simbiote en los meses de julio y noviembre en comparación con febrero y abril, a pesar de la variación estacional de factores como la temperatura y la radiación solar.

1.1.6 Daño al ADN por estrés oxidativo en anémonas

Las especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) son moléculas que se forman cuando el oxígeno molecular (O_2) se excita a oxígeno singlete (1O_2) por la absorción de energía (por ejemplo, de la luz), o cuando el O_2 es reducido por transferencias secuenciales de electrones para formar radicales superóxido ($\bullet O_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y, en presencia de hierro (Fe^{2+}), el H_2O_2 puede ser

reducido a radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), altamente reactivo (Asada et al., 1974, 1987). En sistemas biológicos, las ROS son subproductos que surgen de forma normal a partir de reacciones involucradas en el metabolismo aeróbico de los organismos, como la fotosíntesis y respiración (Asada, 1987), y que están implicados en rutas de señalización para controlar procesos como la muerte celular programada (apoptosis), respuestas al estrés, defensa contra patógenos y señalización sistémica (Mittler, 2002). De acuerdo con Polle, (2001), en condiciones normales, la producción de ROS en las células es baja ($240 \mu\text{M s}^{-1} \bullet\text{O}_2^-$) y su nivel es estable en los cloroplastos ($0.5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$). Mientras que muchos factores de estrés ambiental, que alteran la homeostasis celular, aumentan la producción de ROS ($720 \mu\text{M s}^{-1} \bullet\text{O}_2^-$) a niveles sostenidos ($5\text{--}15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$). Estos factores de estrés incluyen choques térmicos (por frío o calor), alta irradiancia, radiación ultravioleta, desecación, cambios de salinidad, presencia de metales pesados y otros contaminantes, privación de nutrientes, daño físico y ataque de patógenos (Dat et al., 2000).

Durante los episodios de estrés ambiental, los altos niveles de ROS son capaces de ocasionar daño citotóxico y genotóxico por estrés oxidativo a las células (Cadet et al., 1997; Cooke et al., 2003; Skrypnik y Maslova, 2007), causando oxidación y alteración irreversibles en los ácidos nucleicos (ADN y RNA). En el ADN, se produce modificaciones en las bases, como la formación de 8-oxoguanina, genera errores y mutaciones, además de ruptura en cadenas y enlaces que dificultan la replicación y la transcripción. En el ARN el daño incluye la oxidación y fragmentación de moléculas, afecta la producción de proteínas. Además, ocurre peroxidación lipídica de ácidos grasos poliinsaturados (como los fosfolípidos de la membrana celular) y oxidación de enzimas y otras proteínas (Davalli et al., 2018; Hawkins y Davies, 2019; Ito et al., 2019; Yan y Zaher, 2019), impidiendo que tanto la célula como el organismo completo realicen sus funciones normales (Andrés Juan et al., 2021). Particularmente, los daños por estrés oxidativo al ADN implican oxidación de las bases nitrogenadas, roturas mono- y bicatenarias, y enlaces cruzados entre moléculas ADN-proteína (Beckman y Ames, 1997; Dizdaroglu, 1991; Epe, 1995; Wiweman y Halliwell, 1996). Sin embargo, la inducción del daño por estrés oxidativo ocurre cuando se presenta un desequilibrio entre la producción de ROS y los sistemas de defensa antioxidante, que incluyen, las enzimas superóxido dismutasa (Zn-Cu SOD, SOD1, Mn-SOD y SOD2), que reducen el $\bullet\text{O}_2^-$ en H_2O_2 , y las enzimas catalasa, glutatión peroxidasas y tioredoxina reductasa que convierten los niveles de H_2O_2 en H_2O y O_2 (Juan et al., 2021; Wen y Garg, 2018).

El estrés oxidativo en las anémonas de mar, especialmente en aquellas que albergan microalgas simbióticas, es un factor clave en el daño del ADN (Nii y Muscatine, 1997; Skrypnik y Maslova, 2007). Debido principalmente a la producción de ROS durante la respiración animal y la fotosíntesis de las microalgas, especialmente bajo las condiciones de estrés ambiental más comunes en sus hábitats como

altas temperaturas o luz intensa (Richier et al., 2005, 2006; Rideb et al., 2022). El aumento de la luz altera el aparato fotosintético de las microalgas ocasionando hiperoxia y una acumulación de electrones que reaccionan con las moléculas de oxígeno en los cloroplastos, formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) e hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), además, el aumento de la temperatura incrementa la tasa metabólica y respiratoria de las anémonas lo que contribuye a la producción de ROS en las mitocondrias (Asada, 2006; McGinty et al., 2012; Merle et al., 2007). Para neutralizar el aumento de ROS durante la fotosíntesis de las microalgas y reducir el daño al ADN por estrés oxidativo, las anémonas simbióticas muestran una mayor actividad y diversidad de isoformas de enzimas antioxidantes, como la SOD y catalasa, en comparación con especies no simbióticas o aposimbióticas (Richier et al., 2005).

En el estudio de Dykens y Shick, (1982), por ejemplo, se observó que las anémonas simbióticas de *Anthopleura elegantissima* tuvieron una mayor producción de oxígeno en niveles altos de luz, lo que produjo un alto contenido de clorofila y una mayor actividad de la enzima SOD, en comparación con las anémonas *A. elegantissima* aposimbióticas. Las cuales presentaron una menor actividad de SOD y un bajo contenido de clorofila. Estas diferencias se atribuyen a las adaptaciones en las células huésped de las anémonas simbióticas para neutralizar el exceso de ROS y soportar el estrés oxidativo durante la fotosíntesis de las microalgas simbios, reduciendo así el daño celular de las anémonas simbios en condiciones de hiperoxia mientras que las anémonas no simbióticas (o aposimbióticas) muestran mayor daño y menor actividad de la SOD (Coffroth y Santos, 2005; Cubillos et al., 2015; Richier et al., 2006; Weis y Levine, 1996). Otras adaptaciones en anémonas simbios incluyen la producción de proteínas fluorescentes que ayudan en el anclaje de los simbios al citoesqueleto de las células endodérmicas (Banaszak y Trench, 1995). La actividad de la anhidrasa carbónica en la hidratación reversible del dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O), en ácido carbónico (H_2CO_3) y sus iones dissociativos (HCO_3^- y H^+), necesaria para la fijación del carbono fotosintético (Koch et al., 2020). Además de la producción de compuestos fotoprotectores, como los aminoácidos similares a micosporinas (MAAs) que absorben la radiación ultravioleta (UVR) y los pigmentos accesorios (clorofila b y c, ficobilinas y carotenoides) que presentan una actividad antioxidante (no enzimática) que también permite neutralizar los altos niveles de ROS (Weis y Levine, 1996).

Las ventajas adaptativas de las anémonas simbióticas para responder al estrés oxidativo y ser menos vulnerables al daño oxidativo del ADN, resalta los beneficios evolutivos de la simbiosis en condiciones de estrés ambiental, particularmente por estrés térmico y lumínico (Richier et al., 2005; Rideb et al., 2022). No obstante, el grado de protección antioxidante puede variar según las condiciones ambientales y los tipos específicos de simbios involucrados (Coffroth & Santos, 2005; Cubillos et al., 2015; Richier et al.,

2008; Weis & Levine, 1996). Además, cuando las defensas antioxidantes se ven superadas, son insuficientes o inhibidas, las ROS pueden aumentar y dañar la estructura y funcionalidad del ADN y de otros componentes celulares (como lípidos y proteínas) provocando muerte celular (Nii y Muscatine, 1997; Skrypnyk y Maslova, 2007). Entender este proceso es fundamental para comprender y predecir la vulnerabilidad de las anémonas de mar y los corales formadores de arrecifes ante el cambio climático y otros desafíos ambientales.

1.1.7 Metilación del ADN en corales y anémonas

La metilación global del ADN es un mecanismo epigenético en el cual, los grupos metilo (CH_3) se añaden a una de las cuatro bases nitrogenadas del carbono (5-metilcitosina) en gran parte de los sitios CpG, estos sitios son regiones específicas donde una citosina está seguida de una guanina, unidas por un enlace fosfodiéster y se encuentran dispersas a lo largo del genoma (Li et al., 2018). Las investigaciones de este proceso bioquímico muestran que, las modificaciones en las regiones del ADN las cuales interactúan con las proteínas implicadas en su empaquetamiento y regulación transcripcional se llevan a cabo sin cambiar la secuencia de nucleótidos (Bird, 2002; Putnam et al., 2016).

Los trabajos de (Li et al., 2018) mostraron que la metilación del ADN cumple funciones importantes en muchos procesos biológicos durante el desarrollo de plantas y animales. Además, se encontró que actúa como mecanismo de regulación fenotípica en organismos adultos, el cual es sensible al medio ambiente y proporciona una vía de plasticidad fenotípica que permite una rápida aclimatación a las condiciones cambiantes del entorno (Li et al., 2018; Rando y Verstrepén, 2007). Esta aclimatación fenotípica puede favorecer la adaptación genética de las especies ante condiciones ambientales cambiantes asegurando su transmisión celular, esto ocurre a través de la replicación celular, donde la ADN metiltransferasa de mantenimiento (DNMT1) copia los patrones de metilación en la nueva hebra de ADN durante la división celular, por lo que garantizará la conservación de las características fenotípicas de la progenie (Putnam et al., 2016). Otro mecanismo de herencia es la inducción ambiental de la metilación del ADN, mediada por la actividad de ADN metiltransferasas de novo (DNMT3), dando paso a que estas enzimas inicien modificaciones en respuesta a las señales en el entorno, permitiendo que la memoria epigenética influya en la plasticidad fenotípica y bajo ciertos casos se transmita a futuras generaciones (Feil y Fraga, 2012; Okano et al., 1999).

Además, la herencia transgeneracional de estas modificaciones puede ocurrir si la metilación se mantiene en la línea germinal, aunque en muchos organismos los patrones de metilación se restablecen durante la gametogénesis, en algunos casos persisten y son heredados por la descendencia afectando su fenotipo sin alterar su secuencia de ADN (Rando y Verstrepen, 2007)

El grupo de invertebrados marinos más estudiado en los mecanismos epigenéticos son las ostras del Pacífico de la especie *Magallana* (previamente *Crassostrea*) *gigas*, probablemente por su importancia económica (Hofmann, 2017). Además, otras investigaciones se han llevado a cabo en el pulpo *Octopus vulgaris* y en poliquetos marinos (Hofmann, 2017). Por otro lado, de los trabajos medulares de esta tesis se encuentran trabajos en corales realizado por Putnam et al. (2016), examinaron el impacto en la acidificación oceánica en los corales, a través de la metilación del ADN en dos especies, *Pocillopora damicornis*, mostró una mayor plasticidad fenotípica y mayor respuesta en la metilación del ADN bajo condiciones de bajo pH y por el contrario, la especie más resistente *Montipora capitata*, mostró una aclimatización más rápida con cambios mínimos en la calcificación, los perfiles metabólicos y la metilación del ADN. Otro estudio que analizó la metilación del ADN en el contexto de la simbiosis en cnidarios fue el realizado por Li et al. (2018), utilizando como modelo la anémona de mar *Aiptasia* y al dinoflagelado de la familia Symbiodiniaceae, donde comparó patrones genómicos de metilación del ADN, la modificación de histonas y perfil de expresión génica en anémona de estado simbiótico y aposimbiótico, en el cual demostraron que la metilación regula la expresión génica como parte de un mecanismo epigenético en función a su estado simbiótico. De los estudios más recientes que se realizaron para describir los mecanismos de metilación del ADN y la relación simbiótica entre la anémona de mar *Anthopleura elegantissima* y su simbionte algal, la clorofita *Elliptochloris marina* y estado aposimbiótico está el trabajo de Dimond et al., (2021), quienes utilizaron secuenciación de nanopore y encontraron que no existió diferencia entre los perfiles de metilación en anémonas simbióticas y aposimbióticas, probablemente debido a varios factores como la cobertura de secuenciación, a que el simbionte tiene menor impacto nutricional o por el diseño experimental.

Estos estudios previos y la propuesta en este estudio de organismos modelo como las anémonas del género *Anthopleura* aportan una base importante para poder comprender los mecanismos epigenéticos en antozoos endosimbiontes como los corales formadores de arrecife, por su importancia ecológica frente a los cambios ambientales como el cambio climático.

1.2 Justificación

Existe evidencia de que la metilación del ADN influye en la expresión de genes a través de silenciamiento de elementos transcripcionales y la regulación celular en el desarrollo de plantas y animales, además de que estos procesos están influenciados por los factores ambientales (Feil y Fraga, 2012; Okano et al., 1999). No obstante, se han realizado pocos estudios de los procesos epigenéticos relacionados con la ecología de invertebrados marinos, en especial de cnidarios (Dixon et al., 2016; Putnam et al., 2016). Por lo anterior, las anémonas de mar del género *Anthopleura* podrían ser un excelente modelo de estudio epigenético en cnidarios dada su abundancia e importancia en el intermareal rocoso. Además, la simbiosis facultativa que establece con el dinoflagelado *B. muscatinei* representa una oportunidad única para evaluar el efecto de la simbiosis y la vida libre de simbiosis (aposimbiosis) en la epigenética y plasticidad fisiológica en respuesta a las diferentes presiones ambientales y de cambio climático. Lo cual podría depender de la interacción entre los mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, la presencia o ausencia de dinoflagelados fotosintéticos y los niveles de daño al ADN por estrés oxidativo.

1.3 Hipótesis

Las anémonas del género *Anthopleura* tienen diversos mecanismos de respuesta fisiológica al estrés ambiental, que dependen del estado de la simbiosis, el daño en el ADN causado por estrés oxidativo y la metilación diferencial del ADN entre los genomas de anémonas simbióticas y aposimbióticas. Por lo tanto, las anémonas simbióticas tendrán una mayor metilación del ADN relacionada con mayores niveles de daño por estrés oxidativo en comparación con las anémonas aposimbióticas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Analizar las diferencias en la respuesta fisiológica entre anémonas simbióticas y aposimbióticas del género *Anthopleura*, sujetas a la variabilidad ambiental estacional, con la finalidad de comprender el efecto de la simbiosis frente al daño por estrés oxidativo y su influencia en la metilación del ADN.

1.4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar la variación de la densidad de simbioses en anémonas simbióticas y aposimbióticas a lo largo de un año.
- Evaluar los cambios en el porcentaje de metilación global del ADN entre las anémonas simbióticas y aposimbióticas a lo largo de un año.
- Evaluar el daño al ADN por especies reactivas de oxígeno (ROS) en las anémonas simbióticas y aposimbióticas a través del año.
- Comparar la respuesta fisiológica en anémonas simbióticas y aposimbióticas a través del año.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Área de estudio

2.1.1 Bahía todos Santos, Baja California.

La Bahía Todos Santos está ubicada en el noroeste de Baja California, dentro del sistema de la corriente de California, es una bahía de afloramiento, que al ser impulsado por la circulación del viento a lo largo de la costa actúa como trampa de aguas frías y ricas en nutrientes que suben a la superficie, y se encuentra delimitada por dos elevaciones, San Miguel al norte y Punta Banda al sur (Largier, 2020). El sistema cuenta con una estratificación debido a diferencias de temperaturas entre la capa superficial y subsuperficial, además de ser un lugar ideal para el reclutamiento larval de diferentes organismos bentónicos y cercanos a la costa (Espinoza et al., 1991).

2.1.2 Playa Tres Emes

El estudio se realizó en la zona del intermareal rocoso de la Playa Tres Emes, ubicado en la Bahía de Todos Santos al norte de la costa de Ensenada, Baja California, México, con coordenadas 31° 89' N y 116° 71' O (Fig. 1). La zona del intermareal de Tres Emes está compuesta morfológicamente por un acantilado formado por terrazas de roca ígnea, playa arenosa y por sustrato rocoso formado por cantos volcánicos y basálticos, su topografía es irregular y se forman pozas intermareales intermitentes durante los periodos de marea baja (García-Pamanes y Chee-Barragán, 1976).

Dentro de la zona intermareal se pueden observar, de acuerdo con la temporada, especies de sargazo *Egria menziessii* y *Macrocystis pyrifera*, también algas verdes del género *Ulva* spp. y pastos marinos del género *Phyllospadix* spp. (Aguilar-Rosas et al., 2005; Ladah et al., 2012). Además, la zona del intermareal también cuenta con una gran comunidad de invertebrados marinos entre los que destacan los mejillones de la especie *Mytilus californianus*, estrellas de mar del género *Pisaster* spp., el erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus*, el cangrejo de roca rayado *Pachygrapsus crassipes* y una variedad de balanos *Balanus glandula*, *Pollicipes polymerus*, *Tetraclita* spp. y *Chthamalus* spp. (Ladah et al., 2005), y las

dos especies de anémonas de interés: *Anthopleura elegantissima* y *A. sola*, además de su congénere *A. xanthogrammica*.

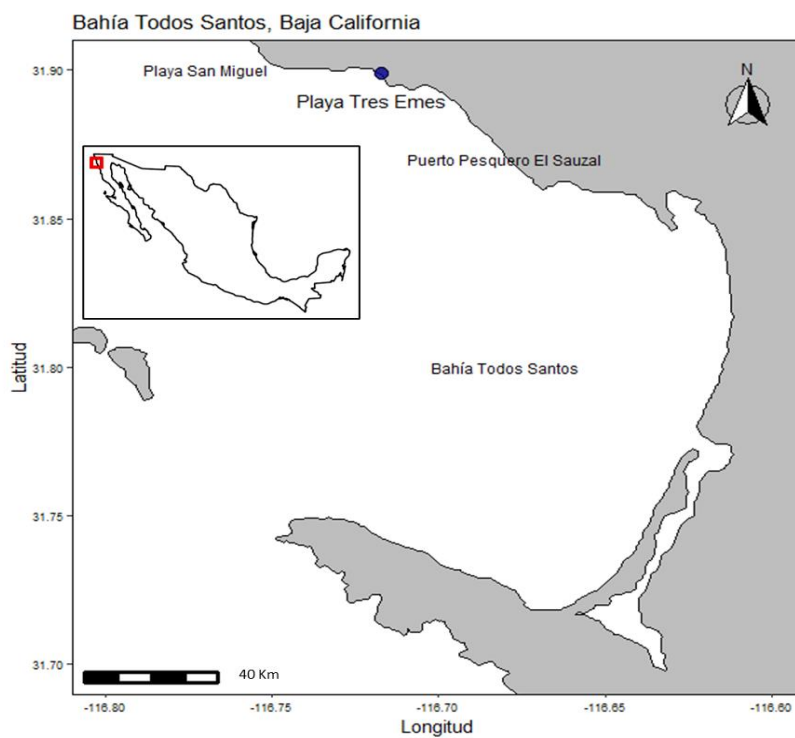


Figura 1. Mapa del área de estudio, el recuadro rojo muestra la ubicación de Bahía de Todos Santos, al Norte del Pacífico Mexicano. El círculo azul muestra la ubicación del intermareal rocoso de Playa Tres Emes; entre Playa San Miguel y el Puerto pesquero de El Sauzal, al norte de Ensenada, B.C., México.

2.2 Trabajo en campo

Desde abril de 2023 y hasta febrero de 2024, se realizaron muestreos bimensuales en la zona del intermareal rocoso de Playa Tres Emes durante un ciclo anual, desde. Los muestreos se realizaron durante las mareas más bajas (bajamar inferior), utilizando los calendarios de mareas de CICESE (predmar.cicese.mx) para la estación de El Sauzal B.C., se determinaron las fechas de muestreo de acuerdo con los ciclos lunares y mareas vivas (González et al., 2006). Al llegar al punto de muestreo se registró la fecha y hora de muestreo. Posteriormente, se realizó la búsqueda e identificación de anémonas en cada poza intermareal.

Se identificaron las especies de acuerdo con las descripciones de los patrones de coloración, tamaño y características ecológicas realizadas por diversos autores (Barragan et al., 2019; Daly, 2004; Daly et al., 2017; Hand, 1955; Vassallo-Avalos, Acuña, et al., 2020; Vassallo-Avalos et al., 2024; Vassallo-Avalos,

González-Muñoz, et al., 2020b), aunque estas especies pueden presentar variaciones en coloración y morfología, lo que dificulta su identificación, la especie con mayor probabilidad de ser recolectada fue *A. sola* (Cornwell et al., 2022; Cornwell y Hernández, 2021). Sin embargo, debido a las similitudes morfológicas entre anémonas del género *Anthopleura* existe la posibilidad de haber recolectado especímenes de tamaños y coloraciones similares, pero de especies distintas p. ej., *A. elegantissima* o *A. mariae* (Daly et al. 2017; Vassallo-Avalos et al. 2022). Mientras que otras especies que si bien presentan una distribución potencial en la región de Baja California, México, se distinguen por ser de mayor tamaño (*A. xanthogrammica*) o de rasgos ecológicos distintos (*A. artemisa* y *A. dowii*) y, por lo tanto, tienen una menor probabilidad de haber sido recolectadas.

La condición simbiótica de los organismos recolectados se determinó de forma visual, para anémonas simbióticas por su color verde, marrón o iridiscente y en el caso de las anémonas aposimbióticas de coloración blanca (Figura 2), todas las anémonas recolectadas fueron registradas fotográficamente. Se recolectó el tejido tentacular de cinco anémonas simbióticas y aposimbióticas (10 anémonas en total), se recolectaron de 3 a 6 tentáculos con ayuda de tijeras y pinzas de disección estériles. Inmediatamente después, las muestras de tejido fueron almacenadas en microtubos de 1.5 mL con 1 mL de solución RNAlater para estabilizar los tejidos y preservar los ácidos nucleicos (ADN y ARN), proteínas y células endosimbiontes. Todas las muestras se recolectaron por duplicado para obtener un total de 20 muestras por organismo. Posteriormente, las muestras fueron mantenidas a 4°C y trasladadas al Laboratorio de Genómica Funcional en CICESE donde fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento en laboratorio.



Figura 2. Identificación visual de anémonas del género *Anthopleura* en pozas de marea formadas en el intermareal rocoso, la imagen muestra las diferencias de coloración. A) Anémona simbiótica, se caracteriza por presentar una coloración verde brillante en tentáculos; B) Anémona aposimbiótica, se caracteriza por presentar una coloración blanca en tentáculos; C) Anémona en estado de transición de aposimbiosis a simbiosis, fotografiada en el mes de agosto, que se caracteriza por presentar palidez y coloración morada en tentáculos.

2.3 Trabajo en laboratorio

2.3.1 Lavado y homogeneización de tejido

La homogeneización y separación del tejido de anémona se llevó a cabo mediante una modificación de (Hawkins y Warner, 2017). Las muestras de anémonas se descongelaron y se mantuvieron a una temperatura de 4°C en cada paso, desde el lavado del tejido hasta homogeneización y separación de simbioses, cada una de las muestras se tomó tejido y se pesó en una balanza analítica en mg marca (OHAUS®, PIONEER™), de 10 – 40 mg de los tentáculos preservados en RNAlater, se colocaron en un microtubo de 2 mL (Simport Scientific Inc.) y se realizaron lavados con 0.5 ml de solución de Fosfato salino Tamponado (PBS 3X, pH 7.4) tres veces dejando actuar 15 min, con la finalidad de retirar el exceso de RNAlater. Posteriormente, se añadieron 0.5 mL de Buffer de lisis (Tris 25 mM, pH 7.8, EDTA 1 mM, glicerol al 10% [v/v]) actuando por 15 min se añadió 1 mL de Buffer de lisis para proceder a la homogeneización con perlas de vidrio (0.4 mm) en un batidor de cuentas (FastPrep-24™ 5G, marca MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) durante 60 segundos a una velocidad de 6 m s⁻¹

2.3.2 Separación del tejido de anémona y células simbioses

Del homogeneizado resultante, se procedió a separar la epidermis de la anémona con ayuda de unas pinzas de disección estériles y se almacenó en un microtubo de 1.5 mL a -20°C para su procesamiento en la extracción de ADN.

La separación del tejido de la gastrodermis de la anémona y los simbioses se realizó por centrifugación, colocando las muestras homogeneizadas en una centrífuga marca (Eppendorf® Microcentrifuge, 5424 R) a 3 000 x *g* por 30 seg. a -4°C, el sobrenadante resultante se tomó una alícuota de 100 µL y se colocó en un vial de Eppendorf de 1.5 mL. Posteriormente el mismo procedimiento se realizó dos veces de centrifugación a 700 x *g* por 10 min a -4°C y el sobrenadante resultante se transfirió al vial para finalmente almacenarlo a -20°C. Finalmente, las células simbioses se centrifugaron a 16 000 x *g* por 20 min a -4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se fija en formaldehído al 2% para su cuantificación por microscopía (ver ANEXO A).

2.3.3 Cuantificación de simbioses

El conteo de las células simbioses se realizó con un microscopio óptico marca (ZEISS) y un hematocitómetro que contiene una cámara de recuento con superficie cuadrículada. Antes de realizar el conteo, se realizaron diluciones de 1:10 con agua de mar filtrada en las muestras con alta densidad simbiótica en anémonas simbióticas. En el caso de las anémonas aposimbióticas, las células simbioses se contabilizaron sin diluir. Posteriormente, se realizaron los conteos de cada muestra de anémona simbiótica y aposimbiótica. Para ello, se colocó una gota en el hematocitómetro y se observó a microscopio con un aumento de 40x. La cámara cuenta con nueve zonas cuadradas; el conteo se realizó en los cuatro cuadros de las esquinas, cada una con su repetición. Los datos se registraron en una hoja de cálculo, donde se calculó el promedio de los conteos y se multiplicó por el factor del hematocitómetro y el factor de dilución en las muestras diluidas. El conteo de células se expresó en Cel/mg y, por último, se realizaron los análisis estadísticos correspondientes.

2.3.4 Extracción de ADN

La extracción del ADN se llevó a cabo siguiendo las modificaciones de (Lajeunesse et al., 2003) para Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Se utilizó la epidermis separada de cada anémona y se añadió 300 μL de solución de lisis nuclear posteriormente, la muestra se homogeneizó mediante vortex, después del lisado se incubó agregando 0.05 mg mL^{-1} (8.75 μL) de proteinasa K durante 3 horas a 65 °C. Posteriormente, para la precipitación de proteínas se añadieron 150 μL de Solución de proteínas, se mezcló en Vortex y se incubó en hielo durante 20 minutos, después de la incubación se centrifugó a 15 000 x g durante 5 minutos. Para la precipitación de ADN rehidratado, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio con 350 μL de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 15 000 x g durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadió 150 μL de etanol al 70% a temperatura ambiente y mezcló, se centrifugó a 15 000 x g durante 5 minutos (Mismo procedimiento se realizó dos veces). Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet al aire durante 15 minutos. Se rehidrató el ADN en 25 μL de agua milli Q se dejó reposando durante la noche a 4°C (Ver ANEXO B).

La cuantificación y pureza de los ácidos nucleicos se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) evaluando su absorbancia a 260nm (A260) y su nivel de pureza en la relación 260/280 (>1.8) y 260/230 (>1.8). Posteriormente la integridad del ADN se determinó mediante un gel de

agarosa al 1% por electroforesis y finalmente se observó en un sistema de documentación transiluminador de luz ultravioleta (UV) Bio-Rad.

Se seleccionaron las muestras de extracción de ADN cuyas características cumplieran con una buena cantidad de ADN y pureza, así como aquellas que se visualizaron con una óptima integridad de su ADN para proceder a realizar diluciones en las muestras.

2.3.5 Cuantificación de la metilación global del ADN

La cuantificación global de grupos metilo se midió mediante el uso del kit Methylflash™ Methylated 5mC DNA Quantification kit (Colorimetric), siguiendo las especificaciones del fabricante. La sensibilidad del kit permite identificar un rango de 20 ng a 200 ng de ADN. Por lo tanto, la técnica se basó en la captura de anticuerpos específicos de 5-metil-citosina y posteriormente cuantificados de manera colorimétrica en el ensayo de una placa ELISA y posteriormente obteniendo las lecturas mediante un lector de placas Multiskan GO (Thermo Scientific) a 450 nm. Las lecturas obtenidas con la densidad óptica (DO) fueron normalizadas a 200 ng de ADN, en la cual se representaron por cada mes muestreado tres organismos de anémonas simbióticas y tres anémonas aposimbióticas y cada una de las muestras biológicas con duplicado. Posteriormente, para obtener el porcentaje de cada valor del ADN metilado se generó una curva estándar con los valores obtenidos en la DO un control negativo (CN) y de controles positivos (CP) a diferentes concentraciones, la pendiente se obtuvo mediante una regresión lineal utilizando el software Microsoft Excel. Finalmente, se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de ADN metilado (5-hmC%) de cada una de las muestras de ADN y su duplicado con la siguiente fórmula:

$$5 - hmC\% = \frac{Muestra\ DO - CN\ DO}{P \times S} \times 100\% \quad (1)$$

Donde:

Muestra DO: absorbancia de la muestra obtenida en el lector de placas

CN DO: absorbancia del control negativo

P: pendiente

S: Concentración de ADN de la muestra (200ng)

2.3.6 Cuantificación del daño oxidativo (8-OHdG) del ADN

La cuantificación del daño oxidativo del ADN 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) se realizó con el kit EpiQuik™ 8-OHdG DNA Damage Quantification Direct Kit Colorimetric (Epigentek), siguiendo las indicaciones y especificaciones del fabricante. La técnica consistió en que cada muestra de ADN se une a los pocillos para detectar el porcentaje absoluto de 8-OHdG en el ADN de cada muestra usando anticuerpos de captura y detención. Posteriormente, cuando la señal es amplificada en la DO se cuantifica por colorimetría mediante un lector de placas Multiskan GO (Thermo Science) a 450 nm. Las lecturas obtenidas con la densidad óptica (DO) fueron normalizadas a 300ng de ADN, en la cual se representaron por cada mes muestreado tres organismos de anémonas simbióticas y tres anémonas aposimbióticas y cada una de las muestras biológicas con duplicado. Posteriormente, para obtener el porcentaje de cada valor absoluto del daño oxidativo 8-OHdG del ADN se generó una curva estándar con los valores obtenidos en la DO un control negativo (CN) y de controles positivos (CP) a diferentes concentraciones, la pendiente se obtuvo mediante una regresión lineal utilizando el software Microsoft Excel. Posteriormente, se calculó el porcentaje absoluto del daño oxidativo 8-OHdG del ADN usando las siguientes fórmulas:

$$8 - OHdG(ng) = \frac{Muestra\ DO - CNDO}{P}$$

(2)

Donde:

Muestra DO: absorbancia de la muestra obtenida en el lector de placas

CN DO: Absorbancia del control negativo

P: pendiente

$$8 - OHdG\% = \frac{8 - OHdG(ng)}{S} \times 100\%$$

(3)

Donde:

S: concentración de la muestra (300ng)

2.4 Trabajo de gabinete

Se obtuvieron los datos de temperatura promedio en el sitio de muestreo a partir de los registros de la temperatura superficial del mar, proporcionados por la Red Mareográfica en la estación de El Sauzal del Centro de investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) (<http://redmar.cicese.mx/emmc/DATA/ENSB/MIN/>). Los datos de radiación solar en el sitio de muestreo se obtuvieron solicitando al M.C. Ismael Velázquez del Laboratorio de Pronóstico Meteorológico de (CICESE). Se graficaron los promedios de la temperatura y radiación solar para analizar posible tendencia entre la metilación del ADN y los parámetros físicos.

Con los datos obtenidos, se realizaron análisis estadísticos de los componentes biológicos de la densidad simbiote, metilación del ADN y daño al ADN, así como de los parámetros físicos de temperatura y radiación solar, utilizando el software estadístico R (R Core Team, 2017). Se evaluaron los supuestos de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilks y de homocedasticidad con la prueba de Bartlett. En el caso de la densidad simbiote realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con el fin de determinar si existían diferencias estadísticamente significativas en los meses de muestreo entre anémonas simbióticas y anémonas aposimbióticas. Asimismo, se realizó el análisis con los datos obtenidos en la metilación y daño al ADN realizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y una prueba post-hoc de coeficiente de correlación de Pearson para evaluar si existe una relación lineal entre las variables cuantitativas.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Caracterización ambiental temperatura y radiación lumínica

La temperatura de la superficie del mar más baja se presentó en abril con 13.48 °C, posteriormente la temperatura fue incrementando durante los siguientes meses donde se registró la temperatura más alta en el mes de agosto con 23.73 °C, en los meses posteriores la temperatura comenzó a descender hasta el registro en febrero del 2024 con 16.36 °C (Figura 3).

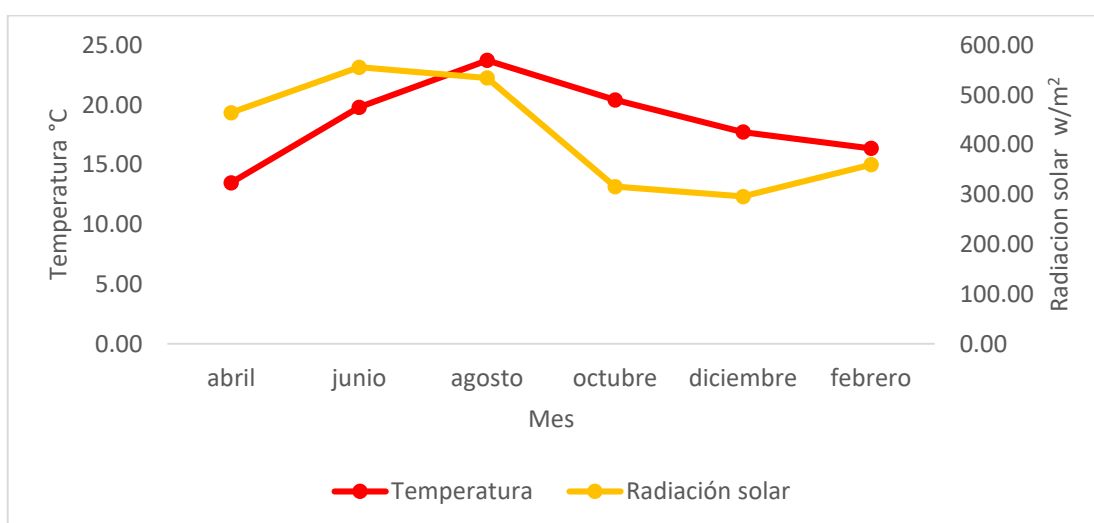


Figura 3. Variación temporal de la temperatura del agua (°C) y radiación lumínica (w/m²) en el intermareal rocoso de la Playa Tres Emes, en Ensenada, Baja California.

En el caso de la radiación solar, se puede observar en la (Figura 3), que en el mes de abril la radiación es de 464.47 w/m^2 , posteriormente el mes con mayor radiación fue junio con 555.69 w/m^2 , para los siguientes meses, la radiación comenzó a descender hasta diciembre con 296.16 w/m^2 y, para el último mes de muestreo mostró un ligero incremento de 360.05 w/m^2 .

3.2 Densidad de simbioses

Se encontraron diferencias en la densidad de simbioses a lo largo del año con relación a su estado simbiótico y aposimbiótico. En el caso de las anémonas simbióticas en los meses de estudio se encontró

que tienen una alta densidad de $4.09 \times 10^4 \pm 1.63 \times 10^4$ cél.mg⁻¹ y en el caso de las anémonas aposimbióticas $7.44 \times 10^3 \pm 1.63 \times 10^4$ cél.mg⁻¹ observando una menor densidad simbiote (Tabla 2).

Tabla 2. Densidad simbiote. Se incluyen los datos promedios de todos los meses procesados para las anémonas simbióticas, aposimbióticas y en estado de transición (agosto).

Densidad simbiote cél.mg ⁻¹	
Anémonas simbióticas	$4.09 \times 10^4 \pm 1.63 \times 10^4$
Anémonas aposimbióticas	$1.40 \times 10^3 \pm 3.08 \times 10^3$
Estado de transición	$3.77 \times 10^4 \pm 2.36 \times 10^4$

Las mayores densidades de simbiotes en anémonas simbióticas, se encontraron entre abril con $5.74 \times 10^4 \pm 8.92 \times 10^3$ cél.mg⁻¹ y agosto con $5.14 \times 10^4 \pm 9.20 \times 10^3$ cél.mg⁻¹. Después se observó un descenso ligero en diciembre con $2.91 \times 10^4 \pm 1.80 \times 10^4$ cél.mg⁻¹ y en febrero con $3.06 \times 10^4 \pm 2.22 \times 10^4$ cél.mg⁻¹ (Figura 4). Esto coincidió los cambios estacionales en la temperatura de la superficie del mar (Figura 4) y radiación solar (Figura 5) En el caso de la densidad simbiote en anémonas aposimbióticas, las densidades son más bajas a lo largo del año, particularmente en diciembre con $7.26 \times 10^1 \pm 1.73 \times 10^1$ cél.mg⁻¹ (Figura 4) correspondiente al mes con la temperatura y radiación solar bajas (Figuras 4 y 5). Sin embargo, se encontró una alta densidad en anémonas en transición simbiótica/aposimbiótica en el mes de agosto con $3.77 \times 10^4 \pm 2.36 \times 10^4$ cél.mg⁻¹, lo anterior corresponde con la temperatura más alta registrada a lo largo del año (Figura 4).

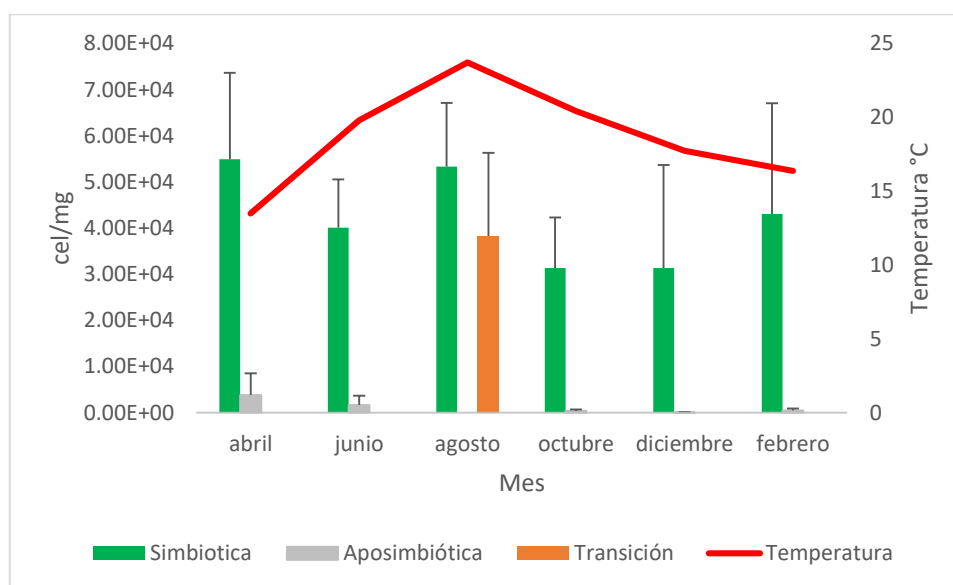


Figura 4. Densidad endosimbiote en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género *Anthopleura* entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la temperatura de la superficie del mar.

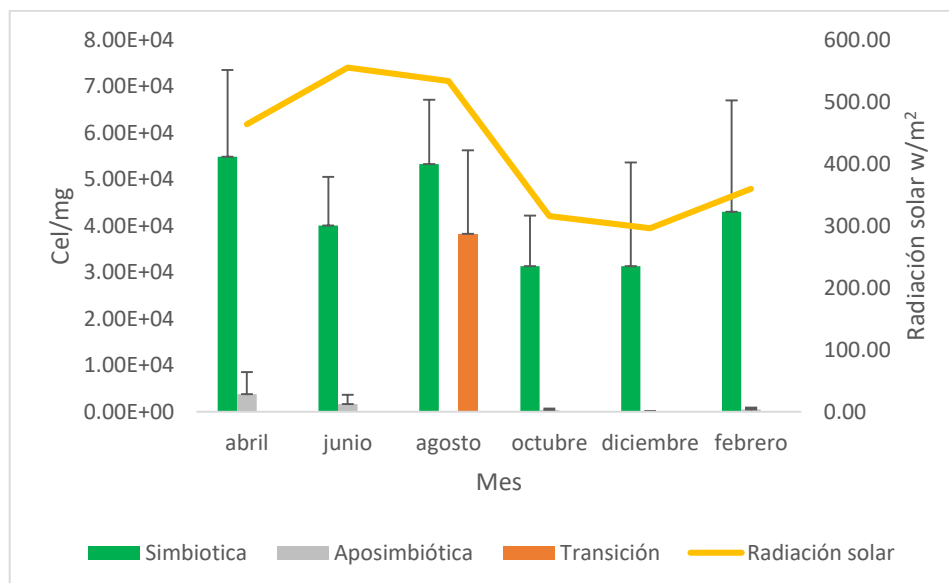


Figura 5. Densidad endosimbionte en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género *Anthopleura* entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la radiación solar.

Al no cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se determinó que se aplicaría una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de las densidades entre condición y cada uno de los meses, donde se obtuvo un valor de $H(11) = 29.492$, $p=0.001^{***}$, comprobando que existe una diferencia estadísticamente significativa con un 95% de confianza. Posteriormente, se realizó una prueba post-hoc por el método de Dunn test donde se encontraron diferencias entre estados simbióticos y aposimbióticos para cada mes, las diferencias significativas se encontraron en el mes de abril ($p=0.02^*$), en el mes de junio ($p=0.03^*$), en el mes de diciembre ($p=0.02^*$) y en el mes de febrero ($p=0.05^*$). Así mismo, se encontraron diferencias significativas en el número de simbioses en los estados simbióticos y aposimbióticos entre diferentes meses de muestreo, dichas diferencias se encontraron en anémonas aposimbióticas de octubre ($p=0.01^*$) y anémonas aposimbióticas de febrero ($p=0.002^*$). También, en el mes de abril se encontraron diferencias significativas entre anémonas aposimbióticas con anémonas en transición de agosto ($p=0.05^*$). De igual forma, para el mes de junio se encontraron diferencias significativas entre anémonas aposimbióticas con anémonas en transición de agosto ($p=0.008^*$). En el mes de agosto se encontraron diferencias significativas entre anémonas en transición con anémonas aposimbióticas de octubre ($p=0.02^*$), anémonas aposimbióticas de diciembre ($p=0.001^*$), y anémonas aposimbióticas de febrero ($p=0.007^*$) (Tabla 3).

3.3 Análisis cuantitativo de la metilación global de ADN en anémonas

Durante la extracción de ADN a partir del tejido de anémonas simbióticas y aposimbióticas, la calidad del ADN fue evaluada mediante cocientes de absorbancia 260/280 y 260/230. El cociente 260/280, indicador de contaminación por proteínas, mostro valores entre 1.88 y 2.02, lo cual se considera adecuado para ADN de alta pureza. Por su parte el cociente 260/230, asociado a contaminantes orgánicos y sales residuales, presentó valores entre 1.86 y 2.49, también dentro del rango aceptable, lo cual sugiere una adecuada eliminación de impurezas durante el proceso de extracción y una buena calidad de ADN para el análisis de metilación de ADN y daño al ADN. Se comprobó la cantidad de fragmentos de ADN por medio de un gel de electroforesis (Figura 13, ANEXO).

Tabla 3. Prueba estadística post-hoc Dunn test, de la comparación de la densidad endosimbionte en anémonas simbióticas (s), aposimbióticas (a) y en transición (t) entre los meses de muestreo. Los valores que presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) están marcados en negritas y señaladas con un *.

	abr	jun	jun	ago	ago	oct	oct	dic	dic	feb	feb
	s	a	s	a	s	a	s	a	s	a	s
abr a	0.02*	0.461	0.163	0.05*	0.194	0.727	0.175	0.215	0.304	0.438	0.261
abr s		0.003*	0.415	0.756	0.362	0.010*	0.393	0.001*	0.237	0.002*	0.277
jun a			0.03*	0.008*	0.04*	0.698	0.03*	0.614	0.077	0.969	0.062
jun s				0.614	0.922	0.081	0.969	0.008*	0.712	0.03*	0.786
ago t					0.548	0.02*	0.587	0.001*	0.383	0.007*	0.438
ago s						0.099	0.953	0.01*	0.786	0.03*	0.861
oct a							0.088	0.372	0.168	0.669	0.140
oct s								0.009*	0.741	0.033*	0.816
dic a									0.023*	0.641	0.01*
dic s										0.071	0.922
feb a											0.057*

Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo del metiloma en anémonas simbióticas indican que un incremento en la metilación del ADN 5-mC% y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), en el mes de junio. En este mes, se registró una temperatura de 19.8°C y se observó el mayor porcentaje de metilación del ADN en anémonas simbióticas 1.630 ± 0.386 5-mC% y anémonas aposimbióticas 1.541 ± 0.395 5-mC% (Figura 6). Por otro lado, durante el mes de agosto la temperatura aumentó hasta 23.7°C , pero se observó que la metilación del ADN disminuyó en anémonas simbióticas a 1.026 ± 0.276 5-mC% y anémonas aposimbióticas a 1.018 ± 0.272 5-mC%. Los meses posteriores se observó que los valores de metilación y temperatura del agua descendieron gradualmente, a excepción del mes de octubre donde la metilación del ADN incrementó en

las anémonas aposimbióticas con un valor de 1.350 ± 0.368 5-mC% en comparación con el mes de agosto (Figura 6).

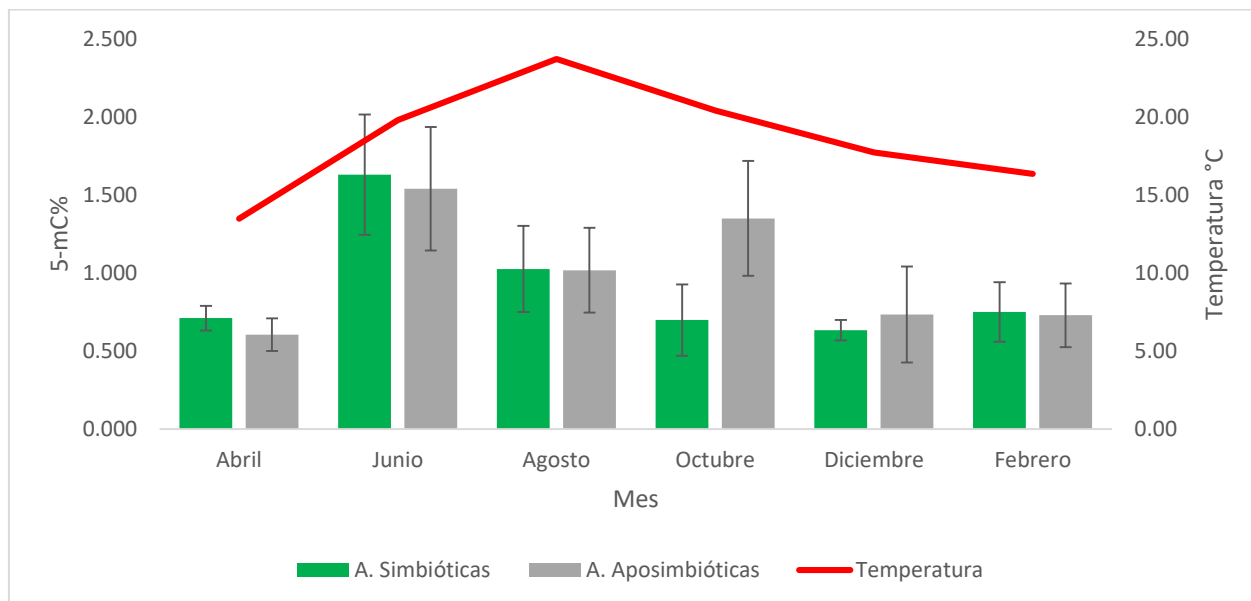


Figura 6. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN (5-mC%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género *Anthopleura* entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la temperatura de la superficie del mar.

Al comparar la metilación del ADN 5-mC% con la radiación solar (Wm^{-2}), se observó la mayor metilación del ADN en anémonas simbióticas 1.630 ± 0.386 5-mC% y anémonas aposimbióticas 1.541 ± 0.395 5-mC%, en el mes de junio, cuando la radiación solar de 555.69 Wm^{-2} fue la más alta entre todos los meses (Figura 7). En comparación con el mes de agosto, se observó una disminución en la radiación solar y en la metilación del ADN en anémonas simbióticas de 1.026 ± 0.276 5-mC% y anémonas aposimbióticas de 1.018 ± 0.272 5-mC%. En los siguientes meses, la radiación solar y la metilación del ADN en anémonas simbióticas y aposimbióticas continuó disminuyendo hasta febrero, alcanzando los valores más bajos metilación del DNA de 0.751 ± 0.190 5-mC% en anémonas simbióticas y 0.730 ± 0.203 5-mC% en aposimbióticas, con excepción de la metilación de 1.350 ± 0.368 5-mC% en anémonas aposimbióticas del mes de octubre cuando la radiación solar alcanzó fue de 233.88 Wm^{-2} (Figura 7).

Los análisis estadísticos realizados en las metilaciones de las anémonas por su condición simbiote y entre los meses de muestreo, mostraron que los datos cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad por lo que se procedió a realizar una prueba paramétrica con una anova de dos vías, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la metilación del ADN de las anémonas entre los meses de muestreo ($F(5,25) = 10.55$, $p = 0.001^{***}$), con un 95 % de confianza. En el

caso de la condición de simbiosis en las anémonas, no se encontraron diferencias significativas y por último, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la interacción entre mes y condición simbiote. Posteriormente se realizó una prueba post-hoc de rangos múltiples de Tukey para conocer donde se encontraban las diferencias entre los meses de muestreo, el estadístico mostró que el mes de junio presentó diferencias significativas con todos los meses de muestreo, abril ($p=0.001^{***}$), diciembre ($p=0.001^{***}$), febrero ($p=0.001^{**}$), agosto ($p=0.01$) y octubre ($p=0.01$). Las diferencias que se encontraron en la prueba de rangos múltiples se cotejaron con un diagrama de barras, encontrando dichas diferencias (Figuras 6 y 7).

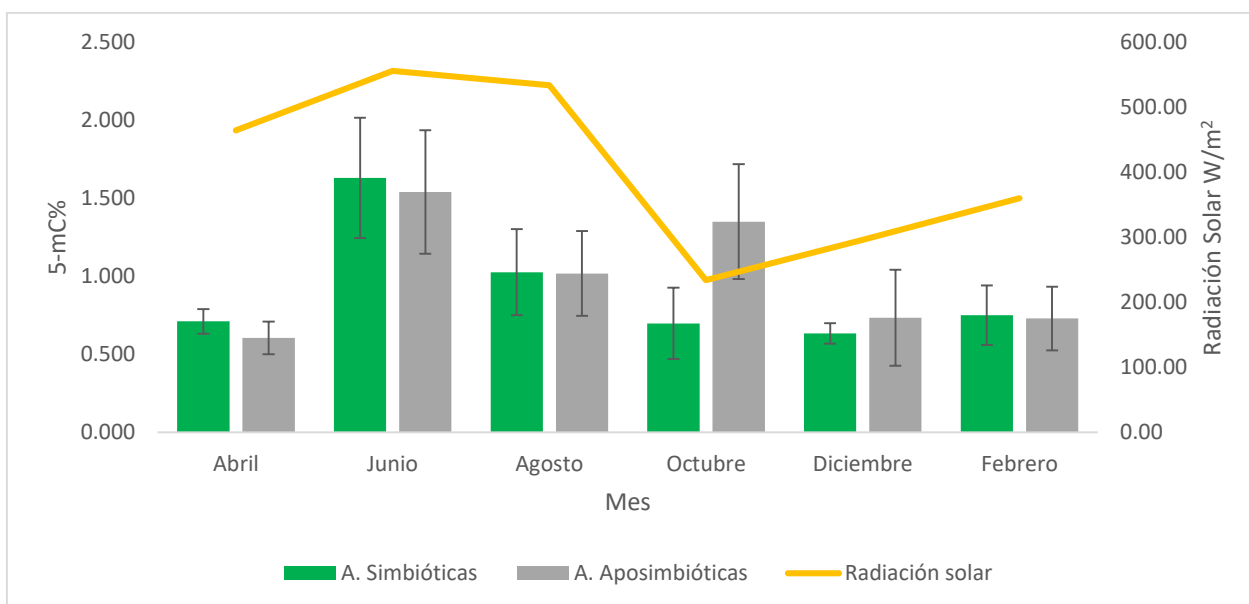


Figura 7. Análisis cuantitativo de la metilación global del ADN (5-mC%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género *Anthopleura* entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la radiación solar.

3.4 Análisis cuantitativo del daño oxidativo 8-OHdG del ADN en anémonas

El indicador del daño al ADN 8-OHdG en anémonas simbióticas y aposimbióticas, no muestra una tendencia entre este indicador con la temperatura a lo largo de los meses muestreados. En abril la temperatura superficial del agua se registró en 13.4 °C y el daño al ADN en anémonas simbióticas fue de 0.399 ± 0.058 8-OHdG y en anémonas aposimbióticas de 0.539 ± 0.355 8-OHdG, mientras que. En comparación con el mes de agosto donde se registró la temperatura más alta de 23.73 °C, el daño al ADN

en anémonas simbióticas fue de 0.403 ± 0.080 8-OHdG y en anémonas en transición fue de 0.451 ± 0.087 8-OHdG (Figura 8).

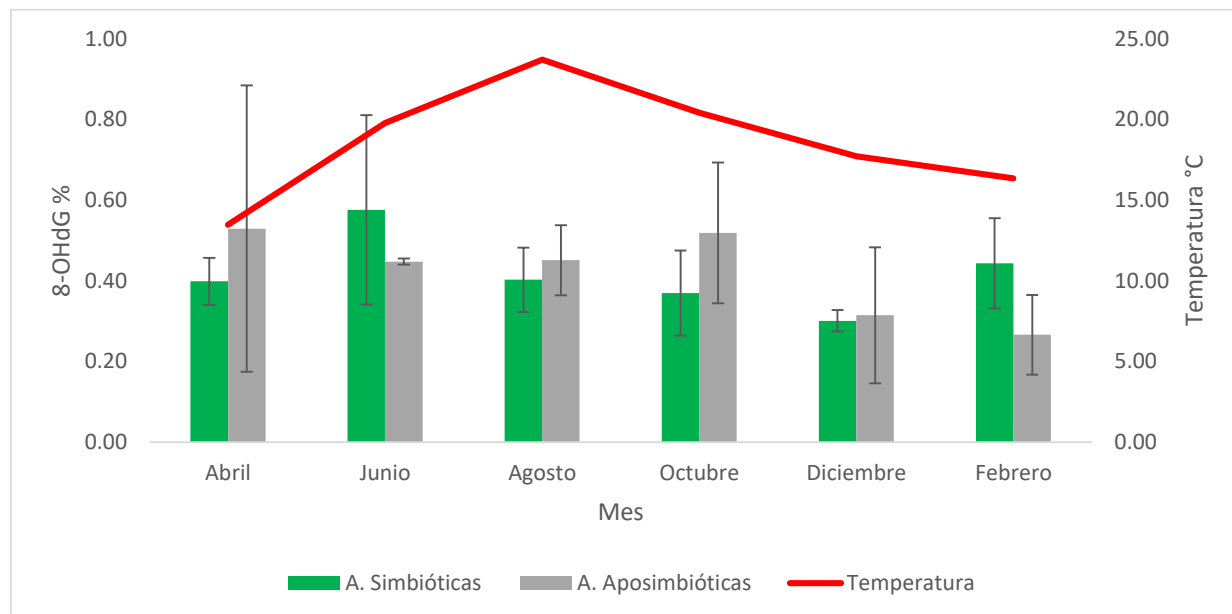


Figura 8. Análisis cuantitativo del daño al ADN (8-OHdG%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y en transición del género *Anthopleura* entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la temperatura de la superficie del mar.

En relación con el daño celular del ADN 8-HdG y la radiación solar wm^{-2} entre cada uno de los meses de muestreo. Se observó la radiación solar más baja en el mes de octubre con 233.88 wm^{-2} , mientras que el daño al ADN en anémonas simbióticas fue de 0.370 ± 0.106 8-OHdG y en anémonas aposimbióticas fue de 0.519 ± 0.175 8-OHdG. En comparación con el mes de junio se observó la radiación solar más alta, alta entre los meses de muestreo, de 555.69 wm^{-2} . Mientras que el daño al ADN en anémonas simbióticas fue de 0.576 ± 0.235 8-OHdG y en anémonas aposimbióticas fue de 0.448 ± 0.008 8-OHdG. Por lo que se puede observar que no existió relación entre los indicadores de daño al ADN y el parámetro ambiental de la radiación solar (Figura 9).

Se realizaron las pruebas estadísticas de normalidad y homocedasticidad en los valores del porcentaje absoluto del daño celular 8-OHdG en el ADN de las anémonas por su condición simbiótica entre los meses de muestreo. Al analizar los datos se encontró que no se cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad por lo que, se procedió a realizar una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($H(11) = 12.604$, $p=0.32$) en el daño al ADN de las anémonas entre los meses de muestreo (Figuras 8 y 9).

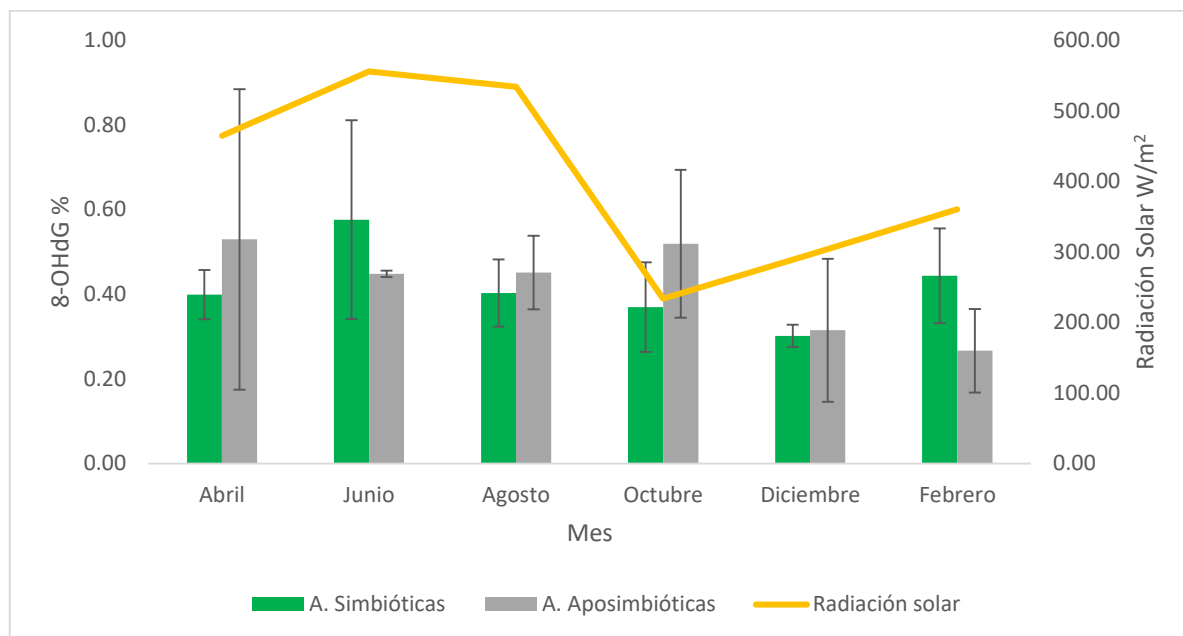


Figura 9. Análisis cuantitativo del daño al ADN (8-OHdG%), en anémonas simbióticas, aposimbióticas y de transición del género *Anthopleura* entre cada uno de los meses de muestreo, en relación con la radiación solar.

3.5 Relación entre densidad endosimbionte e indicadores epigenéticos

Se realizaron pruebas de correlación de Pearson para evaluar la relación entre los indicadores de la metilación del ADN, el daño celular y la densidad de simbiontes en anémonas del género *Anthopleura*. Los resultados indicaron que existe una correlación significativa entre la metilación del ADN y el daño celular ($p=0.006^{**}$), mientras que no se observaron correlaciones significativas con la densidad de los simbiontes (Tabla 4).

Tabla 4. Correlación de Pearson entre los indicadores de metilación global del ADN (5-mC%), el daño al ADN (8-OHdG%) y la densidad endosimbionte en anémonas del género *Anthopleura*. Las correlaciones se estimaron con una ($p<0.05$), con un nivel de confianza del 95%. Número de pares de datos analizados (36) y el valor de la correlación (r).

	METILACIÓN ADN	DAÑO ADN	DENSIDAD SIMBIONTE
METILACIÓN ADN		$p=0.006^{**}$	$p=0.617$
DAÑO ADN	$r=0.446$		$p=0.706$
DENSIDAD SIMBIONTE	$r=-0.086$	$r=0.064$	

Diferencias significativas se identifican con $p=0.01^{*}$, $p=0.001^{**}$, $P<0.001^{***}$

En el análisis estadístico de regresión lineal entre la metilación del ADN 5-mC% y el daño al ADN 8-OHdG se encontró una tendencia positiva obteniendo como coeficiente de determinación $R^2 = 0.199$ y la pendiente de 1.165, lo que indicaría que, a mayor metilación del ADN, mayor será el daño del ADN (Figura 10).

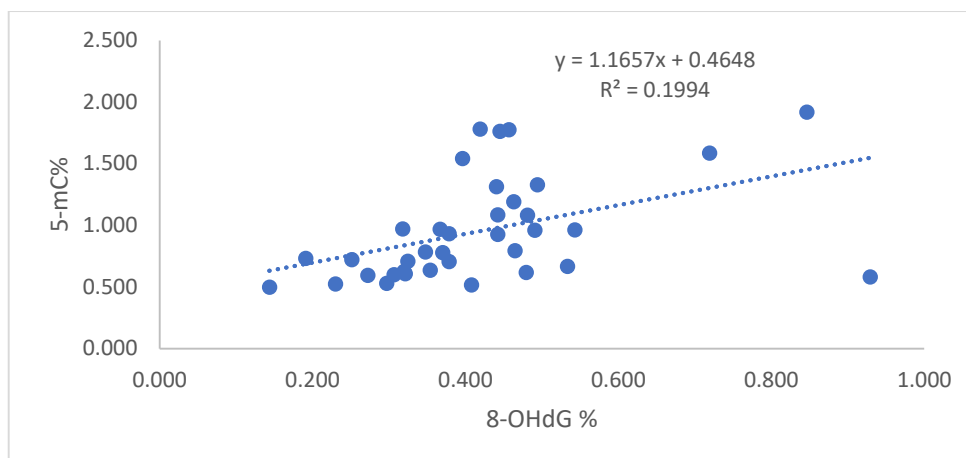


Figura 10. Análisis de regresión lineal entre la metilación del ADN 5-mC% y el daño al ADN 8-OHdG%, con pendiente y su coeficiente de determinación.

El análisis estadístico de regresión lineal entre la metilación global del ADN 5-mC% y la densidad simbiote cel/mg de anémonas simbióticas y aposimbióticas del género *Anthopleura* se observó con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.007$ y la pendiente de -2.0×10^{-6} , no se encontró una tendencia significativa entre el daño celular al ADN y la densidad simbiote (Figura 11).

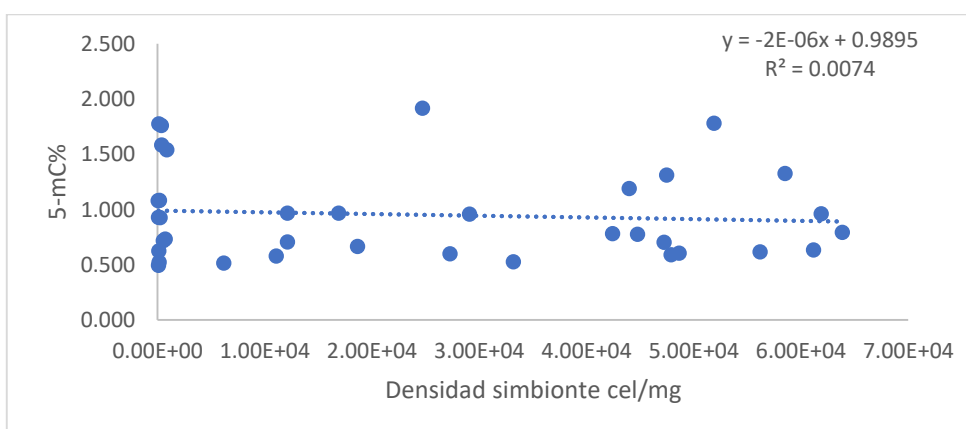


Figura 11. Análisis de regresión lineal entre la metilación del ADN 5-mC% y la densidad simbiote cel/mg, con pendiente y su coeficiente de determinación.

El análisis estadístico de regresión lineal entre el daño celular del ADN 8-OHdG% y la densidad simbiote en cel/mg de anémonas simbióticas y aposimbióticas del género *Anthopleura indica* que se observó con un coeficiente de determinación de $R^2=0.0043$ y la pendiente de 4.0×10^{-7} , no se encontró alguna tendencia significativa entre la metilación del ADN y la densidad simbiote (Figura 12).

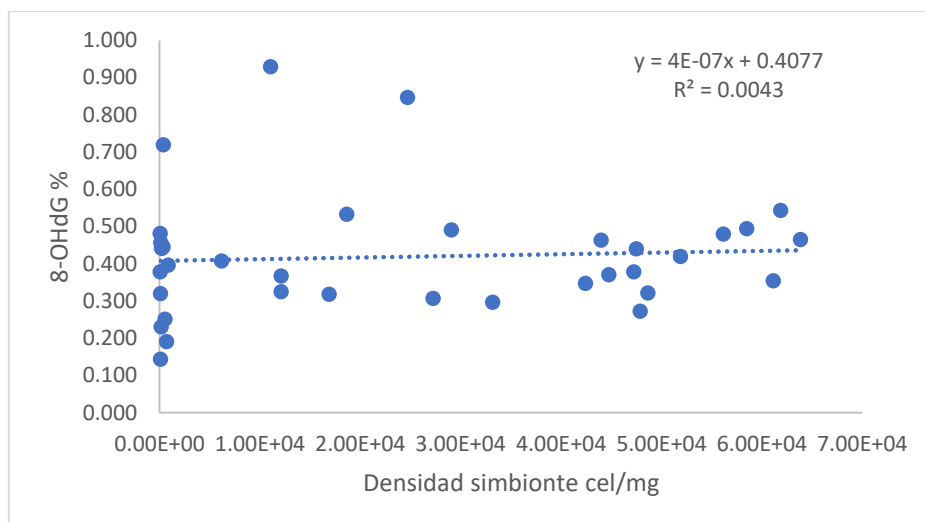


Figura 12. Análisis de regresión lineal entre el daño al ADN 8-OHdG% y la densidad simbiote cel/mg, con pendiente y su coeficiente de determinación.

Capítulo 4. Discusión

Este trabajo empleó anémonas de mar del género *Anthopleura* como modelo de estudio de la epigenética de anthozos simbioses. Además, establece un nuevo registro de aposimbiosis en anémonas *Anthopleura* dentro de sus límites de distribución sur en el Pacífico nororiental y, representa el primer esfuerzo para investigar el efecto de la variación estacional en la simbiosis entre *Anthopleura* sp. y el dinoflagelado endosimbionte *Breviolum muscatinei* (Symbiodiniaceae), en relación con el daño al ADN inducido por estrés oxidativo y la metilación global del ADN en el hospedero.

4.1 Primer registro de aposimbiosis en *Anthopleura* sp. en Baja California

Es importante destacar la presencia de anémonas aposimbióticas en este trabajo, dada la falta de información, tanto de su condición simbiote como de su respuesta fisiológica, en el Pacífico mexicano. La aposimbiosis en anémonas *Anthopleura* se caracteriza por una ausencia natural de células endosimbiontes (Weis y Levine, 1996), lo que causa una despigmentación del tejido del hospedero (Figura 2), similar al blanqueamiento en corales (Dimond et al., 2013; Suggett et al., 2008). Sin embargo, las anémonas aposimbiontes son capaces de mantener sus requerimientos metabólicos exclusivamente a través de la heterotrofia (Hiebert y Bingham, 2012), de tal manera que la simbiosis/aposimbiosis en *Anthopleura* spp. se considera facultativa (Weis et al., 2005). Los resultados del presente trabajo mostraron diferencias significativas en la densidad de células endosimbiontes entre anémonas con apariencia simbióticas y aposimbióticas (Figura 2). En las anémonas que mantenían su coloración (simbióticas), se observaron densidades celulares casi diez veces mayor en comparación con las anémonas blancas (aposimbióticas). Lo que corroboró la baja o nula presencia de células endosimbiontes en las anémonas aposimbióticas del Intermareal de Playa Tres Emes a lo largo de casi todo el año (Figura 4), con excepción del mes de agosto, en el que se sugiere que existe un periodo de transición entre los estados de simbiosis (Figura 4 y 5).

La presencia de aposimbiosis en el intermareal rocoso de Playa Tres Emes, fue relativamente escasa en comparación con la alta abundancia de anémonas simbioses. Si bien la abundancia relativa de anémonas aposimbióticas no fue cuantificada durante los muestreos, aproximadamente, las anémonas aposimbióticas se encontraron en solo una de cada diez o más posas intermareales, con una proporción aproximada de una anémona aposimbiótica por cada tres o más anémonas simbióticas. De acuerdo con Shick et al., (2002), la aposimbiosis es prevalente en la especie *Anthopleura elegantissima*, con respecto a

sus congéneres: *A. sola* y *A. xanthogrammica*, y es más común en las latitudes altas de su distribución, al norte de Estados Unidos, Alaska y Canadá (Bates et al., 2010; Secord y Augustine, 2000). Además, la abundancia de *A. elegantissima* y *A. xanthogrammica* disminuye hacia el sur de su distribución mientras que la abundancia de *A. sola* aumenta en California y Baja California (Cornwell, 2020; Cornwell & Hernández, 2021). Por lo tanto, se esperaría una menor abundancia de *A. elegantissima* aposimbiontes en relación con las anémonas simbiontes en esta región. Sin embargo, existe la posibilidad de que los especímenes aposimbiontes en el intermareal de Playa Tres emes pertenezcan a una especie distinta a *A. elegantissima*, con distribución simpátrica, como: *A. sola*, *A. dowii* o *A. mariae* sp. nov. (Ayala-Sumuano et al., 2017; Vassallo-Avalos, Acuña, et al., 2020; Vassallo-Avalos et al., 2024; Vassallo-Avalos, González-Muñoz, et al., 2020b). Lo que indica un potencial de diversidad de especies y patrones de distribución de aposimbiosis no reportado en esta región.

Además de la latitud, la presencia de aposimbiosis está influenciada tanto por diferencias locales en la altura de la costa y los microhábitats sombreados y de poca luz (Bates, 2000; Bingham et al., 2014), así como los gradientes regionales de temperatura y altura de la marea (Saunders y Muller-Parker, 1997; Secord y Muller-Parker, 2005). La Bahía de Todos Santos es una conocida región de surgencias (Durazo-Flores et al., 2024), con fuertes cambios de temperatura y forzamiento de las mareas a escalas locales (Durazo et al., 2024; Fernández-Aldecoa et al., 2019). Además, en el intermareal rocoso de Playa Tres Emes los microhábitats sombreados son bastante comunes debido a una gran cantidad de rocas grandes (Ibarra-Macias y Montaña-Moctezuma, 2024), en comparación con otros intermareales de Baja California compuestos principalmente por plataformas y terrazas (García-Pamanes y Chee-Barragán, 1976; Peña, 2011). Por lo tanto, la presencia de anémonas aposimbiontes, en el intermareal rocoso de Playa Tres Emes, puede deberse a las características particulares del sitio, dentro la Bahía de Todos Santos, que lo hacen propicio para albergar individuos aposimbóticos. Este primer registro de anémonas aposimbiontes en Baja California, abre la puerta a estudios adicionales sobre las interacciones simbióticas en anémonas Anthopleura del Pacífico nororiental, así como de las potenciales respuestas de aclimatación o adaptación diferencial en anémonas simbiontes y aposimbiontes dentro de sus límites de distribución sur.

4.2 Variabilidad estacional de la endosimbiosis en *Anthopleura* sp.

Se observó estabilidad en la densidad endosimbionte en anémonas simbióticas y en la ausencia de células endosimbiontes en anémonas aposimbóticas a lo largo del año (Tabla 2), aunque con una tendencia al incremento en los meses de abril a agosto y una disminución en los meses de octubre a febrero (Figura 4

y 5). Sin embargo, resulta interesante que, durante el mes de agosto, no se observaron anémonas aposimbióticas en el intermareal de Playa Tres Emes. Incluso aquellos individuos que aparentaban aposimbiosis presentaron una alta densidad endosimbionte, similar a la densidad de células presentes en las anémonas simbióticas (Tabla 2). A pesar de la palidez y poca coloración de estos individuos, en los cuales variaban las tonalidades de sus tejidos (Figura 2). Igual de interesante fue la presencia, nuevamente, de individuos aposimbóticos a partir del mes de octubre. Los cuales permanecieron en el intermareal de Playa Tres Emes hasta concluir el muestreo y apenas presentaron células endosimbiontes en sus tejidos (Figura 4 y 5). Esto coincide con lo reportado anteriormente para individuos simbióticos adultos de *A. elegantissima* (Secord y Muller-Parker, 2005; Verde y McCloskey, 1996), en donde las poblaciones endosimbiontes previamente establecidas permanecieron relativamente estables ante la variación ambiental, mientras que los adultos aposimbióticos adquirieron nuevas poblaciones de endosimbiontes apropiadas para las condiciones locales, principalmente de radiación solar.

Los incrementos en la densidad endosimbionte, tanto de anémonas simbióticas como aposimbióticas en transición, pueden explicarse por el aumento estacional de la radiación solar y la temperatura del agua de mar, que inicia en el mes de abril y alcanza su máximo en el mes de agosto (Figura 4). Los resultados aquí presentados, coinciden con lo reportado en otros estudios de *A. elegantissima* (Verde y McCloskey, 1996, 2001, 2002; Secord y Muller-Parker, 2005), los cuales sugieren que los factores que influyen significativamente en el crecimiento de los endosimbiontes son la luz y la temperatura. Estos factores actúan directamente en la eficiencia fotosintética y estabilidad de la endosimbiosis (Verde y McCloskey, 2007), de manera que el aumento de la luz y la temperatura puede incrementar la actividad fotosintética y estimular la tasa de crecimiento y división de células endosimbiontes (Dimond et al., 2011; E. A. Verde y McCloskey, 2007), lo que se traduce en una mayor densidad celular como la observada en los meses con la luz y temperatura más altas (abril-agosto). Es probable que, con el aumento estacional de la luz y la temperatura en primavera-verano, particularmente en el mes de agosto, se viera favorecida la proliferación de células endosimbiontes en las anémonas que previamente habían permanecido en estado aposimbiótico, alcanzando una densidad endosimbionte similar a las anémonas simbióticas (Figuras 5 y 6). En el recuento inicial de densidad endosimbionte (en abril), las anémonas aposimbióticas presentaron una pequeña población de células (3.3%). Es posible que esta población residente haya incrementado significativamente (en agosto), tras el aumento de luz y temperatura (Secord y Muller-Parker, 2005). Alternativamente, es posible que las anémonas se hayan infectado con las células naturalmente expulsadas por las anémonas simbióticas a su alrededor (Bates, 2000), en el intermareal de Playa Tres Emes.

Por otro lado, la disminución de la densidad endosimbionte en anémonas simbióticas, en los meses más fríos y con poca luz, así como el resurgimiento de anémonas aposimbióticas en el mes de octubre y su prevalencia hasta el invierno (diciembre-febrero), podría deberse principalmente a la disminución significativa de la radiación solar y, en menor medida, al descenso de la temperatura del agua de mar. En los meses de octubre, diciembre y febrero los valores promedio en la radiación solar fueron casi dos veces menores a los valores registrados en abril, junio y agosto (Figura 4), mientras que la temperatura disminuyó hasta tres grados centígrados entre agosto y octubre. Este cambio en la radiación solar y temperatura coincide con los cambios en la densidad endosimbionte (Figuras 5 y 6). Las tasas fotosintéticas de los endosimbiontes que albergan *Anthopleura* spp., se correlacionan directamente con los perfiles de temperatura y radiación lumínica (Fitt et al., 1982; Saunders y Muller-Parker, 1997; Verde y McCloskey, 2002), donde la menor actividad fotosintética ocurre en los meses más fríos (Muller-Parker y Davy, 2001), lo que se relaciona con las densidades de células endosimbiontes más bajas (Verde y McCloskey, 2007). Se ha reportado, además, que tanto las anémonas aposimbióticas como las simbióticas presentan tasas similares de respiración y asimilación de carbono de origen heterotrófico (Muller-Parker y Davy, 2001), de esta forma se puede explicar que se presenten anémonas con una baja densidad endosimbionte en los meses más fríos y con menor cantidad de luz en el intermareal de Playa Tres Emes.

En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento y disminución de la densidad poblacional de endosimbiontes en anémonas *Anthopleura* spp. adultas, está directamente relacionada con los cambios estacionales en las condiciones de luz y temperatura en el intermareal de Playa Tres Emes. Además, la simbiosis facultativa *Anthopleura*-Symbiodiniaceae presenta una alta plasticidad y flexibilidad, debido a que ciertas anémonas adultas pueden transitar entre estados simbiótico y aposimbiótico. La plasticidad de la regulación endosimbionte probablemente se lleve a cabo mediante el crecimiento o infección, expulsión y regeneración o reinfección de células endosimbiontes (Lajeunesse y Trench, 2000; Secord y Muller-Parker, 2005; Towanda y Thuesen, 2012). Sin embargo, estudios previos han observado que los individuos adultos de *A. elegantissima*, naturalmente aposimbióticos, se infectan de endosimbiontes muy lentamente en el medio natural (Weis y Levine, 1996; Secord y Muller-Parker, 2005) y con gran dificultad en el laboratorio (Buchsbaum, 1968; Weis y Levine, 1996). Mientras que los adultos de *A. elegantissima*, experimentalmente aposimbióticos, son más propensos a la reinfección de células endosimbiontes cuando son incubados en presencia de otros individuos simbióticos y en condiciones óptimas de luz (Weis y Levine, 1996). Por lo tanto, es posible que exista un menor número de oportunidades para la infección o reinfección endosimbionte en *A. elegantissima*, posterior a las etapas del desarrollo larvario (Schwarz et al., 2002; Weis et al., 2002; Weis y Levine, 1996). Adicionalmente, es posible que la capacidad de infección/reinfección, así como su flexibilidad y plasticidad en anémonas, sea especie-específica (Muller-

Parker y Davy, 2001; Parkinson et al., 2018). De esta forma, la respuesta observada podría corresponder a una especie con distribución simpátrica pero distinta de *A. elegantissima* (Ayala-Sumuano et al., 2017; Vassallo-Avalos et al., 2022, 2024), y/o el dinoflagelado *B. muscatinei* (Cornwell et al., 2022; Cornwell y Hernández, 2021). Esta posibilidad, abre la puerta a estudios adicionales de la regulación endosimbionte especie-específica en anémonas *Anthopleura* del Pacífico nororiental.

4.3 Metilación global del ADN

Los resultados derivados del análisis de metilación global 5-hmC%, muestran una variación estacional en los niveles de este indicador (Figuras 6) Posiblemente la variación estacional esté vinculada a los cambios de temperatura y radiación solar (Figura 6 y 7). Se puede observar que los porcentajes de metilación global del ADN en anémonas simbióticas y aposimbióticas son menores en los meses más fríos y de menor radiación lumínica (diciembre y febrero). Sin embargo, con el aumento progresivo de la temperatura y radiación solar (desde abril) y en los meses más cálidos (junio y agosto) se observó un notable incremento en la metilación del ADN, la cual fue hasta dos veces mayor en comparación con los meses de diciembre, febrero y abril (Figuras 6 y 7).

En corales, se han observado cambios en la metilación del ADN bajo diferentes regímenes de tolerancia al estrés térmico. Estos cambios parecen estar asociados con la homeostasis transcripcional en condiciones ambientales variables (Liew et al., 2020). En el presente estudio, el patrón observado de mayor metilación del ADN en los meses cálidos también podría representar una respuesta a la variabilidad ambiental. Sin embargo, es probable que existan diferencias entre las respuestas epigenéticas observadas en estudios de corales y anémonas, debido a las diferencias en los taxones de los hospedadores y sus endosimbiontes (Putnam et al., 2016), así como a sus diferencias de tolerancia térmica y exposición a fluctuaciones ambientales cotidianas entre los arrecifes de coral como en el intermareal rocoso. Además, los cambios en los niveles de metilación registrados en este estudio podrían estar asociados con cambios en la densidad endosimbionte (Figura 6). Esto concuerda con los hallazgos de Ishida-Castañeda et al., (2023) donde revelaron que la presencia de simbiontes disminuyó la metilación basal del ADN a temperatura ambiente, pero la incrementó bajo estrés por calor. Lo que sugiere un efecto sinérgico de la variabilidad ambiental y los cambios en la densidad endosimbiontes a la que fue sometida la relación simbiótica en su medio natural, como, la disminución, pérdida y reinfección de células endosimbiontes.

Si bien se observa una tendencia general, entre el incremento de la temperatura y radiación solar con la metilación del ADN, también se presentó una mayor metilación del ADN en anémonas aposimbióticas en un mes relativamente frío y con una baja radiación solar (octubre). En el mes de agosto, la densidad de células endosimbiontes en anémonas clasificadas como aposimbióticas en transición, fue 99.4% mayor comparado con los meses anteriores. Posteriormente, en el mes de octubre, se observó que la densidad endosimbionte disminuyó cerca de 98.7% por ciento en anémonas aposimbióticas comparado con el mes de agosto (Figura 4). Sin embargo, los niveles de metilación del ADN incrementaron un 33% aproximadamente (Figura 6). Estos cambios mensuales probablemente sucedieron debido a que las anémonas aposimbióticas tiene la facultad de expulsar las células endosimbiontes por efecto de la disminución en temperatura y radiación lumínica (Verde y McCloskey, 2007). Este tipo de dinámica ha sido descrita en la anémona de mar *Aiptasia pallida* por Perez y Weis, (2006), quienes demostraron que el estrés ambiental puede activar vías de señalización que desencadena la ruptura de la simbiosis.

Una posible explicación al fenómeno descrito en el párrafo anterior podría estar relacionada con una respuesta epigenética de regulación de la densidad endosimbionte, por parte del hospedador, tras el aumento exponencial en la densidad celular y la posterior disminución de endosimbiontes entre los meses de agosto y octubre. Estudios previos han demostrado cierta relación entre los cambios en la metilación global del ADN y la densidad endosimbionte en corales, los cuales son aparentemente mediados por las condiciones experimentales de temperatura y nutrientes inorgánicos. Por ejemplo, Rodríguez-Casariego et al., (2018), revelaron incrementos rápidos (1 a 2 horas) y tardíos (27 a 35 días) en la metilación del ADN, asociados con aumentos significativo en las poblaciones endosimbiontes de corales *Acropora cervicornis* en condiciones ambientales naturales (*common garden*), pero sujetos al enriquecimiento de nutrientes (nitrógeno y fósforo), durante un periodo estacional de estrés térmico (29-30 °C) en verano (julio-agosto). Sus resultados coinciden con las respuestas observadas en el presente estudio, principalmente en lo que se refiere a los tiempos de respuesta tardía de la metilación del ADN. Lo que sugiere que la actividad enzimática de las ADN metiltransferasas (DNMTs), que dan lugar a las modificaciones epigenéticas de metilación (Feil y Fraga, 2012; Jeltsch y Jurkowska, 2016), pueden ocurrir rápidamente después de la exposición al estrés ambiental (Gonzalez-Romero et al., 2017; Rivera-Casas et al., 2017), seguidas de la activación de estas mismas enzimas u otros mecanismos complementarios que median la respuesta epigenética a más largo plazo (Rodríguez-Casariego et al., 2018). Lo cual explica los cambios en el porcentaje de metilación entre los meses de muestreo con la mayor variación ambiental. Por otro lado, Ishida-Castañeda et al., (2023), evaluaron los cambios en la metilación del ADN en pólipos primarios, en estado simbiótico y aposimbiótico, del coral *Acropora digitifera* en respuesta al aumento de temperatura, con un incremento de 1 °C por día hasta alcanzar la temperatura objetivo (32 °C) y mantenidos durante 10

días en estrés térmico con un fotoperiodo de luz:oscuridad (12:12 horas), que simulaba la luz del arrecife. Los autores encontraron que, en condiciones de temperatura ambiente (27 °C), los niveles de metilación del ADN en los pólipos fueron significativamente menores en presencia de simbiosis, en comparación con los pólipos aposimbióticos. Sin embargo, con el aumento de la temperatura observaron un incremento significativo en la metilación del ADN en pólipos simbióticos y una disminución no significativa en los pólipos aposimbióticos. Estas respuestas son consistentes con las observaciones del presente estudio, en relación con los cambios significativos de la metilación del ADN en los meses más cálidos (junio-agosto) y, particularmente, con los altos niveles de metilación del ADN en anémonas aposimbiontes (octubre). Esto sugieren que la simbiosis juega un papel fundamental en la respuesta epigenética frente al estrés ambiental, mientras que los mismos mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN, responden tanto a los estímulos ambientales como a los cambios en la condición simbiótica del hospedador y tales cambios operan bajo una dinámica epigenética altamente compleja, simultánea y asincrónica (Rodríguez-Casariego et al., 2018), frente al estrés ambiental.

Como se describió anteriormente, la simbiosis entre el hospedador y sus dinoflagelados endosimbiontes es de vital importancia para el cumplimiento de diferentes funciones metabólicas de las anémonas simbióticas, debido a la capacidad de transferencia de carbono de origen fotosintético de los endosimbiontes a su hospedador (Coffroth y Santos, 2005; Muscatine L. et al., 1984). Además, de que la densidad de la población endosimbionte aumenta en condiciones favorables de luz y temperatura (Fitt, 1982 Saunders y Muller-Parker, 1997; Verde y McCloskey, 2002). Por lo tanto, es de esperar que exista cierta respuesta epigenética de regulación de la densidad endosimbionte por parte del hospedador (Li et al., 2018; Nawaz et al., 2022) y una interacción epigenética en el holobionte, sobre todo en condiciones de estrés ambiental (Rodríguez-Casariego et al., 2022), tal como lo sugieren los trabajos de Rodríguez-Casariego et al., (2018) e Isidra-Castañeda et. al. (2023), mencionados arriba. Sin embargo, es importante resaltar posibles diferencias epigenéticas en relación con el establecimiento exitoso de endosimbiontes altamente compatibles o menos compatibles en especies *Anthopleura* del Pacífico nororiental (Cornwell et al., 2022; Cornwell y Hernández, 2021). El cual está regulado diferencialmente por la expresión genética y modificaciones postraduccionales del huésped (Matthews et al., 2017; Rodríguez-Lanetty et al., 2006; Weis y Levine, 1996). Por ejemplo, en su distribución más norteña, las anémonas *Anthopleura elegantissima* pueden asociarse con dinoflagelados de la especie *Breviolum muscatinei* o clorófitas *Elliptochloris marina*, esta última tiene una contribución relativamente limitada a la nutrición del hospedador (Bergschneider y Muller-parker, 2008), mientras que la asociación con dinoflagelados es mucho más eficiente en la transferencia directa de nutrientes (Coffroth y Santos, 2005; Muscatine L. et al.,

1984). Lo que podría dar lugar a diferencias de metilación del ADN entre especies *Anthopleura* que albergan distintos taxones de simbioses.

Contrario a lo que se esperaba, no se observó una correlación significativa entre la metilación del ADN con la densidad endosimbionte (Figura 11) y tampoco se encontraron diferencias significativas en los niveles de globales de metilación del ADN entre anémonas *Anthopleura* simbióticas y aposimbióticas, con excepción del mes de octubre (Figuras 6 y 7). Una posible explicación podría ser que, en general, los niveles de metilación del ADN fueron bajos en ambos estados simbióticos. Ya que las diferencias de metilación no fueron mayores a 2% entre las condiciones de simbiosis y aposimbiosis, con excepción del mes de octubre (Figura 6). No obstante, estos niveles de metilación son comparables con los reportados en otros estudios (Dimond et al., 2021; Sarda et al., 2012), los cuales señalan que niveles bajos de metilación global del ADN son comunes en invertebrados con linajes evolutivos antiguos como en el caso de los cnidarios, lo que sugiere una herencia de mecanismos epigenéticos conservados, y refleja una continuidad funcional a lo largo de grandes escalas de tiempo evolutivo (Zhang y Jacobs, 2022). Adicionalmente, la estimación a nivel genómico global a la que se cuantificó la metilación del ADN, en el presente trabajo, proporciona una baja resolución (Rodríguez-Casariago et al., 2018). Pues se ha observado que las respuestas al estrés, que implican un aumento en la metilación del ADN en ciertas regiones genómicas específicas, son acompañadas de una disminución de la metilación (hipometilación) en otras regiones, lo que resulta en un nivel neto de metilación del ADN en todo el genoma, con el mismo número de marcas de metilación del ADN, pero en diferentes regiones genómicas (Eirin-Lopez y Putnam, 2019; Li et al., 2018; Putnam et al., 2016). Por lo tanto, la falta marginal de significancia observada podría resultar de una baja resolución del método empleado y una comparación limitada con otros métodos de cuantificación de la metilación (Rodríguez-Casariago et al., 2018). Un enfoque más adecuado para identificar regiones genómicas específicas con metilación diferencial (DMRs) es la secuenciación de bisulfito a todo el genoma (WGBS), que permite evaluar la metilación a nivel de citosina en todo el genoma (Li et al., 2018). Además, solo una pequeña fracción del genoma en invertebrados marinos, suele estar altamente metilada (Dimond et al., 2021), por ejemplo, genes conservados de mantenimiento celular (Dimond y Roberts, 2016; Dixon et al., 2014; Gavary y Roberts, 2010; Sarda et al., 2012). Sin embargo, a pesar de las limitaciones del método, la contribución de la metilación del ADN asociada a la condición simbiote de las anémonas queda evidenciada de forma parcial por las tendencias observadas en los meses con mayor variación ambiental. Además, a diferencia de otros trabajos (Ishida-Castañeda et al., 2023; Rodríguez-Casariago et al., 2018), en este estudio se cuantificó la metilación del ADN para el hospedador únicamente y no para holobionte en su totalidad, que incluye tanto al hospedador como al simbiote, lo que evitó otra fuente potencial de variabilidad (ver Putnam et al., 2016), que podría haber afectado los resultados obtenidos.

En este sentido, estudios previos en distintas especies de anémonas de mar, han observado diferencias interesantes en lo que respecta a las modificaciones epigenéticas en anémonas simbióticas y aposimbióticas. En individuos adultos de *Aiptasia*, se estudió el papel de la metilación del ADN en el mantenimiento de la homeostasis transcripcional que responde a la simbiosis, en la cual se observaron cambios en la metilación del ADN y de expresión génica con un enriquecimiento de los procesos relacionados con la simbiosis y las interacciones complejas entre las vías subyacentes, como la inmunidad, apoptosis, reconocimiento de la fagocitosis y la formación de fagosomas (Li et al., 2018). Además, un estudio epigenético en la anémona de mar *Anthopleura elegantissima* detectó cambios sutiles en el metiloma del hospedador, identificando una región genómica extendida, con una metilación consistentemente más alta entre los individuos simbióticos (Dimond et al., 2021). De acuerdo con los autores, esa región se observó para múltiples transcriptos asociados con una subunidad catalítica de la ADN polimerasa zeta, capaz de reparar las lesiones del ADN y completar la replicación del ADN dañado por una lesión común causada por radicales libres (Johnson et al., 2000), aunque a costa de posibles mutaciones (Gan et al., 2008). Dado que el estrés oxidativo es una consecuencia fisiológica importante de hospedar endosimbiontes (Weis, 2008), esto plantea interesantes posibilidades sobre cómo la simbiosis podría influir en este proceso epigenético y cómo las modificaciones epigenéticas afectan, a su vez, a la biología de la simbiosis.

4.4 Daño al ADN por estrés oxidativo

Este trabajo constituye uno de los primeros esfuerzos en describir la metilación del ADN en anémonas *Anthopleura* spp., durante las variaciones estacionales del estrés ambiental, incluidas la temperatura y radiación solar, que causan cambios en la asociación endosimbionte. A la par, este trabajo también amplía los esfuerzos recientes que combinan el estudio de las respuestas epigenéticas ambientales con el daño oxidativo del ADN en invertebrados marinos, particularmente el daño oxidativo 8-OHdG. Tal como se esperaba, se observó una correlación positiva ($R^2 = 0.199$) en los resultados del análisis de daño oxidativo y metilación global de ADN, es decir, a medida que aumenta el daño al ADN por estrés oxidativo, la metilación del ADN también incrementa (Tabla 3, Figura 10), y esta tendencia se acentúa por efecto del incremento en la temperatura, radiación solar y densidad endosimbionte. Estos resultados son consistentes con los estudios realizados por Franco et al., (2008) y Valinluck y Sowers, (2007), quienes demostraron que el estrés oxidativo regula la actividad de las ADN metiltransferasas (DNMTs), las cuales añaden grupos metilo a las citocinas (Feil y Fraga, 2012; Jeltsch y Jurkowska, 2016). A su vez, las enzimas TET (ten-eleven traslocation dioxygenases), que median la conversión de 5-metilcitosina a 5-

hidroximetilcitosina (5-hmC), requieren cofactores sensibles al estado redox como Fe(II) y 2-oxoglutarato, por lo que su actividad puede alterarse por el estrés oxidativo (Skvortsova et al., 2018; Wu y Zhang, 2017).

Estudios recientes en invertebrados marinos, encontraron un aumento en la metilación del ADN en genes relacionados con el sistema antioxidante del mejillón, *Mytilus galloprovincialis*, expuesto al estrés térmico y contaminantes (Gonzalez-Romero et al., 2017), mientras que en la ostra *Crassostrea virginica* expuesta al incremento de la temperatura del agua, aumentó significativamente la expresión de biomarcadores de daño al ADN, particularmente la expresión de histonas γ H2AX (Rahman et al., 2023) y, en el caso del coral *Acropora cervicornis*, las modificaciones epigenéticas de fosforilación en esta familia de histonas involucradas en la reparación del ADN, se relacionaron con los pulsos de metilación del ADN en condiciones de estrés térmico y nutrientes inorgánicos (Rodriguez-Casariago et al., 2018). Además, Diamond y Roberts (2020), observaron cambios en el metiloma del coral *Porites astreoides*, asociados a procesos de reparación del ADN y regulación de genes implicados en el mantenimiento de la simbiosis en ambientes arrecifales distintos. Adicionalmente, diversos estudios en corales y anémonas sugieren que la metilación del ADN, y otras modificaciones epigenéticas, regulan la transcripción de genes involucrados en la simbiosis y la respuesta al estrés oxidativo (Putnam et al., 2016; Li et al., 2018; Rodriguez-Casariago et al., 2018; Liew et al., 2020; Dimond et al., 2021). Además, estas modificaciones epigenéticas también han sido descritas en plantas como parte de la respuesta a los factores ambientales que genera estrés oxidativo debido a la sequía, salinidad y temperatura. Como ejemplos, se encuentran los trabajos de Chinnusamy y Zhu, (2009) y Boyko y Kovalchuk, (2011), quienes reportaron que el aumento de radicales libres de oxígeno (ROS), inducido por el estrés ambiental, desencadena un reordenamiento del metiloma en plantas, modulando genes claves para la defensa antioxidante y la aclimatación ambiental.

La correlación entre el daño por estrés oxidativo y el incremento en la metilación del DNA, en el presente estudio, parece estar asociada al incremento de la temperatura, radiación solar y densidad endosimbionte, las cuales registraron valores máximos entre los meses de junio y agosto. Durante este periodo, el aumento en dichos factores bióticos (endosimbiosis) y abióticos (luz y temperatura), podrían haber favorecido la producción de ROS. Lo que explicaría los incrementos del daño oxidativo 8-OHdG y, en consecuencia, el aumento del porcentaje global de metilación del ADN. Esta tendencia estacional sugiere que la densidad endosimbionte y los factores ambientales, de luz y temperatura, pueden inducir un aumento del estrés oxidativo en los cloroplastos, lo que provoca daño al fotosistema II (PSII), promoviendo la generación de ROS en las células endosimbiontes (Lesser, 1997, 2006; Weis, 2008; Oakley et al., 2016), liberando el exceso de ROS en los tejidos del hospedador y causando daño oxidativo al ADN (Richier et al., 2006; Rodriguez-Lanetty et al., 2006; Venn et al., 2008). De esta manera, el estrés oxidativo habría alterado

la actividad de enzimas específicas (Feil y Fraga, 2012; Jeltsch et al., 2016; Wu y Zhang, 2017; Skvortsova et al., 2018), que incrementan las modificaciones epigenéticas (Rodríguez-Casariago et al., 2018; Dimond et al., 2021). Posteriormente, con la disminución de la radiación solar y la temperatura, así como la densidad endosimbionte, se observó una disminución del porcentaje de la metilación de ADN y daño oxidativo para los meses de diciembre y febrero (Figuras 6-9).

En el caso de las anémonas simbióticas, se registró un incremento de 44.3% en el daño al ADN (el mayor porcentaje de daño registrado en el estudio), en el mes de junio con respecto al mes de abril. Para el mes de agosto se observa que el daño al ADN disminuye un 42.9 % en las anémonas simbióticas, aunque la temperatura y la radiación solar continuaron en ascenso (Figuras 8 y 9). Este comportamiento coincide con lo reportado por Downs et al., (2002), quienes proponen que el incremento de la temperatura y la radiación lumínica en cnidarios simbioses puede inducir al estrés oxidativo como resultado de la producción excesiva de ROS que se origina a partir del daño fototérmico del fotosistema II en los dinoflagelados endosimbiontes, lo que permite la liberación de peróxido de hidrógeno hacia el hospedador, resultado en el daño al ADN. Por otro lado, en el caso de las anémonas aposimbióticas, se observó que en el mes de abril se presentó el mayor daño al ADN en comparación con los demás meses de muestreo. Se sugiere que este porcentaje de daño está relacionado con el aumento estacional de la temperatura y radiación lumínica. Sin embargo, para el mes de junio se observa una disminución del 15.3 % en el daño al ADN a pesar de que la temperatura y radiación lumínica seguían en aumento. Hasta alcanzar el punto máximo en agosto, con un incremento gradual en la temperatura del agua de hasta 10°C. No obstante, el daño al ADN sólo mostró un incremento del 0.6% en agosto en comparación con el mes de junio. Además, no se observó ninguna correlación significativa entre el daño oxidativo y la densidad endosimbionte (Figura 12) y, contrario a lo esperado, tampoco se observaron de diferencias significativas en los niveles de daño oxidativo entre anémonas simbióticas y aposimbióticas. Esto sugiere que las anémonas simbióticas y aposimbióticas cuentan con múltiples vías antioxidantes que les proporcionan cierta capacidad de tolerancia al estrés oxidativo y una protección directa ante el daño oxidativo al ADN.

De acuerdo con Downs et al. (2002), la capacidad de los organismos de modular sus defensas antioxidantes es determinada, en gran parte, por el umbral de tolerancia al estrés ambiental de los organismos. De acuerdo con Lehnert et al., (2014), las anémonas del género *Aiptasia*, en estado aposimbiótico, muestra mayor expresión basal de genes relacionados con el estrés oxidativo. Lo que sugiere una mayor capacidad de respuesta antioxidante en ausencia de simbiontes o una regulación más eficiente de sus mecanismos de defensa antioxidante. Esto podría deberse a la capacidad de amortiguamiento en la producción de ROS por parte de las anémonas, pues se ha demostrado que, en asociación con endosimbiontes, los

hospedadores deben ajustar su actividad antioxidante para contrarrestar el aumento de las ROS derivado de la fotosíntesis (Richier et al., 2006; Rodriguez-Lanetty et al., 2006; Venn et al., 2008). Además, la expulsión de células endosimbiontes es otra estrategia del hospedador para mitigar el estrés oxidativo de los ROS generados por los endosimbiontes (Lesser, 1997, 2006; Weis, 2008; Oakley et al., 2016) y, adicionalmente, en anémonas *Aiptasia* y *Anthopleura* simbióticas y aposimbióticas se han encontrado diferencias significativas en la expresión de genes relacionados con el control del estrés oxidativo tanto del hospedador como de los endosimbiontes, los que contribuye a la capacidad de aclimatación frente a las condiciones ambientales cambiantes (Rodriguez-Lanetty et al., 2006; Oakley et al., 2016). Esto plantea interesantes posibilidades de una compleja dinámica estacional del daño oxidativo, mediada por la temperatura y radiación solar y vinculada con la regulación de la asociación simbiote. Sin embargo, los mecanismos precisos siguen siendo un tema de estudio adicional que abre la puerta a futuras investigación sobre las respuestas de estrés oxidativo y los mecanismos de daño y reparación del DNA en cnidarios simbiotes.

Capítulo 5. Conclusiones

El presente estudio analizó la respuesta fisiológica en anémonas del género *Antopleura* en estado simbiótico, aposimbiótico y en transición, frente a la variación estacional de temperatura y radiación solar, así como su efecto en la simbiosis en relación con marcas epigenéticas como el Daño al ADN por estrés oxidativo y metilación global del ADN. En primer lugar, se documenta por primera vez la presencia de anémonas del género *Anthopleura* en estado aposimbiótico en su distribución más al sur en el intermareal de Playa Tres Emes, Ensenada Baja California, con lo cual se amplía el conocimiento de la distribución de aposimbiosis y la ecología de la simbiosis de anémonas *Anthopleura* en esta región.

Tal como se esperaba, se encontraron diferencias entre los estados simbióticos y aposimbióticos a lo largo de la variabilidad estacional. Con principal interés en el mes de agosto, donde se observó un aumento en la densidad simbiote en anémonas aposimbióticas en transición, debido probablemente al efecto del incremento de la temperatura y radiación solar. Este hallazgo podría sugerir un potencial para la reinfección simbiótica en condiciones ambientales favorables y es una evidencia de la plasticidad fisiológica de la anémona y la flexibilidad de la simbiosis. Esta variabilidad observada también podría estar relacionada con las características dinámicas locales como los cambios en las mareas y surgencias con aporte de nutrientes al intermareal.

Los porcentajes de metilación global del ADN en las anémonas del género *Anthopleura*, mostraron una variación estacional, con tendencia a un incremento en los meses cálidos del año y disminución en la metilación en los meses fríos. Y a pesar de que no se encontró una correlación entre estado simbiótico y aposimbiótico con la metilación del ADN, sí se observó un aumento en la metilación en anémonas aposimbióticas durante el mes de con la menor radiación solar (octubre). Lo cual podría sugerir que existe una respuesta epigenética relacionada con los cambios en la densidad simbiote y la disminución de los parámetros ambientales, particularmente de luz en el intermareal. Por lo que estos resultados de metilación del ADN indican mecanismos epigenéticos vinculadas con la aclimatación estacional y la regulación de la simbiosis, aunque es probable que su dinámica y comportamiento sean complejos y dependan de múltiples factores biológicos y ambientales.

El daño al ADN por estrés oxidativo (8-OHdG), mostró una ligera variación estacional en anémonas del género *Anthopleura*, con tendencia a incrementar en los meses más cálidos. Entre ambos estados simbióticos, se observó una tendencia al incremento en el daño al ADN con el aumento de la temperatura

del agua de mar y la radiación solar. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos estados simbióticos, aunque las anémonas aposimbióticas mostraron menor variación en este indicador, probablemente debido a niveles más bajos de estrés oxidativo por la ausencia de endosimbiontes, se sugiere que esto podría indicar una respuesta diferencial al estrés ambiental., Además, la correlación que existe entre la metilación del ADN y el daño oxidativo, apoyan la hipótesis de una regulación estacional, a nivel epigenético, de la condición simbiote en *Anthopleura*, mediada por el estrés oxidativo del hospedador y el endosimbionte.

De forma general, los resultados obtenidos en este estudio proporcionan nueva evidencia de los mecanismos epigenéticos que regulan la respuesta fisiológica de la relación simbiótica entre *Anthopleura* spp. y *B. muscatinei* en condiciones naturales, los cuales les permiten enfrentar las fluctuaciones ambientales del intermareal rocoso. Esta capacidad de aclimatación podría representar una ventaja adaptativa frente a escenarios de cambio climático, donde la flexibilidad simbiótica y la plasticidad de la respuesta epigenética será fundamental para la resiliencia de los cnidarios simbiotes.

Literatura citada

- Aguilar-Rosas, R., Aguilar-Rosas, L. E., & Pedroche, F. F. (2005). *Ulva fasciata* Delile (Ulvaceae, Chlorophycota): a species newly introduced into Pacific Mexico. *Botanica Marina*, 48(1), 46-51. <https://doi.org/10.1515/BOT.2005.005>
- Aksun Tümerkan, E. T. (2023). The Novel Antioxidant Active Packaging Approach: A Combination of Aquafaba and Essential Oils to Prevent Lipid Oxidation in Fish. *Biology and Life Sciences Forum*, 26(1), 1-21. <https://doi.org/10.3390/Foods2023-15159>
- Asada, K. (2006). Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391–396. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>
- Asada, K., Kiso, K., & Yoshikawa, K. (1974). Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination. *Journal of Biological Chemistry*, 249(7), 2175–2181. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42815-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42815-9)
- Asada, K., Kiso, K., & Yoshikawa, K. (1987). Production and Scavenging of Active Oxygen in Chloroplasts. In D. J. Kyle, C. B. Osmond, y C. J. Arntzen (Eds.), *Photoinhibition*. Amsterdam: Elsevier, pp. 227–287. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1357219>
- Ayala-Sumuano, J.-T., Licea-Navarro, A., Rudiño-Piñera, E., Rodríguez, E., & Rodríguez-Almazán, C. (2017). Sequencing and de novo transcriptome assembly of *Anthopleura dowii* Verrill (1869), from Mexico. *Genomics Data*, 11, 92–94. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.11.022>
- Banaszak, A. T., & Trench, R. K. (1995). Effects of ultraviolet (UV) radiation on marine microalgal-invertebrate symbioses. II. The synthesis of mycosporine-like amino acids in response to exposure to UV in *Anthopleura elegantissima* and *Cassiopeia xamachana*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 194(2), 233–250. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00073-9](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00073-9)
- Barnes, D. K., & Chalker, B. E. (1990). Calcification and photosynthesis in reef-building corals and algae. En Z. Dubinsky (Ed.), *Ecosystems of the World: Coral Reefs*, Vol. 25, pp. 109–131. <https://www.sciencedirect.com/bookseries/ecosystems-of-the-world/vol/25/suppl/C>
- Barragan, Y., Sanchez, C., & Rodríguez, E. (2019). First inventory of sea anemones (Cnidaria: Actiniaria) from La Paz Bay, southern Gulf of California (Mexico). *Zootaxa*, 4559(3), 501-549. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4559.3.4>
- Bates, A. (2000). The intertidal distribution of two algal symbionts hosted by *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt 1835). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 249(2), 249–262. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00203-3](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00203-3)
- Bates, A. E., Mclean, L., Laing, P., Raeburn, L. A., & Hare, C. (2010). Distribution Patterns of Zoochlorellae and Zooxanthellae Hosted by Two Pacific Northeast Anemones, *Anthopleura elegantissima* and *A. xanthogrammica*. *The Biological Bulletin*, 218(3), 237–247. <https://doi.org/10.1086/BBLv218n3p237>
- Batley, J. F., & Patton, J. S. (1984). A reevaluation of the role of glycerol in carbon translocation in zooxanthellae-coelenterate symbiosis. *Marine Biology*, 79(1), 27–38. <https://doi.org/10.1007/BF00404982>

- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1997). Oxidative Decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19633–19636. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.32.19633>
- Bergschneider, H., & Muller-parker, G. (2008). Nutritional Role of Two Algal Symbionts in the Temperate Sea Anemone *Anthopleura elegantissima* Brandt. *The Biological Bulletin*, 215(1), 73–88. <https://doi.org/10.2307/25470685>
- Berkelmans, R., & van Oppen, M. J. H. (2006). The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a ‘nugget of hope’ for coral reefs in an era of climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1599), 2305–2312. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3567>
- Bingham, B. L., Dimond, J. L., & Muller-Parker, G. (2014). Symbiotic state influences life-history strategy of a clonal cnidarian. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1789), 1–8. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0548>
- Bingham, B. L., Freytes, I., Emery, M., Dimond, J., & Muller-Parker, G. (2011). Aerial exposure and body temperature of the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Invertebrate Biology*, 130(4), 291–301. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2011.00241.x>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Blanchette, C. A., Melissa Miner, C., Raimondi, P. T., Lohse, D., Heady, K. E. K., & Broitman, B. R. (2008). Biogeographical patterns of rocky intertidal communities along the Pacific coast of North America. *Journal of Biogeography*, 35(9), 1593–1607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.01913.x>
- Boyko, A., & Kovalchuk, I. (2011). Genome instability and epigenetic modification—heritable responses to environmental stress? *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 260–266. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.03.003>
- Brandt, J. F. (1835). Prodrum descriptionis animalium ab H. Mertensio observatorum : fascic. I. Polypos, Acalephas Discophoras et Siphonophoras, nec non Echinodermata continens. *Recueil Des Actes de La Séance Publique de l'Académie Impériale Des Sciences de St. Pétersbourg*, 201–275. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.10196>
- Bucher, M., Wolfowicz, I., Voss, P. A., Hambleton, E. A., & Guse, A. (2016). Development and Symbiosis Establishment in the Cnidarian Endosymbiosis Model *Aiptasia* sp. *Scientific Reports*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep19867>
- Buchsbaum, V. M. (1968). *Behavioral and physiological responses to light by the sea anemone Anthopleura elegantissima as related to its algal endosymbionts*. [Tesis doctoral, Universidad de Stanford]. Stanford University. <http://hdl.handle.net/1834/20371>
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J.-L. (1997). Oxidative damage to DNA: Formation, measurement, and biological significance. In *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology, Volume 131* (pp. 1–87). https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5_5
- Carlgren, O. (1951). The Actinian Fauna of the Gulf of California. *Proceedings of the United States National Museum*, 101(3282), 415–449, figures 78–84, plate 14. <https://doi.org/10.5479/si.00963801.101-3282.415>

- Carlgren, O. (1949). A survey of the Ptychodactiaria, Corallimorpharia and Actiniaria. *Kungl. Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 3, 1–121. https://www.google.com.mx/books/edition/A_Survey_of_the_Ptychodactiaria_Corallim/duALAQA-AIAAJ?hl=es&gbpv=0&bsq=A%20survey%20of%20the%20Ptychodactiaria,%20Corallimorpharia%20and%20Actiniaria.
- Carlton, J. T. (Ed.). (2023). *The Light and Smith manual: intertidal invertebrates from central California to Oregon*. <https://www.ucpress.edu/books/the-light-and-smith-manual/hardcover>
- Casado-Amezúa, P., Terrón-Sigler, A., Pinzón, J. H., Furla, P., Forcioli, D., Allemand, D., Ribes, M., & Coma, R. (2016). General Ecological Aspects of Anthozoan-Symbiodinium Interactions in the Mediterranean Sea. In *The Cnidaria, Past, Present and Future* (pp. 375–386). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31305-4_24
- Castel, S. E., & Martienssen, R. A. (2013). RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 14(2), 100–112. <https://doi.org/10.1038/nrg3355>
- Chen, W.-N. U., Hsiao, Y.-J., Mayfield, A. B., Young, R., Hsu, L.-L., & Peng, S.-E. (2016). Transmission of a heterologous clade C *Symbiodinium* in a model anemone infection system via asexual reproduction. *PeerJ*, 4, 1-10. <https://doi.org/10.7717/peerj.2358>
- Chinnusamy, V., & Zhu, J.-K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.12.006>
- Clarke, D. N., Rose, N. H., De Meulenaere, E., Rosental, B., Pearce, J. S., Pearce, V. B., & Deheyn, D. D. (2024). Fluorescent proteins generate a genetic color polymorphism and counteract oxidative stress in intertidal sea anemones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(11), 1-11. <https://doi.org/10.1073/pnas.2317017121>
- Coffroth, M. A., & Santos, S. R. (2005). Genetic Diversity of Symbiotic Dinoflagellates in the Genus *Symbiodinium*. *Protist*, 156(1), 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.02.004>
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M., & Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195–1214. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0752rev>
- Cornwell, B. H. (2020). Gene flow in the anemone *Anthopleura elegantissima* limits signatures of local adaptation across an extensive geographic range. *Molecular Ecology*, 29(14), 2550–2566. <https://doi.org/10.1111/mec.15506>
- Cornwell, B. H., Beraut, E., Fairbairn, C., Nguyen, O., Marimuthu, M. P. A., Escalona, M., & Toffelmier, E. (2022). Reference genome assembly of the sunburst anemone, *Anthopleura sola*. *Journal of Heredity*, 113(6), 699–705. <https://doi.org/10.1093/jhered/esac050>
- Cornwell, B. H., & Hernández, L. (2021). Genetic structure in the endosymbiont *Breviolum 'muscatinei'* is correlated with geographical location, environment and host species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1946), 1-9. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2896>
- Cruz-Motta, J. J., Miloslavich, P., Palomo, G., Iken, K., Konar, B., Pohle, G., Trott, T., Benedetti-Cecchi, L., Herrera, C., Hernández, A., Sardi, A., Bueno, A., Castillo, J., Klein, E., Guerra-Castro, E., Gobin, J.,

- Gómez, D. I., Riosmena-Rodríguez, R., Mead, A., ... Shirayama, Y. (2010). Patterns of Spatial Variation of Assemblages Associated with Intertidal Rocky Shores: A Global Perspective. *PLoS ONE*, 5(12), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014354>
- Cubillos, V. M., Burritt, D. J., Lamare, M. D., & Peake, B. M. (2015). The relationship between UV-irradiance, photoprotective compounds and DNA damage in two intertidal invertebrates with contrasting mobility characteristics. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 149, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.06.001>
- Cubillos, V. M., Ramírez, F. E., Mardones-Toledo, D. A., Valdivia, N., Chaparro, O. R., Montory, J. A., & Cruces, E. A. (2023). Specific plasticity of the anemone *Anthopleura hermaphrodita* to intertidal and subtidal environmental conditions of the Quempillén estuary. *PLOS ONE*, 18(1), e0279482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0279482>
- Cunning, R., Silverstein, R. N., & Baker, A. C. (2015). Investigating the causes and consequences of symbiont shuffling in a multi-partner reef coral symbiosis under environmental change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1809), 20141725. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1725>
- Cunning, R., Silverstein, R. N., & Baker, A. C. (2018). Symbiont shuffling linked to differential photochemical dynamics of Symbiodinium in three Caribbean reef corals. *Coral Reefs*, 37(1), 145–152. <https://doi.org/10.1007/s00338-017-1640-3>
- Daly, M. (2004). Phylogeny and biogeography of *Anthopleura* in the North Atlantic Ocean. *Hydrobiologia*, 530–531(1–3), 241–248. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-2638-8>
- Daly, M., Crowley, L. M., Larson, P., Rodríguez, E., Heestand Saucier, E., & Fautin, D. G. (2017). *Anthopleura* and the phylogeny of Actinioidea (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria). *Organisms Diversity & Evolution*, 17(3), 545–564. <https://doi.org/10.1007/s13127-017-0326-6>
- Daly, M., & Fautin, D. G. (2019). World list of Actiniaria. *World Register of Marine Species*. Retrieved August 28, 2025, from <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1360>
- Dana, J. D. (1846). *Zoophytes*. C. Sherman. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.70845>
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 57(5), 779–795. <https://doi.org/10.1007/s000180050041>
- Davalli, P., Marverti, G., Lauriola, A., & D’Arca, D. (2018). Targeting Oxidatively Induced DNA Damage Response in Cancer: Opportunities for Novel Cancer Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018(1). <https://doi.org/10.1155/2018/2389523>
- Davies, S. W., Gamache, M. H., Howe-Kerr, L. I., Kriefall, N. G., Baker, A. C., Banaszak, A. T., Bay, L. K., Bellantuono, A. J., Bhattacharya, D., Chan, C. X., Claar, D. C., Coffroth, M. A., Cunning, R., Davy, S. K., del Campo, J., Díaz-Almeyda, E. M., Frommlet, J. C., Fuess, L. E., González-Pech, R. A., ... Parkinson, J. E. (2023). Building consensus around the assessment and interpretation of Symbiodiniaceae diversity. *PeerJ*, 11, 1-77. <https://doi.org/10.7717/peerj.15023>
- Davy, S. K., Allemand, D., & Weis, V. M. (2012). Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 229–261. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>

- Dayton, P. K. (1971). Competition, Disturbance, and Community Organization: The Provision and Subsequent Utilization of Space in a Rocky Intertidal Community. *Ecological Monographs*, 41(4), 351–389. <https://doi.org/10.2307/1948498>
- Denis, H., Selmoni, O., Gossuin, H., Jauffrais, T., Butler, C. C., Lecellier, G., & Berteaux-Lecellier, V. (2024). Climate adaptive loci revealed by seascape genomics correlate with phenotypic variation in heat tolerance of the coral *Acropora millepora*. *Scientific Reports*, 14(1), 22179. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67971-1>
- Dimond, J. L., Bingham, B. L., le Muller-Parker, G., & Oakley, C. A. (2013). Symbiont physiology and population dynamics before and during symbiont shifts in a flexible algal-cnidarian symbiosis. *Journal of Phycology*, 49(6), 1074–1083. <https://doi.org/10.1111/jpy.12112>
- Dimond, J. L., Bingham, B. L., Muller-Parker, G., Wuesthoff, K., & Francis, L. (2011). Seasonal stability of a flexible algal–cnidarian symbiosis in a highly variable temperate environment. *Limnology and Oceanography*, 56(6), 2233–2242. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.6.2233>
- Dimond, J. L., Nguyen, N., & Roberts, S. B. (2021). DNA methylation profiling of a cnidarian-algal symbiosis using nanopore sequencing. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 11(7). <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab148>
- Dimond, J. L., Orechovesky, S., Oppenheimer, J., Rodríguez-Ramos, J., & Bingham, B. L. (2017). Photophysiology and hydrogen peroxide generation of the dinoflagellate and chlorophyte symbionts of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 489, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2017.01.008>
- Dimond, J. L., & Roberts, S. B. (2016). Germline <sc>DNA</sc> methylation in reef corals: patterns and potential roles in response to environmental change. *Molecular Ecology*, 25(8), 1895–1904. <https://doi.org/10.1111/mec.13414>
- Dixon, G. B., Bay, L. K., & Matz, M. V. (2014). Bimodal signatures of germline methylation are linked with gene expression plasticity in the coral *Acropora millepora*. *BMC Genomics*, 15(1), 1109. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1109>
- Dixon, G. B., Bay, L. K., & Matz, M. V. (2016). Evolutionary Consequences of DNA Methylation in a Basal Metazoan. *Molecular Biology and Evolution*, 33(9), 2285–2293. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw100>
- Dizdaroglu, M. (1991). Chemical determination of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(3–4), 225–242. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90080-M](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90080-M)
- Dougan, K. E., Bellantuono, A. J., Kahlke, T., Abbriano, R. M., Chen, Y., Shah, S., Granados-Cifuentes, C., van Oppen, M. J. H., Bhattacharya, D., Suggett, D. J., Rodriguez-Lanetty, M., & Chan, C. X. (2022). Whole-genome duplication in an algal symbiont bolsters coral heat tolerance. *Science Advances*, 10(29), 1–12 <https://doi.org/10.1101/2022.04.10.487810>
- Downs, C. A., Fauth, J. E., Halas, J. C., Dustan, P., Bemiss, J., & Woodley, C. M. (2002). Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(4), 533–543. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00907-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00907-3)

- Duchassaing de Fonbressin, P., & Michelotti, G. (1860). *Mémoire sur les coralliaires des Antilles*. De l'imprimerie royale. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.11388>
- Dungan, A. M., Hartman, L. M., Tortorelli, G., Belderok, R., Lamb, A. M., Pisan, L., McFadden, G. I., Blackall, L. L., & van Oppen, M. J. H. (2020). *Exaiptasia diaphana* from the great barrier reef: a valuable resource for coral symbiosis research. *Symbiosis*, 80(2), 195–206. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00665-0>
- Durazo, R., Flores-Vidal, X., Castro, R., Ocampo-Torres, F. J., Saavedra, J., Rodríguez-Padilla, I., & Larrañaga, M. (2024). Surface circulation in Todos Santos Bay, Baja California, México. *Continental Shelf Research*, 273, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2024.105171>
- Dyken, J. A., & Shick, J. M. (1982). Oxygen production by endosymbiotic algae controls superoxide dismutase activity in their animal host. *Nature*, 297(5867), 579–580. <https://doi.org/10.1038/297579a0>
- Dyken, J. A., & Shick, J. M. (1984). Photobiology of the symbiotic sea anemone, *Anthopleura elegantissima*: defenses against photodynamic effects, and seasonal photoacclimatization. *The Biological Bulletin*, 167(3), 683–697. <https://doi.org/10.2307/1541419>
- Eirin-Lopez, J. M., & Putnam, H. M. (2019). Marine Environmental Epigenetics. *Annual Review of Marine Science*, 11(1), 335–368. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010318-095114>
- Engelbreton, H. P., & Muller-Parker, G. (1999). Translocation of Photosynthetic Carbon From Two Algal Symbionts to the Sea Anemone *Anthopleura elegantissima*. *The Biological Bulletin*, 197(1), 72–81. <https://doi.org/10.2307/1542998>
- Epe, B. (1995). *DNA damage profiles induced by oxidizing agents*. In H. Sies (Ed.) *Oxidative stress*. Academic Press 223–249. <https://doi.org/10.1007/BFb0048268>
- Espinoza, J. D. (2023). *How Seasonality and Intertidal Positioning Impact Anemone Anthopleura sola Symbiosis with Photosynthetic Algae* [Doctoral dissertation, San Francisco State University]. <https://doi.org/10.46569/rj430c52q>
- Espinoza, M. L. A., Medina, F. G., & Buenrostro, A. A. (1991). Wind-induced circulation in Todos Santos bay, BC, Mexico. *Atmósfera*, 4(2), 101–115. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/4119836>
- Feil, R., & Fraga, M. F. (2012). Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 2, pp. 97–109). <https://doi.org/10.1038/nrg3142>
- Fernández-Aldecoa, R., Lada, L., Morgan, S., Morgan, S., & Filonov, A. (2019). Delivery of zooplankton to the surf zone during strong internal tidal forcing and onshore winds in Baja California. *Marine Ecology Progress Series*, 625, 15–26. <https://doi.org/10.3354/meps13034>
- Fitt, W. K., Pardy, R. L., & Littler, M. M. (1982). Photosynthesis, respiration, and contribution to community productivity of the symbiotic sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 61(3), 213–232. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(82\)90070-3](https://doi.org/10.1016/0022-0981(82)90070-3)
- Francis, L. (1979). Contrast Between Solitary and Clonal Lifestyles in the Sea Anemone *Anthopleura elegantissima*. *American Zoologist*, 19(3), 669–681. <https://doi.org/10.1093/icb/19.3.669>

- Franco, R., Schoneveld, O., Georgakilas, A. G., & Panayiotidis, M. I. (2008). Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters*, 266(1), 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.026>
- Gan, G. N., Wittschieben, J. P., Wittschieben, B. Ø., & Wood, R. D. (2008). DNA polymerase zeta (pol ζ) in higher eukaryotes. *Cell Research*, 18(1), 174–183. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.117>
- García-Pamanes, L., y Chee-Barragán, G. (1976). Ecología de la zona de entremareas de la Bahía de Todos Santos*. *Ciencias Marinas*, 3(1), 10–29. <https://doi.org/10.7773/cm.v3i1.295>
- Gavery, M. R., & Roberts, S. B. (2010). DNA methylation patterns provide insight into epigenetic regulation in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *BMC Genomics*, 11(1), 483. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-483>
- Geller, J. B., & Walton, E. D. (2001). Breaking up and getting together: Evolution of symbiosis and cloning by fission in sea anemones (genus anthopleura). *Evolution*, 55(9), 1781–1794. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00827.x>
- Ghalambor, C. K., Hoke, K. L., Ruell, E. W., Fischer, E. K., Reznick, D. N., & Hughes, K. A. (2015). Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, 525(7569), 372–375. <https://doi.org/10.1038/nature15256>
- Gómez-Gutiérrez, C. M., & Guerra-Rivas, G. (2010). Uptake and biochemical response to B[a]P in the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45(1), 42–48. <https://doi.org/10.1080/10934520903388715>
- González, J. I., Soto, R., & J. Ochoa. (2006). *Predicción de Mareas en México*. Oceanografía Física. CICESE.
- Gonzalez-Romero, R., Suarez-Ulloa, V., Rodriguez-Casariago, J., Garcia-Souto, D., Diaz, G., Smith, A., Pasantes, J. J., Rand, G., & Eirin-Lopez, J. M. (2017). Effects of Florida Red Tides on histone variant expression and DNA methylation in the Eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Aquatic Toxicology*, 186, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.03.006>
- Goulet, T. L., LaJeunesse, T. C., & Fabricius, K. E. (2008). Symbiont specificity and bleaching susceptibility among soft corals in the 1998 Great Barrier Reef mass coral bleaching event. *Marine Biology*, 154(5), 795–804. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-0972-5>
- Greer, E. L., & Shi, Y. (2012). Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 343–357. <https://doi.org/10.1038/nrg3173>
- Hand, C. (1955). The sea anemones of Central California. Part II. The endomyarian and mesomyarian anemones. *Journal of Biology*, Vol. 13, 37–99. <https://digitalcollections.usfca.edu/digital/collection/p15129coll11/id/223>
- Hawkins, C. L., & Davies, M. J. (2019). Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19683–19708. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006217>
- Hawkins, T. D., & Warner, M. E. (2017). Warm-preconditioning protects against acute heat-induced respiratory dysfunction and delays bleaching in a symbiotic sea anemone. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.150391>

- Hiebert, T. C., & Bingham, B. L. (2012). The effects of symbiotic state on heterotrophic feeding in the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Marine Biology*, 159(5), 939–950. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1871-8>
- Hiebert, T. C., Butler, B. A., & Shanks, A. L. (2015). *Oregon estuarine invertebrates: Rudys' illustrated guide to common species*. (3rd ed.). Oregon Estuarine Invertebrates. <https://www.vliz.be/imisdocs/publications/379684.pdf>
- Hoadley, K. D., Pettay, D. T., Grottoli, A. G., Cai, W.-J., Melman, T. F., Levas, S., Schoepf, V., Ding, Q., Yuan, X., Wang, Y., Matsui, Y., Baumann, J. H., & Warner, M. E. (2016). High-temperature acclimation strategies within the thermally tolerant endosymbiont *Symbiodinium trenchii* and its coral host, *Turbinaria reniformis*, differ with changing pCO₂ and nutrients. *Marine Biology*, 163(6), 134. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2909-8>
- Hoadley, K. D., Pettay, Daniel. T., Lewis, A., Wham, D., Grasso, C., Smith, R., Kemp, D. W., LaJeunesse, T., & Warner, M. E. (2021). Different functional traits among closely related algal symbionts dictate stress endurance for vital Indo-Pacific reef-building corals. *Global Change Biology*, 27(20), 5295–5309. <https://doi.org/10.1111/gcb.15799>
- Hochachka, P. W., & Somero, G. N. (2002). *Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution*. (Oxford University Press, Ed.).
- Hofmann, G. E. (2017). Ecological epigenetics in marine metazoans. In *Frontiers in Marine Science* (Vol. 4, Issue JAN). Frontiers Media S. A. <https://doi.org/10.3389/fmars.2017.00004>
- Howe-Kerr, L. I., Bachelot, B., Wright, R. M., Kenkel, C. D., Bay, L. K., & Correa, A. M. S. (2020). Symbiont community diversity is more variable in corals that respond poorly to stress. *Global Change Biology*, 26(4), 2220–2234. <https://doi.org/10.1111/gcb.14999>
- Howells, E. (2011). *Coral symbionts in warming seas: population dynamics, adaptation and acclimatisation of Symbiodinium* [Doctoral dissertation, James Cook University]. <https://doi.org/10.25903/t5j8-gp81>
- Huang, Y., Gao, B., Long, C., Wang, Y., Long, L., & Yang, F. (2024). The growth and nitrogen utilization strategies in two dominant Symbiodiniaceae species facing nitrogen deficiency and enrichment. *Algal Research*, 84, 103–772. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103772>
- Ibarra-Macias, B., & Montañó-Moctezuma, G. (2024). Black abalone status in Baja California. Are there recovery signals for a sustainable harvest? *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 7(4), e74815. <https://doi.org/10.34188/bjaerv7n4-078>
- Iglesias-Prieto, R., Matta, J. L., Robins, W. A., & Trench, R. K. (1992). Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(21), 10302–10305. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10302>
- Ishida-Castañeda, J., Iguchi, A., & Sakai, K. (2023). Changes in DNA methylation in response to heat stress and symbiotic conditions in coral primary polyps. *Marine Ecology Progress Series*, 714, 113–117. <https://doi.org/10.3354/meps14344>

- Ito, F., Sono, Y., & Ito, T. (2019). Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants*, 8(3), 72. <https://doi.org/10.3390/antiox8030072>
- Jacobovitz, M. R., Hambleton, E. A., & Guse, A. (2023). Unlocking the Complex Cell Biology of Coral–Dinoflagellate Symbiosis: A Model Systems Approach. *Annual Review of Genetics*, 57(1), 411–434. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-072320-125436>
- Jeltsch, A., & Jurkowska, R. Z. (2016). Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases – a new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Research*, 44(18), 8556–8575. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw723>
- Johnson, M. E. (2024). Ecology of Intertidal Rocky Shores Related to Examples of Coastal Geology across Phanerozoic Time. *Journal of Marine Science and Engineering*, 12(8), 1399. <https://doi.org/10.3390/jmse12081399>
- Johnson, R. E., Washington, M. T., Haracska, L., Prakash, S., & Prakash, L. (2000). Eukaryotic polymerases ϵ and ζ act sequentially to bypass DNA lesions. *Nature*, 406(6799), 1015–1019. <https://doi.org/10.1038/35023030>
- Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., & Pérez-Lebeña, E. (2021). The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4642. <https://doi.org/10.3390/ijms22094642>
- Kalsom, M., & Mehman, B. (2020). The Environmental Effects of Sea Pollution on Microorganisms. *Medbiotech Journal*, 4(04), 161–168. <https://doi.org/10.22034/mbt.2020.122172>
- Kaplanis, N. J. (2023). Insight into best practices: a review of long-term monitoring of the rocky intertidal zone of the Northeast Pacific Coast. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1182562>
- Kaplanis, N. J., Denny, M. W., & Raimondi, P. T. (2024). Vertical Distribution of Rocky Intertidal Organisms Shifts With Sea-Level Variability on the Northeast Pacific Coast. *Global Change Biology*, 30(10). <https://doi.org/10.1111/gcb.17527>
- Kellogg, R. B., & Patton, J. S. (1983). Lipid droplets, medium of energy exchange in the symbiotic anemone *Condylactis gigantea*: a model coral polyp. *Marine Biology*, 75(2–3), 137–149. <https://doi.org/10.1007/BF00405996>
- Koch, J. C., Verde, E. A., & Weis, V. M. (2020). Carbonic anhydrases are influenced by the size and symbiont identity of the aggregating sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.221424>
- Ladah, L. B., Filonov, A., Lavín, M. F., Leichter, J. J., Zertuche-González, J. A., & Pérez-Mayorga, D. M. (2012). Cross-shelf transport of sub-thermocline nitrate by the internal tide and rapid (3–6h) incorporation by an inshore macroalga. *Continental Shelf Research*, 42, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2012.03.010>

- Ladah, L., Tapia, F., Pineda, J., & López, M. (2005). Spatially heterogeneous, synchronous settlement of *Chthamalus* spp. larvae in northern Baja California. *Marine Ecology Progress Series*, 302, 177–185. <https://doi.org/10.3354/meps302177>
- LaJeunesse, T. C., Loh, W. K. W., van Woesik, R., Hoegh-Guldberg, O., Schmidt, G. W., & Fitt, W. K. (2003). Low symbiont diversity in southern Great Barrier Reef corals, relative to those of the Caribbean. *Limnology and Oceanography*, 48(5), 2046–2054. <https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.5.2046>
- LaJeunesse, T. C., Parkinson, J. E., Gabrielson, P. W., Jeong, H. J., Reimer, J. D., Voolstra, C. R., & Santos, S. R. (2018). Systematic Revision of Symbiodiniaceae Highlights the Antiquity and Diversity of Coral Endosymbionts. *Current Biology*, 28(16), 2570–2580. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.07.008>
- LaJeunesse, T. J. M. B. (2002). Diversity and community structure of symbiotic dinoflagellates from Caribbean coral reefs. *Marine Biology*, 141(2), 387–400. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0829-2>
- Lajeunesse, T., & Trench, R. (2000). Biogeography of two species of Symbiodinium (Freudenthal) inhabiting the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *The Biological Bulletin*, 199(2), 126–134. <https://doi.org/10.2307/1542872>
- Largier, J. L. (2020). Upwelling Bays: How Coastal Upwelling Controls Circulation, Habitat, and Productivity in Bays. *Annual Review of Marine Science*, 12(1), 415–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010419-011020>
- Leggat, W., Marendy, E. M., Baillie, B., Whitney, S. M., Ludwig, M., Badger, M. R., & Yellowlees, D. (2002). Dinoflagellate symbioses: strategies and adaptations for the acquisition and fixation of inorganic carbon. *Functional Plant Biology*, 29(3), 309. <https://doi.org/10.1071/PP01202>
- Lehnert, E. M., Mouchka, M. E., Burriesci, M. S., Gallo, N. D., Schwarz, J. A., & Pringle, J. R. (2014). Extensive Differences in Gene Expression Between Symbiotic and Aposymbiotic Cnidarians. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 4(2), 277–295. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009084>
- Lesser, M. P. (1997). Oxidative stress causes coral bleaching during exposure to elevated temperatures. *Coral Reefs*, 16(3), 187–192. <https://doi.org/10.1007/s003380050073>
- Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annual Review of Physiology*, 68(1), 253–278. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.110001>
- Lesser, M. P. (2019). Phylogenetic signature of light and thermal stress for the endosymbiotic dinoflagellates of corals (Family Symbiodiniaceae). *Limnology and Oceanography*, 64(5), 1852–1863. <https://doi.org/10.1002/lno.11155>
- Li, Y., Liew, Y. J., Cui, G., Cziesselski, M. J., Zahran, N., Michell, C. T., Voolstra, C. R., & Aranda, M. (2018). DNA methylation regulates transcriptional homeostasis of algal endosymbiosis in the coral model *Aiptasia*. *Science Advances*, 4(8), 1–11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat2142>
- Liew, Y. J., Howells, E. J., Wang, X., Michell, C. T., Burt, J. A., Idaghdour, Y., & Aranda, M. (2020). Intergenerational epigenetic inheritance in reef-building corals. *Nature Climate Change*, 10(3), 254–259. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0687-2>

- Manchenko, G. P., Dautova, T. N., & Latypov, Y. Y. (2000). High level of genetic divergence between sympatric color morphs of the littoral sea anemone *Anthopleura orientalis* (Anthozoa: Actiniaria). *Biochemical Systematics and Ecology*, 28(8), 737–750. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(99\)00120-9](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(99)00120-9)
- Marzonie, M. R., Nitschke, M. R., Bay, L. K., Bourne, D. G., & Harrison, H. B. (2024). Symbiodiniaceae diversity varies by host and environment across thermally distinct reefs. *Molecular Ecology*, 33(9). <https://doi.org/10.1111/mec.17342>
- Matthews, J. L., Crowder, C. M., Oakley, C. A., Lutz, A., Roessner, U., Meyer, E., Grossman, A. R., Weis, V. M., & Davy, S. K. (2017). Optimal nutrient exchange and immune responses operate in partner specificity in the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(50), 13194–13199. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710733114>
- McFadden, C. S., Grosberg, R. K., Cameron, B. B., Karlton, D. P., & Secord, D. (1997). Genetic relationships within and between clonal and solitary forms of the sea anemone *Anthopleura elegantissima* revisited: evidence for the existence of two species. *Marine Biology*, 128(1), 127–139. <https://doi.org/10.1007/s002270050076>
- McGinty, E. S., Pieczonka, J., & Mydlarz, L. D. (2012). Variations in Reactive Oxygen Release and Antioxidant Activity in Multiple Symbiodinium Types in Response to Elevated Temperature. *Microbial Ecology*, 64(4), 1000–1007. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0085-z>
- Menge, B. A., & Branch G. M. (2001). *Rocky intertidal communities*. In: Bertness MD, Gaines SD, Hay ME (eds.), *Marine Community Ecology* (Sinauer Associates, Ed.). <https://www.scielo.sa.cr/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S0034-7744200700010001800014&lng=en&pid=S0034-77442007000100018>
- Merle, P.-L., Sabourault, C., Richier, S., Allemand, D., & Furla, P. (2007). Catalase characterization and implication in bleaching of a symbiotic sea anemone. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2), 236–246. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.10.038>
- Meyer, E., & Weis, V. M. (2012). Study of Cnidarian-Algal Symbiosis in the “Omics” Age. *The Biological Bulletin*, 223(1), 44–65. <https://doi.org/10.1086/BBLv223n1p44>
- Mieszkowska, N., Burrows, M. T., Hawkins, S. J., & Sugden, H. (2021). Impacts of Pervasive Climate Change and Extreme Events on Rocky Intertidal Communities: Evidence From Long-Term Data. *Frontiers in Marine Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.642764>
- Mihirogi, Y., Kaneda, M., Yamagishi, D., Ishii, Y., Maruyama, S., Nakamura, S., Shimoyama, N., Oohori, C., & Hatta, M. (2023). Establishment of a New Model Sea Anemone for Comparative Studies on Cnidarian-Algal Symbiosis. *Zoological Science*, 40(3). <https://doi.org/10.2108/zs220099>
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mohammad Aslam, S., Vass, I., & Szabó, M. (2023). Characterization of the Flash-Induced Fluorescence Wave Phenomenon in the Coral Endosymbiont Algae, Symbiodiniaceae. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10), 8712. <https://doi.org/10.3390/ijms24108712>

- Muller-Parker, G., & Davy, S. K. (2001). Temperate and tropical algal-sea anemone symbioses. *Invertebrate Biology*, 120(2), 104–123. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2001.tb00115.x>
- Muscatine, L. (1961). *Some aspects of the relationship between a sea anemone and its symbiotic algae*. University of California [Doctoral dissertation, University of California]. <https://escholarship.org/>
- Muscatine, L. (1980). Productivity of Zooxanthellae. In *Primary Productivity in the Sea* (pp. 381–402). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3890-1_21
- Muscatine L., Falkowski P. G., Porter J. W, & Dubinsky Z. (1984). Fate of photosynthetic fixed carbon in light- and shade-adapted colonies of the symbiotic coral *Stylophora pistillata*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 222(1227), 181–202. <https://doi.org/10.1098/rspb.1984.0058>
- Muscatine L., Gates, R. D., & Ingrid, L. (1994). Do symbiotic dinoflagellates secrete lipid droplets? *Limnology and Oceanography*, 39(4), 925–929. <https://doi.org/10.4319/lo.1994.39.4.0925>
- Muscatine, L., & Porter, J. W. (1977). Reef Corals: Mutualistic Symbioses Adapted to Nutrient-Poor Environments. *BioScience*, 27(7), 454–460. <https://doi.org/10.2307/1297526>
- Muscatine, L., & Weis, V. (1992). Productivity of Zooxanthellae and Biogeochemical Cycles. In *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea* (pp. 257–271). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0762-2_14
- Nawaz, K., Cziesielski, M. J., Mariappan, K. G., Cui, G., & Aranda, M. (2022). Histone modifications and DNA methylation act cooperatively in regulating symbiosis genes in the sea anemone *Aiptasia*. *BMC Biology*, 20(1), 265. <https://doi.org/10.1186/s12915-022-01469-y>
- Nii, C. M., & Muscatine, L. (1997). Oxidative Stress in the Symbiotic Sea Anemone *Aiptasia pulchella* (Carlgren, 1943): Contribution of the Animal to Superoxide Ion Production at Elevated Temperature. *The Biological Bulletin*, 192(3), 444–456. <https://doi.org/10.2307/1542753>
- Nitschke, M. R., Rosset, S. L., Oakley, C. A., Gardner, S. G., Camp, E. F., Suggett, D. J., & Davy, S. K. (2022). *The diversity and ecology of Symbiodiniaceae: A traits-based review* (pp. 55–127). <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2022.07.001>
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99(3), 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)
- Paine, R. T., & Levin, S. A. (1981). Intertidal Landscapes: Disturbance and the Dynamics of Pattern. *Ecological Monographs*, 51(2), 145–178. <https://doi.org/10.2307/2937261>
- Parkinson, J. E., Tivey, T. R., Mandelare, P. E., Adpressa, D. A., Loesgen, S., & Weis, V. M. (2018). Subtle Differences in Symbiont Cell Surface Glycan Profiles Do Not Explain Species-Specific Colonization Rates in a Model Cnidarian-Algal Symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00842>
- Pearse, V. B. (1974a). Modification of sea anemone behavior by symbiotic zooxanthellae: expansion and contraction. *The Biological Bulletin*, 147(3), 641–651. <https://doi.org/10.2307/1540747>

- Pearse, V. B. (1974b). Modification of sea anemone behavior by symbiotic zooxanthellae: phototaxis. *The Biological Bulletin*, 147(3), 630–640. <https://doi.org/10.2307/1540746>
- Pearse, V., & Francis, L. (2000). *Anthopleura sola*, a new species, solitary sibling species to the aggregating sea anemone, *A-elegantissima* (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria: Actiniidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 113(3), 596–608. <https://www.biodiversitylibrary.org/page/35517097>
- Peña, C. (2011). *Estructura de las comunidades del intermareal rocoso asociadas al mejillón *Mytilus californianus* en la costa oeste de Baja California*. [Undergraduate tesis, Universidad Autónoma de Baja California]. https://www.academia.edu/10465366/Estructura_de_las_comunidades_del_intermareal_rocoso_asociadas_al_mejill%C3%B3n_Mytilus_californianus_en_la_costa_oeste_de_Baja_California
- Perez, S., & Weis, V. (2006). Nitric oxide and cnidarian bleaching: an eviction notice mediates breakdown of a symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 209(14), 2804–2810. <https://doi.org/10.1242/jeb.02309>
- Polle, A. (2001). Dissecting the Superoxide Dismutase-Ascorbate-Glutathione-Pathway in Chloroplasts by Metabolic Modeling. Computer Simulations as a Step towards Flux Analysis. *Plant Physiology*, 126(1), 445–462. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.445>
- Putnam, H. M., Davidson, J. M., & Gates, R. D. (2016). Ocean acidification influences host <scp>DNA</scp> methylation and phenotypic plasticity in environmentally susceptible corals. *Evolutionary Applications*, 9(9), 1165–1178. <https://doi.org/10.1111/eva.12408>
- Rädecker, N., Raina, J.-B., Pernice, M., Perna, G., Guagliardo, P., Kilburn, M. R., Aranda, M., & Voolstra, C. R. (2018). Using *Aiptasia* as a Model to Study Metabolic Interactions in Cnidarian-Symbiodinium Symbioses. *Frontiers in Physiology*, 9, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00214>
- Rahman, M. F., Billah, M. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2023). Effects of elevated temperature on 8-OHdG expression in the American oyster (*Crassostrea virginica*): Induction of oxidative stress biomarkers, cellular apoptosis, DNA damage and γ H2AX signaling pathways. *Fish and Shellfish Immunology Reports*, 4, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.fsirep.2022.100079>
- Rando, O. J., & Verstrepen, K. J. (2007). Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance. *Cell*, 128(4), 655–668. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.023>
- Richier, S., Furla, P., Plantivaux, A., Merle, P.-L., & Allemand, D. (2005). Symbiosis-induced adaptation to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, 208(2), 277–285. <https://doi.org/10.1242/jeb.01368>
- Richier, S., Rodriguez-Lanetty, M., Schnitzler, C. E., & Weis, V. M. (2008). Response of the symbiotic cnidarian *Anthopleura elegantissima* transcriptome to temperature and UV increase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 3(4), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2008.08.001>
- Richier, S., Sabourault, C., Courtiade, J., Zucchini, N., Allemand, D., & Furla, P. (2006). Oxidative stress and apoptotic events during thermal stress in the symbiotic sea anemone, *Anemonia viridis*. *The FEBS Journal*, 273(18), 4186–4198. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05414.x>

- Rideb, J. R., Varghese, A., Nguyen, T., Pham, K., Nguyen, I., Herrera, N., Bagnall, R. A., & Rosell, R. (2022). Thermal Stress and Antioxidant Activity in Sea Anemones, *Exaiptasia pallida*. *The FASEB Journal*, 36(S1). <https://doi.org/10.1096/fasebj.2022.36.S1.R6315>
- Rivera-Casas, C., Gonzalez-Romero, R., Garduño, R. A., Cheema, M. S., Ausio, J., & Eirin-Lopez, J. M. (2017). Molecular and Biochemical Methods Useful for the Epigenetic Characterization of Chromatin-Associated Proteins in Bivalve Molluscs. *Frontiers in Physiology*, 8, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00490>
- Roberty, S., Bailleul, B., Berne, N., Franck, F., & Cardol, P. (2014). PSI Mehler reaction is the main alternative photosynthetic electron pathway in *Symbiodinium* sp., symbiotic dinoflagellates of cnidarians. *New Phytologist*, 204(1), 81–91. <https://doi.org/10.1111/nph.12903>
- Rodriguez-Casariago, J. A., Cuning, R., Baker, A. C., & Eirin-Lopez, J. M. (2022). Symbiont shuffling induces differential DNA methylation responses to thermal stress in the coral *Montastraea cavernosa*. *Molecular Ecology*, 31(2), 588–602. <https://doi.org/10.1111/mec.16246>
- Rodriguez-Casariago, J. A., Ladd, M. C., Shantz, A. A., Lopes, C., Cheema, M. S., Kim, B., Roberts, S. B., Fourqurean, J. W., Ausio, J., Burkepile, D. E., & Eirin-Lopez, J. M. (2018). Coral epigenetic responses to nutrient stress: Histone H2A.X phosphorylation dynamics and DNA methylation in the staghorn coral *Acropora cervicornis*. *Ecology and Evolution*, 8(23), 12193–12207. <https://doi.org/10.1002/ece3.4678>
- Rodriguez-Lanetty, M., Loh, W., Carter, D., & Hoegh-Guldberg, O. (2001). Latitudinal variability in symbiont specificity within the widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora*. *Marine Biology*, 138(6), 1175–1181. <https://doi.org/10.1007/s002270100536>
- Rodriguez-Lanetty, M., Phillips, W. S., & Weis, V. M. (2006). Transcriptome analysis of a cnidarian – dinoflagellate mutualism reveals complex modulation of host gene expression. *BMC Genomics*, 7(1), 23. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-23>
- Ros, M., Camp, E. F., Hughes, D. J., Crosswell, J. R., Warner, M. E., Leggat, W. P., & Suggett, D. J. (2020). Unlocking the black-box of inorganic carbon-uptake and utilization strategies among coral endosymbionts (Symbiodiniaceae). *Limnology and Oceanography*, 65(8), 1747–1763. <https://doi.org/10.1002/lno.11416>
- Rosic, N., Delamare-Deboutteville, J., & Dove, S. (2024). Heat stress in symbiotic dinoflagellates: Implications on oxidative stress and cellular changes. *Science of The Total Environment*, 944, 173916. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.173916>
- Rudy, P., Rudy, L. H., Shanks, A., & Butler, B. (2013). *Anthopleura artemisia*. *Oregon Estuarine Invertebrates*, (2nd ed.) Oregon Estuarine Invertebrates, 1 - 869. <https://hdl.handle.net/1794/12638>
- Sanders, J. G., & Palumbi, S. R. (2011). Populations of *Symbiodinium muscatinei* Show Strong Biogeographic Structuring in the Intertidal Anemone *Anthopleura elegantissima*. *The Biological Bulletin*, 220(3), 199–208. <https://doi.org/10.1086/BBLv220n3p199>
- Sarda, S., Zeng, J., Hunt, B. G., & Yi, S. V. (2012). The Evolution of Invertebrate Gene Body Methylation. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1907–1916. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss062>

- Saunders, B. K., & Muller-Parker, G. (1997). The effects of temperature and light on two algal populations in the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt, 1835). In *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* (Vol. 211). [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(96\)02723-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(96)02723-2)
- Scharfenstein, H. J., Alvarez-Roa, C., Peplow, L. M., Buerger, P., Chan, W. Y., & van Oppen, M. J. H. (2023). Chemical mutagenesis and thermal selection of coral photosymbionts induce adaptation to heat stress with trait trade-offs. *Evolutionary Applications*, 16(9), 1549–1567. <https://doi.org/10.1111/eva.13586>
- Schiel, D. R., Steinbeck, J. R., & Foster, M. S. (2004). Ten Years of Induced Ocean Warming Causes Comprehensive Changes in Marine Benthic Communities. In *Source: Ecology* (Vol. 85, Issue 7). <https://doi.org/10.1890/03-3107>
- Schwarz, J. A., Weis, V. M., & Potts, D. C. (2002). Feeding behavior and acquisition of zooxanthellae by planula larvae of the sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Marine Biology*, 140(3), 471–478. <https://doi.org/10.1007/s00227-001-0736-y>
- Sebens, K. P. (1984). Agnostic behavior in the intertidal sea anemone *Anthopleura xanthogrammica*. *The Biological Bulletin*, 166(3), 457–472. <https://doi.org/10.2307/1541154>
- Sebens, K. P., & DeRiemer, K. (1977). Diel cycles of expansion and contraction in coral reef anthozoans. *Marine Biology*, 43(3), 247–256. <https://doi.org/10.1007/BF00402317>
- Secord, D., & Augustine, L. (2000). Biogeography and microhabitat variation in temperate algal-invertebrate symbioses: zooxanthellae and zoochlorellae in two Pacific intertidal sea anemones, *Anthopleura elegantissima* and *A. xanthogrammica*. *Invertebrate Biology*, 119(2), 139–146. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2000.tb00002.x>
- Secord, D., & Muller-Parker, G. (2005). Symbiont distribution along a light gradient within an intertidal cave. *Limnology and Oceanography*, 50(1), 272–278. <https://doi.org/10.4319/lo.2005.50.1.0272>
- Shick, J. M., Dunlap, W. C., Pearse, J. S., & Pearse, V. B. (2002). Mycosporine-like Amino Acid Content in Four Species of Sea Anemones in the Genus *Anthopleura* Reflects Phylogenetic but Not Environmental or Symbiotic Relationships. *The Biological Bulletin*, 203(3), 315–330. <https://doi.org/10.2307/1543574>
- Shick, J. M., & Dykens, J. A. (1984). Photobiology of the symbiotic sea anemone *Anthopleura elegantissima*: photosynthesis, respiration, and behavior under intertidal conditions. *The Biological Bulletin*, 166(3), 608–619. <https://doi.org/10.2307/1541166>
- Skrypnik, N. V., & Maslova, O. O. (2007). Oxidative DNA damage. *Biopolymers and Cell*, 23(3), 202–214. <https://doi.org/10.7124/bc.000766>
- Skvortsova, K., Iovino, N., & Bogdanović, O. (2018). Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12), 774–790. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0074-2>
- Smith, B. L., & Potts, D. C. (1987). Clonal and solitary anemones (*Anthopleura*) of western North America: population genetics and systematics. *Marine Biology*, 94(4), 537–546. <https://doi.org/10.1007/BF00431400>

- Spano, C., & Häussermann, V. (2017). *Anthopleura radians*, a new species of sea anemone (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) from northern Chile, with comments on other species of the genus from the South Pacific Ocean. *Biodiversity and Natural History*, 3(1), 1–11. <https://www.biodiversnathist.com/index.php/bnh/article/view/34>
- Staats, E. G., Clarke, D. N., Pearse, V. B., Govenar, K., De Meulenaere, E., & Deheyn, D. D. (2024). Regulation of Green Fluorescent Proteins by Sea Anemones (*Anthopleura* spp.) in Response to Light. *Integrative And Comparative Biology*, 64(6), 1568–1577. <https://doi.org/10.1093/icb/icae024>
- Stat, M., & Gates, R. D. (2011). Clade D *Symbiodinium* in Scleractinian Corals: A “Nugget” of Hope, a Selfish Opportunist, an Ominous Sign, or All of the Above? *Journal of Marine Biology*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/730715>
- Stat, M., Morris, E., & Gates, R. D. (2008). Functional diversity in coral–dinoflagellate symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(27), 9256–9261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801328105>
- Suggett, D. J., Hall-Spencer, J. M., Rodolfo-Metalpa, R., Boatman, T. G., Payton, R., Tye Pettay, D., Johnson, V. R., Warner, M. E., & Lawson, T. (2012). Sea anemones may thrive in a high CO₂ world. *Global Change Biology*, 18(10), 3015–3025. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02767.x>
- Suggett, D. J., Warner, M. E., Smith, D. J., Davey, P., Hennige, S., & Baker, N. R. (2008). Photosynthesis and production of hydrogen peroxide by *Symbiodinium* (Pyrrhophyta) Phylotypes with different thermal tolerances¹. *Journal of Phycology*, 44(4), 948–956. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00537.x>
- Technau, U., Rudd, S., Maxwell, P., Gordon, P. M. K., Saina, M., Grasso, L. C., Hayward, D. C., Sensen, C. W., Saint, R., Holstein, T. W., Ball, E. E., & Miller, D. J. (2005). Maintenance of ancestral complexity and non-metazoan genes in two basal cnidarians. *Trends in Genetics*, 21(12), 633–639. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.09.007>
- Thornhill, D. J., Xiang, Y., Pettay, D. T., Zhong, M., & Santos, S. R. (2013). Population genetic data of a model symbiotic cnidarian system reveal remarkable symbiotic specificity and vectored introductions across ocean basins. *Molecular Ecology*, 22(17), 4499–4515. <https://doi.org/10.1111/mec.12416>
- Tortorelli, G., Belderok, R., Davy, S. K., McFadden, G. I., & van Oppen, M. J. H. (2020). Host Genotypic Effect on Algal Symbiosis Establishment in the Coral Model, the Anemone *Exaiptasia diaphana*, From the Great Barrier Reef. *Frontiers in Marine Science*, 6(833), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00833>
- Towanda, T., & Thuesen, E. V. (2012). Prolonged exposure to elevated CO₂ promotes growth of the algal symbiont *Symbiodinium muscatinei* in the intertidal sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Biology Open*, 1(7), 615–621. <https://doi.org/10.1242/bio.2012521>
- Valinluck, V., & Sowers, L. C. (2007). Endogenous Cytosine Damage Products Alter the Site Selectivity of Human DNA Maintenance Methyltransferase DNMT1. *Cancer Research*, 67(3), 946–950. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3123>
- Vassallo-Avalos, A., Acuña, F. H., González-Muñoz, R., & Rivas, G. (2020). New record of *Anthopleura radians* Spano & Häussermann, 2017 (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae) from the Mexican Pacific.

- Latin American Journal of Aquatic Research*, 48(5), 869–876. <https://doi.org/10.3856/vol48-issue5-fulltext-2418>
- Vassallo-Avalos, A., González-Muñoz, R., Acuña, F. H., Cervantes-Ramírez, I. I., & Rivas, G. (2022). Intertidal sea anemones (Cnidaria: Actiniaria) from the west coast of the Peninsula of Baja California, Mexico. *Zootaxa*, 5165(2), 151–179. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5165.2.1>
- Vassallo-Avalos, A., González-Muñoz, R., Acuña, F. H., & Rivas, G. (2020a). *Anthopleura mariae* sp. nov. (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae), a New Species of Sea Anemone from the Mexican Pacific. *Pacific Science*, 74(2). <https://doi.org/10.2984/74.2.5>
- Vassallo-Avalos, A., González-Muñoz, R., Acuña, F. H., & Rivas, G. (2020b). *Anthopleura mariae* sp. nov. (Cnidaria: Actiniaria: Actiniidae), a New Species of Sea Anemone from the Mexican Pacific. *Pacific Science*, 74(2). <https://doi.org/10.2984/74.2.5>
- Vassallo-Avalos, A., González-Muñoz, R., Morrone, J. J., Acuña, F. H., Durán-Fuentes, J. A., Stampar, S. N., Solís-Marín, F. A., & Rivas, G. (2024). A new species of *Anthopleura* (Cnidaria: Anthozoa: Actiniaria) from the Mexican Pacific. *Marine Biodiversity*, 54(5), 70. <https://doi.org/10.1007/s12526-024-01464-2>
- Venn, A. A., Loram, J. E., & Douglas, A. E. (2008). Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*, 59(5), 1069–1080. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm328>
- Verde, E. A., & McCloskey, L. R. (1996). Photosynthesis and respiration of two species of algal symbionts in the anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt) (Cnidaria; Anthozoa). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 195(2), 187–202. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00080-1](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00080-1)
- Verde, E. A., & McCloskey, L. R. (2001). A comparative analysis of the photobiology of Zooxanthellae and Zoochlorellae symbiotic with the temperate clonal anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Marine Biology*, 138(3), 477–489. <https://doi.org/10.1007/s002270000490>
- Verde, E. A., & McCloskey, L. R. (2007). A comparative analysis of the photobiology of zooxanthellae and zoochlorellae symbiotic with the temperate clonal anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). III. Seasonal effects of natural light and temperature on photosynthesis and respiration. *Marine Biology*, 152(4), 775–792. <https://doi.org/10.1007/s00227-007-0737-6>
- Verde, E., & McCloskey, L. (2002). A comparative analysis of the photobiology of zooxanthellae and zoochlorellae symbiotic with the temperate clonal anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Marine Biology*, 141(2), 225–239. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0824-7>
- Verrill, A. E. (1869). *Review of the corals and polyps of the west coast of America*. (2nd ed., Vol. 1). Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences.
- Weis, V. M. (2008). Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *Journal of Experimental Biology*, 211(19), 3059–3066. <https://doi.org/10.1242/jeb.009597>
- Weis, V. M., & Levine, R. P. (1996). Differential Protein Profiles Reflect the Different Lifestyles of Symbiotic and Aposymbiotic *Anthopleura Elegantissima*, a Sea Anemone from Temperate Waters. *Journal of Experimental Biology*, 199(4), 883–892. <https://doi.org/10.1242/jeb.199.4.883>

- Weis, V. M., & Reynolds, W. S. (1999). Carbonic Anhydrase Expression and Synthesis in the Sea Anemone *Anthopleura elegantissima* Are Enhanced by the Presence of Dinoflagellate Symbionts. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72(3), 307–316. <https://doi.org/10.1086/316674>
- Weis, V. M., Verde, E. A., Pribyl, A., & Schwarz, J. A. (2002). Aspects of the larval biology of the sea anemones *Anthopleura elegantissima* and *A. artemisia*. *Invertebrate Biology*, 121(3), 190–201. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2002.tb00059.x>
- Weis, V. M., Verde, E. A., Pribyl, A., & Schwarz, J. A. (2005). Aspects of the larval biology of the sea anemones *Anthopleura elegantissima* and *A. artemisia*. *Invertebrate Biology*, 121(3), 190–201. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2002.tb00059.x>
- Wen, J. J., & Garg, N. J. (2018). Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates the mitochondrial ROS production and oxidative damage in Chagas disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), e0006687. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006687>
- Wiweman, H., & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal*, 313(1), 17–29. <https://doi.org/10.1042/bj3130017>
- Wong, J. C. Y., Enríquez, S., & Baker, D. M. (2021). Towards a trait-based understanding of Symbiodiniaceae nutrient acquisition strategies. *Coral Reefs*, 40(2), 625–639. <https://doi.org/10.1007/s00338-020-02034-1>
- Woodhouse, G. S. (2014). *Influence of temperature on the physiological performance of zoochlorellae in two intertidal hosts (Anthopleura elegantissima and A. xanthogrammica)* [Graduate School Collection.]. Western Washington University. <https://cedar.wvu.edu/wwuet/361/>
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 18(9), 517–534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>
- Xiang, T., Lehnert, E., Jinkerson, R. E., Clowez, S., Kim, R. G., DeNofrio, J. C., Pringle, J. R., & Grossman, A. R. (2020). Symbiont population control by host-symbiont metabolic interaction in Symbiodiniaceae-cnidarian associations. *Nature Communications*, 11(1), 108. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13963-z>
- Yan, L. L., & Zaher, H. S. (2019). How do cells cope with RNA damage and its consequences? *Journal of Biological Chemistry*, 294(41), 15158–15171. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006513>
- Zhang, X., & Jacobs, D. (2022). A Broad Survey of Gene Body and Repeat Methylation in Cnidaria Reveals a Complex Evolutionary History. *Genome Biology and Evolution*, 14(2). <https://doi.org/10.1093/gbe/evab284>

Anexos

Tabla 5. Información complementaria de datos biológicos obtenidos en laboratorio: Metilación ADN, Daño al ADN densidad simbiote y parámetros físicos del intermareal.

ID	Mes	Cond	Metilación	Daño ADN	Densidad simbiote	Temperatura	Luz
A1	abril	aposimbiotica	0.580	0.930	1.11E+04	13.48	464.47
A2	abril	aposimbiotica	0.517	0.408	6.16E+03	13.48	464.47
A3	abril	aposimbiotica	0.720	0.251	5.24E+02	13.48	464.47
S2	abril	simbiotica	0.636	0.354	6.12E+04	13.48	464.47
S4	abril	simbiotica	0.794	0.465	6.38E+04	13.48	464.47
S5	abril	simbiotica	0.705	0.378	4.72E+04	13.48	464.47
A2	junio	aposimbiotica	1.084	0.442	1.79E+02	19.80	555.69
A4	junio	aposimbiotica	1.762	0.445	3.42E+02	19.80	555.69
A5	junio	aposimbiotica	1.775	0.457	1.14E+02	19.80	555.69
S1	junio	simbiotica	1.917	0.846	2.47E+04	19.80	555.69
S3	junio	simbiotica	1.192	0.463	4.40E+04	19.80	555.69
S5	junio	simbiotica	1.781	0.419	5.19E+04	19.80	555.69
A3	agosto	aposimbiotica	0.963	0.543	6.19E+04	23.73	534.00
A4	agosto	aposimbiotica	0.778	0.370	4.47E+04	23.73	534.00
A5	agosto	aposimbiotica	1.313	0.440	4.75E+04	23.73	534.00
S1	agosto	simbiotica	0.967	0.367	1.21E+04	23.73	534.00
S3	agosto	simbiotica	0.784	0.347	4.24E+04	23.73	534.00
S5	agosto	simbiotica	1.327	0.494	5.85E+04	23.73	534.00
A2	octubre	aposimbiotica	1.541	0.396	8.59E+02	20.42	233.88
A3	octubre	aposimbiotica	0.926	0.442	2.31E+02	20.42	233.88
A4	octubre	aposimbiotica	1.584	0.719	3.81E+02	20.42	233.88
S2	octubre	simbiotica	0.959	0.491	2.91E+04	20.42	233.88
S3	octubre	simbiotica	0.529	0.297	3.32E+04	20.42	233.88
S5	octubre	simbiotica	0.607	0.321	4.86E+04	20.42	233.88
A3	diciembre	aposimbiotica	1.083	0.481	5.71E+01	17.73	296.16
A4	diciembre	aposimbiotica	0.625	0.320	9.12E+01	17.73	296.16
A5	diciembre	aposimbiotica	0.497	0.144	6.94E+01	17.73	296.16
S2	diciembre	simbiotica	0.599	0.307	2.73E+04	17.73	296.16
S4	diciembre	simbiotica	0.593	0.272	4.79E+04	17.73	296.16
S5	diciembre	simbiotica	0.709	0.325	1.21E+04	17.73	296.16
A3	febrero	aposimbiotica	0.525	0.230	1.40E+02	16.36	360.05
A4	febrero	aposimbiotica	0.733	0.191	6.88E+02	16.36	360.05
A5	febrero	aposimbiotica	0.932	0.378	6.21E+01	16.36	360.05
S2	febrero	simbiotica	0.666	0.533	1.86E+04	16.36	360.05
S3	febrero	simbiotica	0.618	0.479	5.62E+04	16.36	360.05
S5	febrero	simbiotica	0.969	0.318	1.69E+04	16.36	360.05

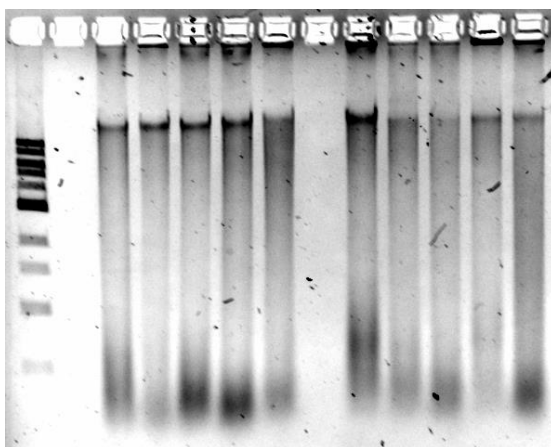


Figura 13. Cantidad de fragmentos de ADN por gel de electroforesis. El carril 1 corresponde al marcador molecular QuickLoad 1 kb. En los carriles 3 – 7 se muestra fragmento de ADN en anémonas aposimbióticas. Los carriles 9 – 13 se muestra fragmento de ADN en anémonas simbióticas. La electroforesis se realizó a 80 volts por 40 min.

Anexo A. Protocolo de separación y homogeneización de simbiote y hospedero

1. Lavado de tejido en PBS

Las muestras de tejido fijadas en RNAlater se descongelan manteniéndolas a 4 °C o sobre hielo. Con ayuda de pinzas de disección, se extrae un tentáculo de anémona del vial y se registra su peso (10–20 mg) utilizando una balanza analítica (OHAUS®, PIONEER™). La muestra se transfiere a un tubo FastPrep de 2 mL que contiene 0.5 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS 3X, pH 7.4), y se deja reposar durante 15 minutos.

Este procedimiento se repite dos veces más: se retira el sobrenadante y se añade nuevamente 0.5 mL de PBS fresco, dejando actuar por 15 minutos en cada lavado. Al finalizar, la muestra está lista para su homogeneización.

2. Homogeneización

Buffer de lisis: Tris 25 mM (pH 7.8), EDTA 1 mM, glicerol al 10% (v/v).

Todos los pasos se realizan a 4 °C o sobre hielo. Tras el lavado, se elimina el sobrenadante de PBS y se añade 0.5 mL de buffer de lisis. La muestra se deja reposar durante 15 minutos, luego se retira el buffer y se añade 1 mL de buffer de lisis fresco para proceder con la homogeneización. Esta se realiza utilizando un batidor de cuentas (FastPrep-24™ 5G, MP Biomedicals) durante 60 segundos a una velocidad de 6 m/s, empleando una perla de vidrio de 4 mm de diámetro.

Después de esta primera homogeneización, se realiza una segunda para separar la epidermis del resto del tejido. Para ello, se transfiere la muestra a un tubo de 1.5 mL y se separa la epidermis, que queda suspendida en el buffer de lisis, utilizando pinzas de disección o la punta de una aguja hipodérmica (23G × 25 mm).

3. Separación

Para separar las fracciones del hospedero y de los simbioses, se centrifugan las muestras homogeneizadas en una microcentrífuga refrigerada (Eppendorf® 5424 R) a 3,000 × g durante 30 segundos a –4 °C. Del sobrenadante se toman 100 µL y se transfieren a un vial cónico de 15 mL.

Posteriormente, se realizan dos centrifugaciones sucesivas a 700 × g durante 10 minutos cada una, también a –4 °C. Los sobrenadantes obtenidos se combinan en el mismo vial y se almacenan a –20 °C.

Finalmente, para aislar los simbios, las células se centrifugan a $16,000 \times g$ durante 20 minutos a -4°C . El sobrenadante se descarta y el pellet (células simbios) se fija con formaldehído al 2% para su posterior cuantificación mediante microscopía.

ANEXO B. Aislamiento de ADN genómico de tejido de anémona simbiótica y aposimbiótica (Estandarización de cantidades de reactivo).

1. Preparación del tejido

Para cada muestra, se selecciona un tentáculo de anémona, fresco o previamente descongelado. Se pesa entre 10 y 20 mg de tejido y se transfiere a un tubo que contenga 300 µL de solución de lisis de núcleos. La muestra se enfría y se homogeneiza durante 10 segundos. A continuación, se añade 0.05 mg/mL de *Proteinasa K* (equivalente a 8.75 µL), y se incuba la mezcla a 65 °C durante 2 a 4 horas.

2. Lisis y precipitación de proteínas

1. (*Paso opcional*) Añadir 3 µL de solución de RNasa al lisado y mezclar suavemente. Incubar a 37 °C durante 15–30 minutos. Luego, enfriar a temperatura ambiente.
2. Añadir 150 µL de solución precipitadora de proteínas, mezclar vigorosamente en vórtex y colocar en hielo durante 20 minutos.
3. Centrifugar a 15,000 × g durante 5 minutos a 4 °C.

3. Precipitación y rehidratación del ADN

1. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio que contenga 350 µL de isopropanol (a temperatura ambiente).
2. Mezclar suavemente por inversión y dejar en hielo durante 15 minutos.
3. Centrifugar a 15,000 × g durante 5 minutos.
4. Descartar el sobrenadante con cuidado. Añadir 150 µL de etanol al 70% (a temperatura ambiente) y mezclar por inversión.
5. Repetir la centrifugación como en el paso anterior.
6. Descartar el sobrenadante y repetir el lavado con otros 150 µL de etanol al 70%.
7. Centrifugar nuevamente a 15,000 × g durante 5 minutos.
8. Retirar completamente el etanol y dejar secar el pellet al aire durante 15 minutos.
9. Rehidratar el ADN en 25 µL de agua libre de nucleasas (milli-Q), incubando durante 1 hora a 65 °C o durante la noche a 4 °C.