

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

La relazione tra simbiosi e plasticità fisiologica
nel corallo temperato *Balanophyllia europaea* in
un ambiente naturalmente acidificato

Tesi di laurea in Fisiologia Molecolare degli Animali Marini

Relatore

Prof.ssa Silvia Franzellitti

Presentata da

Alessia Puglisi

Correlatore

Prof. Stefano Goffredo

INDICE

1	Introduzione.....	5
1.1	Definizione di simbiosi, tipologie e relazioni tra coralli e zooxantelle	5
1.2	Ruolo della simbiosi nella fisiologia del corallo.....	6
1.3	Ruolo nutrizionale di <i>Symbiodinium spp.</i>	6
1.4	Ruolo della simbiosi nel processo di calcificazione.....	9
1.5	Distribuzione del genere <i>Symbiodinium spp.</i>	10
1.6	La simbiosi e lo stress ambientale: influenza della temperatura e del pH	14
2	Scopi del lavoro.....	19
3	Materiali e metodi.....	21
3.1	Il vulcano sottomarino di Panarea come laboratorio naturale per studiare gli effetti dell'acidificazione sui coralli.....	21
3.2	Disegno sperimentale.....	22
3.3	Valutazione dei parametri correlati alla fotosintesi.....	24
3.3.1	Valutazione del contenuto di clorofilla e numero di cellule algali.....	24
3.3.2	Conteggio delle cellule algali.....	25
3.3.3	Concentrazione della clorofilla.....	25
3.3.4	Analisi statistica.....	26
3.4	Amplificazione selettiva della regione ITS2 di <i>Symbiodinium spp.</i> e sequenziamento massivo.....	26
3.4.1	Strategia di amplificazione della regione ITS2.....	26
3.4.2	Sequenziamento massivo MiSeq.....	30
3.4.3	Analisi bioinformatica.....	31
4	Risultati.....	33
4.1	Parametri correlati alla fotosintesi.....	33
4.2	Identificazione dei cladi di <i>Symbiodinium spp.</i> e stima dell'abbondanza relativa.....	33
5	Discussioni e conclusioni.....	37
	Bibliografia.....	41
	Ringraziamenti.....	49

1 INTRODUZIONE

1.1 Definizione di simbiosi, tipologie e relazioni tra coralli e zooxantelle

Il termine “simbiotismo” fu introdotto per la prima volta nel 1877 da Albert Bernhard Frank per descrivere la relazione instaurata tra alghe e funghi nei licheni (Frank 1877). Pochi anni dopo, questo concetto venne modificato e ampliato, includendo anche il parassitismo, ossia un tipo di cooperazione dannosa per uno dei due organismi coinvolti (Trappe 2005).

Attualmente con “simbiosi” si intende una relazione che esiste tra due esseri viventi, appartenenti a specie diverse, che dura per tutto il corso della vita o per la maggior parte di essa (Douglas 2010).

Le interazioni tra organismi possono essere di natura diversa: competizione, parassitismo e predazione. Molti individui risentono di condizioni di stress biotico e/o abiotico e per questa ragione formano alleanze con altri organismi. Ciò spesso porta a un maggior successo ecologico delle specie coinvolte e a una migliore forma fisica degli individui (Connel & Gillanders 2007).

Ci sono tre categorie principali di simbiosi:

- Mutualismo: entrambi i componenti ricevono benefici dalla simbiosi
- Commensalismo: situazione vantaggiosa per un partner
- Parassitismo: beneficio di un organismo a danno dell'altro

La simbiosi può inoltre essere facoltativa, dove gli organismi possono vivere anche separatamente ma traggono maggiori benefici dalla loro interazione, oppure obbligata, quando la sopravvivenza di uno dei partner è strettamente legata alla simbiosi (Baeza 2007).

La simbiosi può essere inoltre classificata in base alla posizione del simbionte: si parla di ectosimbiosi quando il simbionte vive al di fuori del corpo dell'ospite e di endosimbiosi quando esso vive all'interno dell'organismo ospite.

Un esempio di endosimbiosi è quella tra corallo e alghe dinoflagellate unicellulari appartenenti al genere *Symbiodinium spp.* (Freudenthal, 1962) (Baker 2001) (Figura 1). Queste microscopiche alghe vengono chiamate “zooxantelle” a causa del colore brunastro che conferiscono ai loro ospiti (Brown et al., 2002; Perez 2007).

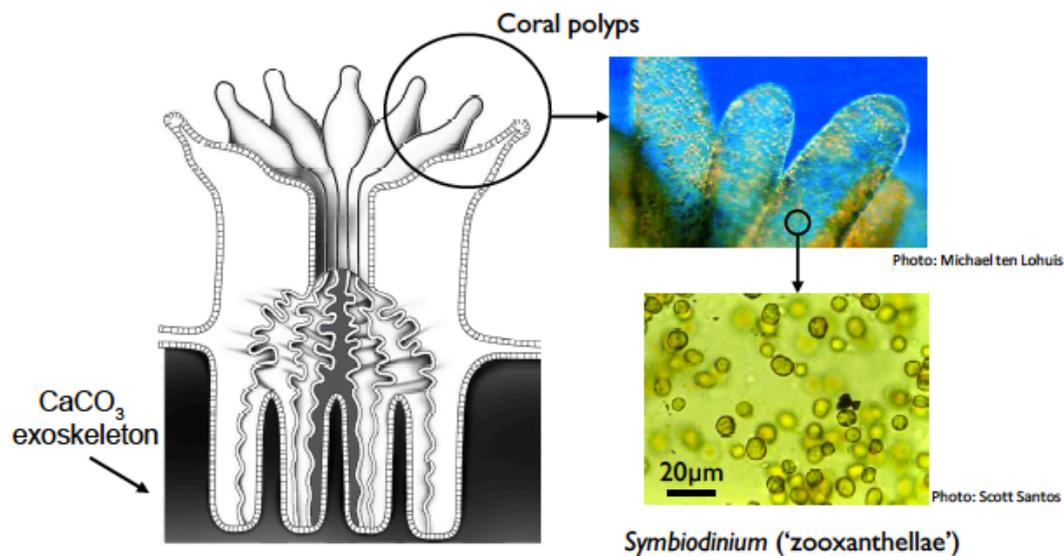


Figura 1. Simbiosi tra ospite (corallo) e simbiote (*Symbiodinium spp.*) (Wooldridge 2012).

1.2 Ruolo della simbiosi nella fisiologia del corallo

La simbiosi tra *Symbiodinium spp.* e i coralli è di tipo mutualistico; l'alga fornisce carbonio fissato grazie alla fotosintesi e il corallo provvede al rifornimento di nutrienti inorganici, che ricava dai metaboliti derivanti dalle sostanze di scarto animali o direttamente dall'acqua di mare (Raharinirina et al., 2017).

1.3 Ruolo nutrizionale di *Symbiodinium spp.*

Analisi effettuate su *Symbiodinium spp.* nella seconda metà degli anni '50 (Muscatine & Hand, 1958), permisero di scoprire che questa zooxantella è in grado di fornire nutrimento al corallo con cui è in simbiosi.

Muscatine et al. (1965) ha dimostrato che *Symbiodinium spp.* produce grandi quantità di carboidrati quando è in simbiosi con altri organismi, mentre quando è libero produce piccole quantità di acido glicolico. Nel corso degli anni '70, gli scienziati hanno stabilito che *Symbiodinium spp.* è in grado di rilasciare prodotti di fotosintesi che venivano utilizzati dai suoi ospiti, riuscendo a individuare e caratterizzare i tipi di metaboliti che esso espelleva (Tabella 1) (Gordon & Leggat, 2010).

Tabella 1. Esempio di metaboliti scambiati nelle relazioni *Symbiodinium spp.* – ospite. (Gordon & Leggat, 2010).

Metabolite	Transport Direction		<i>Symbiodinium</i> specific	Function
	Host to symbiont	Symbiont to host		
Maltose		✓		Nutrition
Glycerol		✓		Nutrition
Glucose and other hexoses		✓		Nutrition
Glycolic acid		✓		Nutrition
Glycine	✓			Nucleotide synthesis and nutrition
Alanine		✓		Protein formation
Acetate	✓			Fatty acid synthesis
Fatty acids		✓		Lipid synthesis
Lipids		✓		Energy exchange
Lactate		✓		Metabolite
Succinate		✓		Krebs cycle
Citrate		✓		Krebs cycle
Ketoglutarate		✓		Krebs cycle
Malate		✓		Krebs cycle
Pyruvate		✓		Glycolysis product
PO ₄ ³⁻	✓			Nutrition
NO ₂ ⁻ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺	✓			Amino acid synthesis
Inorganic carbon (i.e., CO ₂ , HCO ₃ ⁻)	✓			Photosynthesis
O ₂		✓		Photosynthesis
Zooxanthellamide-A and B			✓	Unknown
Mycosporine-like amino acids			✓	UV light and free radical protection
Zooxanthellatoxins			✓	Unknown
Symbioramide-C16			✓	Unknown
Zooxanthellabetaines			✓	Unknown
Zooxanthellamine			✓	Unknown

Trench (1971) ha mostrato come il carbonio fissato tramite la fotosintesi veniva incorporato dall'ospite sotto forma di lipidi e proteine. Il glicerolo è il principale composto extracellulare oltre alla alanina e ad alcuni zuccheri (Trench 1971, Davy et al., 2012). Trench (1971) ha analizzato inoltre l'effetto dei tessuti ospiti sull'escrezione di *Symbiodinium spp.* È stato visto che *Symbiodinium spp.* espelle una quantità maggiore di metaboliti quando si trova incubato in un omogenato di tessuto ospite rispetto a *Symbiodinium spp.* incubati nell'acqua di

mare. Inoltre, Trench ha scoperto che, quando *Symbiodinium spp.* è incubato in un omogenato di tessuto ospite di animali esenti da alghe, non si registra alcun aumento osservabile nella produzione di metaboliti extracellulari. Tuttavia quando gli animali senza alghe sono stati infettati da *Symbiodinium spp.*, l'omogenato di tessuto ospite ha mostrato un incremento della produzione di metaboliti. Questi risultati hanno suggerito che l'ospite svolge un ruolo importante nella regolazione del tipo e della quantità di metaboliti prodotti da *Symbiodinium spp.* (Trench 1971; Gordon & Leggat, 2010).

Lo scambio metabolico è fondamentale per il successo della simbiosi corallo-dinoflagellato e può anche avere un ruolo nel riconoscimento e nella specificità dell'ospite (Davy et al., 2012). Di conseguenza, è forse l'aspetto fisiologico più studiato della simbiosi corallo-zooxantella, anche se ci sono ancora enormi lacune conoscitive rispetto alla sintesi e all'identità dei vari composti metabolici e ai meccanismi che controllano il loro scambio attraverso l'interfaccia ospite-simbionte (Figura 2).

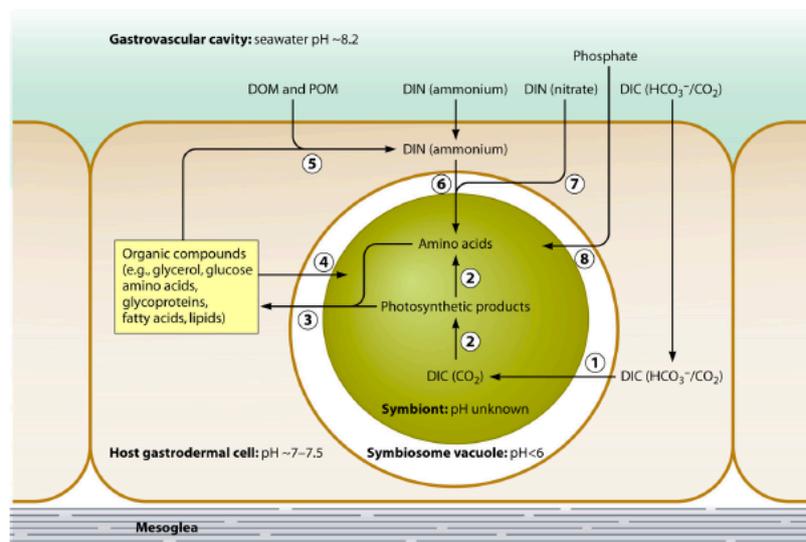


Figura 2. Schema delle interazioni nutrizionali nella simbiosi alga-corallo. 1: assorbimento di carbonio inorganico disciolto (DIC). Il DIC viene acquisito come bicarbonato (HCO_3^-) dall'acqua di mare o come CO_2 dall'acqua di mare o dal metabolismo. 2: fotosintesi. La CO_2 è fissata fotosinteticamente attraverso il ciclo di Calvin-Benson. 3: traslocazione dei prodotti fotosintetici nella cellula ospite. 4: traslocazione inversa. Composti organici sono traslocati dall'ospite al simbiote. 5: vengono utilizzati i composti traslocati, insieme a materia organica disciolta (DOM) e particolato organico (POM) prelevati dall'acqua di mare, per supportare il metabolismo ospite. 6: assimilazione dell'ammonio escretato come in aminoacidi dal simbiote completa il processo del "riciclo dell'azoto". 7: assimilazione dei nitrati. Il nitrato è prelevato dall'acqua di mare, ma il simbiote lo converte in ammonio per la successiva assimilazione come aminoacidi. 8: assimilazione dei fosfati. Anche i fosfati sono prelevato dall'acqua di mare e assimilati dal simbiote.

1.4 Ruolo della simbiosi nel processo di calcificazione

Altrettanto importante è l'influenza della simbiosi nei processi di calcificazione che portano alla formazione dello scheletro del corallo (Figura 3).

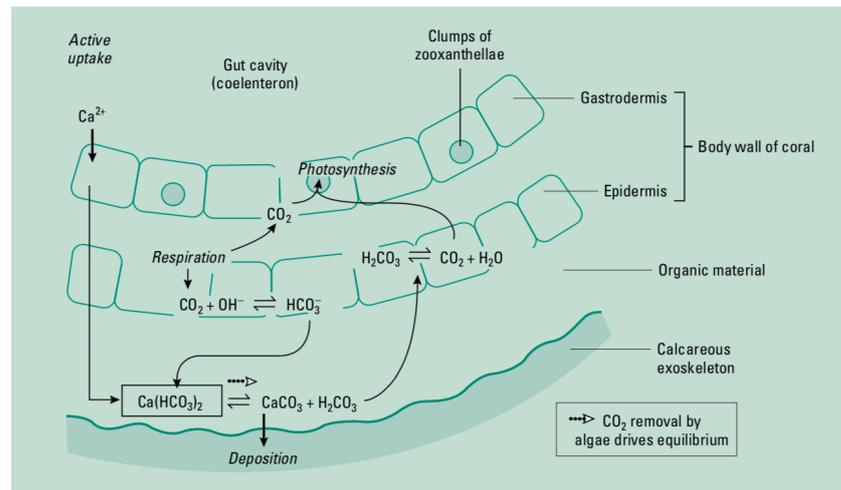


Figura 3. Tutti gli organismi che vivono in simbiosi con le alghe, devono vivere nella zona fotica, in modo tale che esse riescano a sfruttare la luce solare. I coralli traggono beneficio da questa interazione, riuscendo a favorire l'assorbimento dei nutrienti o l'eliminazione dei metaboliti di scarto. Un ulteriore vantaggio per l'ospite riguarda la deposizione di carbonato per la formazione dell'esoscheletro corallino. Usando la CO_2 derivante dalla fotosintesi la zooxantella aiuta a guidare l'equilibrio verso la formazione di CaCO_3 come mostrato in figura (Davy et al., 2012).

La calcificazione   una caratteristica importante dei coralli, poich  questo processo promuove la formazione dello scheletro ed   quindi la base della pi  grande biocostruzione del mondo, le barriere coralline. Nei coralli, lo scheletro   esterno e coperto dai tessuti dell'animale.   fatto di carbonato di calcio (CaCO_3) cristallizzato sotto forma di aragonite (Davy et al. 2012).

Per spiegare la stimolazione della calcificazione da parte dei simbiotici, sono state formulate due ipotesi principali:

- Alterazione della chimica inorganica: i dinoflagellati simbiotici possono stimolare la calcificazione assorbendo CO_2 o rilasciando O_2 . In questo caso, il trasporto di CO_2 dall'acqua di mare o la fissazione fotosintetica di CO_2 da parte dei dinoflagellati pu  modificare indirettamente la chimica del carbonio inorganico all'interno della cavit  gastrovascolare

e/o dell'ECM (mezzo calcificante extracellulare), alterando il pH e/o il contenuto di carbonio, guidando così la calcificazione dalla precipitazione di CaCO_3 . Questa ipotesi è supportata da diverse osservazioni che mostrano cambiamenti nel pH all'interno della cavità gastrovascolare o ECM (Al-Horani et al., 2003; Venn et al., 2011). I risultati dei lavori di Moya et al., del 2008, hanno dimostrato che l'espressione di una calcificazione legata alla membrana secreta o calicodermica è due volte più alta al buio rispetto alla luce.

- Produzione di molecole organiche tramite dinoflagellati simbiotici: le molecole organiche coinvolte nella calcificazione possono essere composti biochimici usati per fornire energia per la calcificazione, composti dell'azoto che possono modificare la capacità tampone dell'ECM o precursori essenziali per la sintesi della matrice organica (OM; *organic matter*) (Davy et al., 2012). La maggior parte di queste ipotesi si basa sulle differenze tra i coralli simbiotici e non simbiotici o sugli esperimenti che utilizzano inibitori. Una stimolazione sperimentale della calcificazione al buio con l'aggiunta di composti organici (ad esempio amminoacidi, glicerolo, glucosio, ATP o succinato) è stata osservata solo in pochissimi casi, e anche allora non ha raggiunto il tasso osservato in condizioni di luce. Poiché le cellule calcicoblastiche sono state identificate come l'unico sito di sintesi dell'OM e trasporto di ioni, possiamo quindi ipotizzare che i prodotti fotosintetici siano secreti nella cavità gastrovascolare da cellule gastrodermiche contenenti i simbionti situati verso l'estremità orale del polipo corallino e che poi siano trasferiti alle cellule calcicoblastiche attraverso le cellule gastrodermiche aborali (Davy et al., 2012).

1.5 Distribuzione del genere *Symbiodinium* spp.

Inizialmente era stata descritta una sola specie di zooxantella; tuttavia analisi filogenetiche con marcatori ribosomiali e mitocondriali hanno dimostrato che *Symbiodinium* spp. può essere classificato in nove cladi (A-I) (Figura 4) (Liu et

al., 2018). I cladi A-H si trovano nei coralli sclerattinici (i cladi A-D sono stati individuati con maggior frequenza) (Baker 2003; LaJeunesse et al., 2010), il clade E è stato trovato in anemoni e in alcuni coralli (LaJeunesse & Trench, 2000), e i cladi C, D e F-I nei foraminifera (Pochon & Gates 2010). I cladi A e C risultano essere quelli più diffusi e ampiamente distribuiti (Decelle et al., 2018).

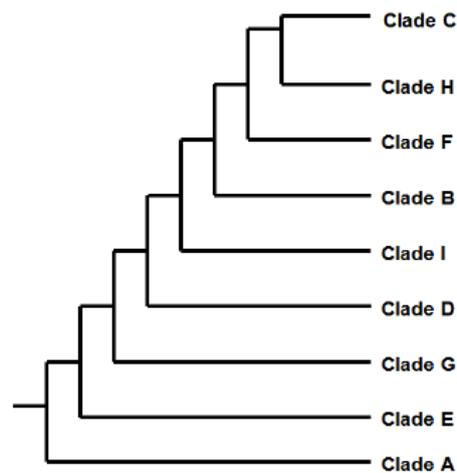


Figura 4. Albero filogenetico di *Symbiodinium* spp. basato sull'analisi molecolare di Pochon et al., 2006 e 2010.

Studi genetici condotti da Rowan & Powers nel 1991, basati sulla subunità del 18S (SSUrRNA), hanno permesso di raggruppare questa zooxantella in tre cladi principali, ciascuno dei quali conteneva al suo interno una dozzina di tipi, le cui differenze si basavano sui polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) e sul sequenziamento. Studi successivi focalizzati sulle subunità del 28S, 23S e sul gene *cox1* hanno portato all'identificazione di un maggior numero di cladi (Takabayashi et al., 2004).

Nel corso degli anni, ulteriori ricerche basate sulla *non-coding internal transcribed spacer region* (ITS), ossia ITS1, 5.8S e ITS2, hanno portato a una maggior espansione dei tipi riconosciuti all'interno di questo genere di zooxantelle (Baillie et al., 2000; LaJeunesse 2001) (Figura 5).

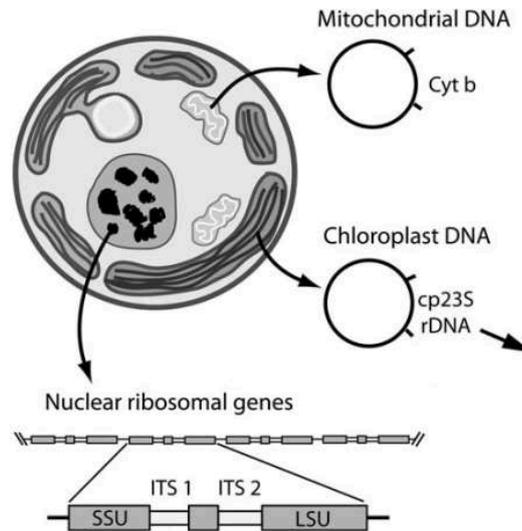


Figura 5. Schema degli organelli e del genoma utilizzati per le analisi molecolari su *Symbiodinium spp.* (Sampayo 2009).

Questa eterogeneità è indice di un'alta diversità fisiologica: i diversi gruppi mostrano differenze nel tasso di fotosintesi e nei livelli di stress legato a un aumento delle temperature (Robinson & Warner, 2006; Levin et al., 2016).

Gli studi attuali si concentrano sulla descrizione delle specie entro cladi (Lee et al., 2015) e si è visto che ogni clade tende ad interagire con un ospite specifico (Baker 2003; Goulet 2006; Mies et al., 2017) e che in caso di acquisizione eterologa l'ospite mostra fitness e crescita ridotta (Weis et al., 2001; Meis et al., 2017). Questo suggerisce che devono esserci dei processi ecologici di base che determinano il grado di specificità o che ci sia un processo di riconoscimento tra alga e simbionte. Questo processo è stato definito *winnowing* e presumibilmente si basa sul riconoscimento di specifiche proteine e recettori situati sulle membrane dei due partners (Kerrigan & Brown, 2009; Logan et al., 2010). Stat et al. (2008) hanno evidenziato che i coralli sono associati soprattutto con il *Symbiodinium spp.* del clade C ed in misura minore con i cladi A, B, D, E, F e G. Il clade D è abbondante nei coralli che hanno subito eventi di stress massicci o di *bleaching* (Rouzè et al., 2017).

A seconda del tipo di *Symbiodinium spp.* con cui il corallo entra in simbiosi, il mutualismo può essere più o meno vantaggioso. Ad esempio, si è scoperto che quello con il *Symbiodinium A*, oltre ad essere meno proficuo era più simile al parassitismo più che a una simbiosi, in quanto il corallo ospite era compromesso

in salute e veniva rilasciata una minor quantità di carbonio fissato (Stat et al., 2008). L'eterogeneità del genere *Symbiodinium spp.* può influenzare la capacità dei coralli di rispondere agli stress e ai cambiamenti climatici, permettendo di ipotizzare che la simbiosi sia in grado di indirizzare l'ospite ad un adattamento rapido che gli consenta di sopravvivere alle situazioni di stress (Stat et al., 2006). Uno studio recente riporta la distribuzione biogeografica dei diversi cladi di *Symbiodinium spp.* su scala mondiale (Decelle et al., 2018). Per quanto riguarda il Mar Mediterraneo, sono stati individuati diversi cladi di *Symbiodinium spp.*. Il clade A è risultato quello più abbondante, ma sono state rilevate zooxantelle appartenenti anche ai cladi B e C (Figura 6).

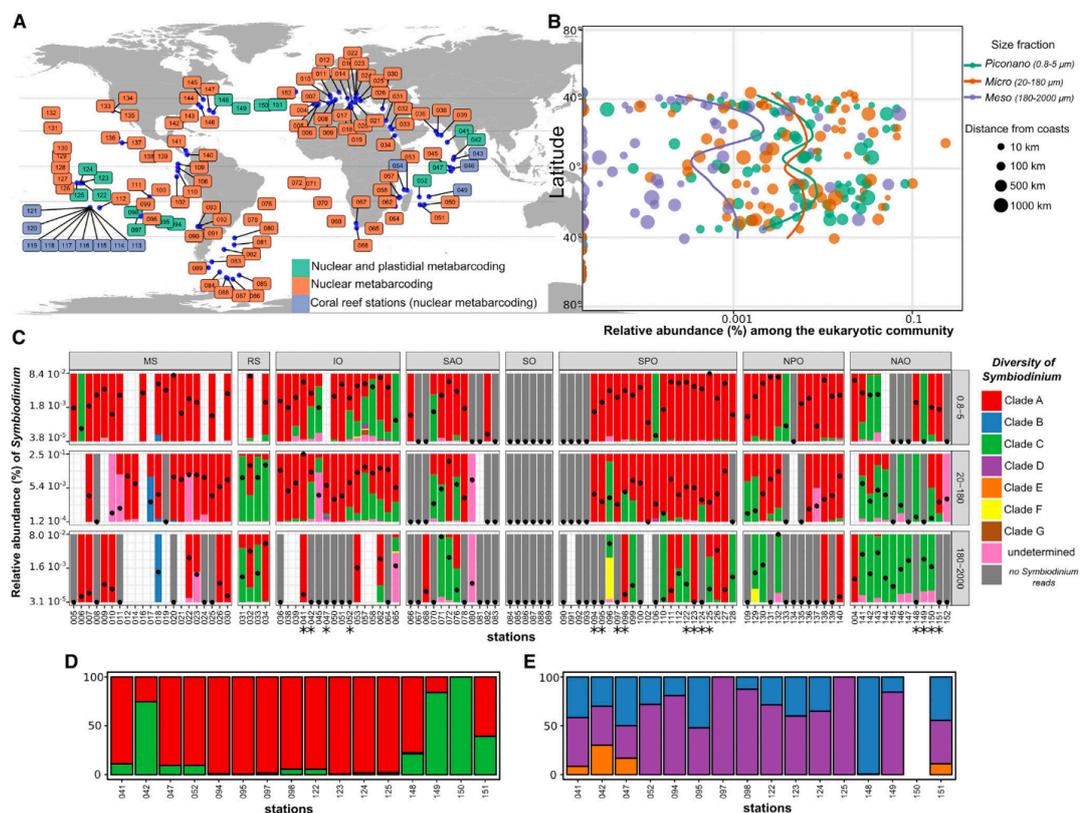


Figura 6. (A) Mappa delle stazioni di campionamento della spedizione Tara Oceans che ha valutato la distribuzione globale dei cladi di *Symbiodinium spp.* I cladi ottenuti con i diversi marcatori molecolari sono riportati con diversi colori: blu, rDNA V9; verde 23S rRNA. (B) Scatterplot che mostra l'abbondanza relativa di *Symbiodinium spp.* La dimensione di ogni cerchio rappresenta la distanza dalla costa. (C) Grafico a barre che mostra la diversità del rDNA V9 e la relativa abbondanza di *Symbiodinium spp.* a livello di clade nelle macroaree: MS, Mar Mediterraneo, RS, Mar Rosso, IO, Oceano Indiano, SAO, Oceano Atlantico meridionale, SO, Oceano meridionale, SPO, Oceano Pacifico meridionale; NPO, Oceano Pacifico settentrionale; NAO, Oceano Atlantico settentrionale. Ogni clade di *Symbiodinium spp.* è evidenziato da un colore distinto, mentre le barre grigie indicano che nessun *Symbiodinium spp.* è stato individuato. (D,E) Diagrammi a barre che mostrano la diversità plastidica di rRNA 23S di *Symbiodinium spp.* considerando tutti i cladi (D) ed escludendo i cladi dominanti A e C (E) (Decelle et al., 2018).

1.6 La simbiosi e lo stress ambientale: influenza della temperatura e del pH

La fotosintesi attuata dalle zooxantelle simbiotiche apporta nutrimento all'ospite ma può essere anche una fonte di stress. A dimostrazione di ciò, ci sono diversi studi che mostrano come molte risposte citoprotettive del corallo siano regolate attraverso un ciclo dielico strettamente correlato con l'attività fotosintetica dell'alga simbiote. Ad esempio, Levy et al. (2011) riporta la variazione dell'espressione di geni coinvolti nella risposta antiossidante e di quelli codificanti per gli chaperoni molecolari, implicati nella risposta agli stress proteotossici, nel corallo *Acropora millepora*, durante le diverse fasi di una giornata, dimostrando come i livelli di questi trascritti sono aumentati durante la fase luminosa dell'attività fotosintetica dell'alga e ridotti durante la fase oscura. Gli autori ipotizzano che l'ambiente interno al tessuto del corallo sia iperossico durante la fase luminosa, quando l'attività fotosintetica dell'alga domina, mentre diventi quasi ipossico durante la fase oscura, quando prevale la respirazione (Figura 7). Durante la fase luminosa, pertanto, si ha un aumento dei livelli intra tissutali di specie reattive all'ossigeno (ROS) che richiede l'attivazione dei meccanismi di difesa cellulare sopra-citati per mantenere l'omeostasi (Weis et al., 2008).

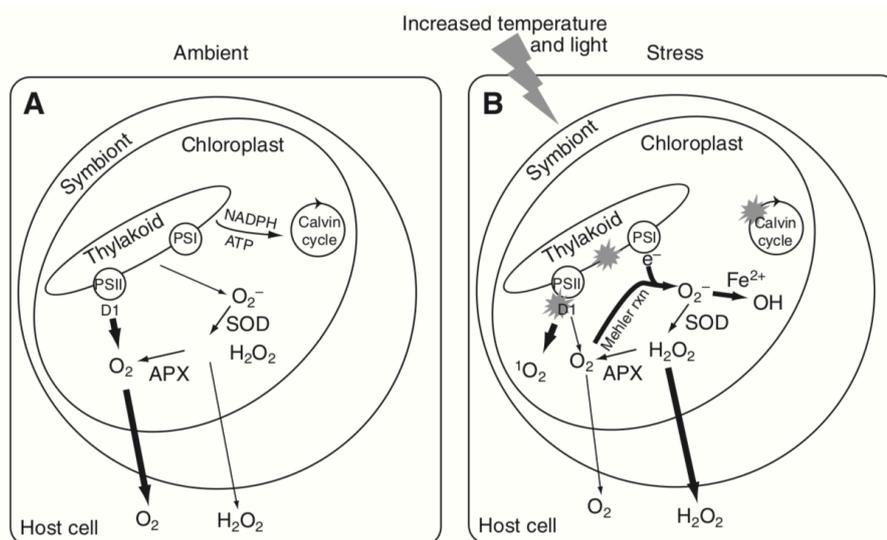


Figura 7. Produzione di O_2 nella cellula algale (A) in condizioni fisiologiche e (B) in condizioni di stress. In condizioni fisiologiche, l'apparato fotosintetico funziona regolarmente e produce grandi quantità di ossigeno che si diffondono nell'ospite. In condizioni di stress, il danno all'apparato fotosintetico si verifica a carico della proteina D1 del fotosistema II (PSII), nel ciclo di Calvin e sulle membrane tilacoidali (Weis et al., 2008).

La prolungata esposizione ad aumenti di temperatura o altre condizioni di stress ambientale possono determinare l'alterazione o addirittura la perdita di questo equilibrio omeostatico; ad esempio, sia l'aumento di temperatura che l'esposizione ad una elevata irradianza causano fotoinibizione e danni ai complessi fotosistemici e ai cloroplasti (Weis 2008; Vidal-Dupiol et al., 2009). Questi fenomeni possono indurre una vera e propria condizione di stress ossidativo nel tessuto del corallo (Figura 8A), attivando meccanismi di morte cellulare (Figura 8A) che portano all'espulsione delle alghe (sbiancamento), alla necrosi del tessuto, fino alla morte dell'organismo, nei casi più gravi (Figura 8B).

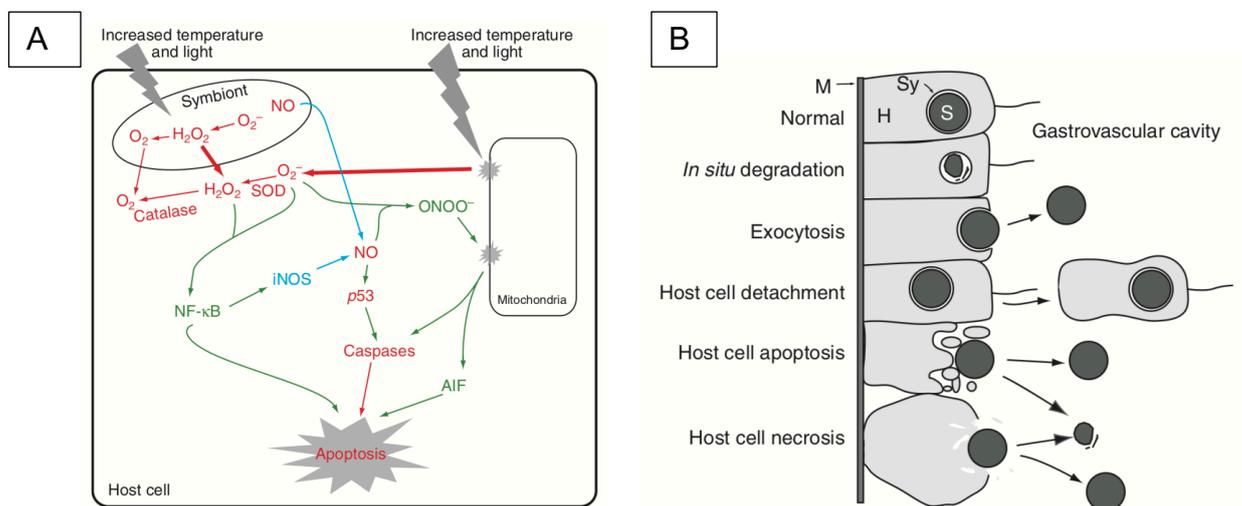


Figura 8. (A) Processi molecolari e (B) alterazioni tissutali che si instaurano nel tessuto del corallo a seguito della perdita dell'omeostasi nella *partnership* alga-corallo. (Da Weis, 2008). (A) Il perossido di ossigeno proveniente sia dal simbiote che dall'ospite, innesca l'attivazione del fattore di trascrizione gatekeeper innato NF-κB. A sua volta, attiva l'apoptosi direttamente e/o induce l'espressione dell'enzima inducibile nitrico ossido sintasi (iNOS) che produce ossido nitrico (NO). In un altro percorso, NO viene prodotto direttamente dal simbiote e diffuso nell'ospite. NO si combina con O₂ per formare perossinitrito altamente reattivo (ONOO⁻). Questo danno rilascia potenti molecole pro-apoptotiche come il fattore di induzione apoptotico (AIF) e il citocromo c (non mostrato) che attivano le caspasi, ossia le proteasi responsabili dell'esecuzione dell'apoptosi. In un altro percorso, NO attiva p53, un fattore di trascrizione pro-apoptotico, che a sua volta attiva le caspasi e l'apoptosi. (B) I simbioti persi per degradazione in situ muoiono o vengono uccisi nelle cellule dell'ospite e vengono digeriti o espulsi (non mostrati). I simbioti persi via esocitosi sono espulsi liberi all'interno della cavità gastrovascolare. Nel distacco delle cellule dell'ospite, i simbioti vengono persi quando intere cellule dell'ospite con i loro simbioti ancora residenti all'interno, si staccano dalla mesoglea e le cellule circostanti vengono rilasciate nella cavità gastrovascolare. Le cellule ospiti, subendo apoptosi, si restringono e formano più corpi apoptotici che vengono degradati nella cavità gastrovascolare. Le cellule ospiti muoiono di necrosi, si gonfiano e scoppiano, liberando i loro contenuti, inclusi i simbioti (vitali o degradati) nella cavità gastrovascolare (Weis et al., 2008).

La frequenza degli eventi di *bleaching* sta aumentando sempre più su scala globale (Kwiatkowski et al., 2015; Hughes et al., 2017) ma fortunatamente questi fenomeni non eliminano totalmente un'intera popolazione di coralli, suggerendo quindi la presenza di interazioni alga-corallo più resistenti di altre (Mayfield & Gates 2007). Si può ragionevolmente ipotizzare che questa tolleranza possa dipendere dal tipo di *Symbiodinium spp.* con cui l'ospite è in simbiosi. Modificazioni delle interazioni tra ospite e corallo e perdita o aumento dei simbionti sono stati individuati come meccanismi che portano alla tolleranza e all'acclimatazione. La tolleranza alle variazioni di temperatura è strettamente correlata al tipo di simbionte a cui è associato il corallo e l'eventuale presenza di più tipi di zooxantelle rende possibile una certa flessibilità in risposta a mutate condizioni ambientali. Ad esempio, in uno studio effettuato da Jones e colleghi nel 2008, su *Acropora millepora* dopo un evento di *bleaching* avvenuto nel 2006, nelle isole Keppel, in Australia, è stato evidenziato come variasse la composizione dei simbionti a seguito di un evento di stress termico: inizialmente i coralli erano in simbiosi soprattutto con il *Symbiodinium* del clade C (93% del totale) ed il restante 7% con il *Symbiodinium* appartenente al clade D o con un mix dei cladi C2 e D (Jones et al., 2008). Dopo l'evento di sbiancamento, circa il 70% dei coralli che erano in simbiosi con il *Symbiodinium* C2 ha mutato il mutualismo, iniziando un'interazione con zooxantelle appartenenti prevalentemente ai cladi D o C1. Le colonie che originariamente erano in simbiosi con *Symbiodinium* C2 presentavano una mortalità più elevata rispetto ai coralli che interagivano con il clade D. Questa variazione dell'abbondanza relativa dei cladi potrebbe quindi aver aumentato la tolleranza termica di questa comunità di coralli (Jones et al., 2008). Un altro studio effettuato a Kenting (Taiwan), ha esaminato l'abbondanza relativa dei cladi di *Symbiodinium* in diversi coralli (*Acropora*, *Cyphastrea*, *Goniastrea*, *Isopora*, *Platygyra*, *Favites*, *Pocillopora*, *Acanthastrea*, *Leptoria*, *Montastraea*, *Seriatopora* e *Stylophora*), sottoposti per tempi lunghi a temperature elevate (29°C) a causa della presenza di acque di raffreddamento provenienti da una centrale nucleare. I coralli che inizialmente erano in simbiosi con *Symbiodinium* di tipo C hanno mutato l'associazione

interagendo con *Symbiodinium* di tipo D o con mix dei cladi C e D. I coralli che non erano in grado di entrare in simbiosi con *Symbiodinium* D non erano presenti nella zona della centrale a profondità minori di 3 metri. Ciò evidenzia come i rapporti simbiotici possano influenzare la tolleranza allo stress a lungo termine, probabilmente perché le mutate condizioni ambientali determinano l'acclimatamento dei coralli solo in presenza di specie di *Symbiodinium* più tolleranti agli stress (Keshavmurthy et al., 2014).

2 SCOPI DEL LAVORO

L'aumento di pCO₂ nelle acque oceaniche previsto per il futuro (IPCC 2014), fenomeno noto come acidificazione degli oceani, è una minaccia globale per il buono stato di salute dei coralli scleractinici.

I coralli che popolano le acque superficiali del Mar Mediterraneo stanno affrontando un drammatico aumento delle temperature del mare e la perdita di habitat a causa dei cambiamenti climatici. Ci si aspetta che le flessioni in abbondanza peggiorino, in quanto i cambiamenti climatici antropogenici stanno intensificando la frequenza dello sbiancamento dei coralli e degli eventi di mortalità di massa. Prove recenti hanno messo in dubbio la capacità dei coralli di acclimatarsi o adattarsi ai cambiamenti climatici globali e che alcuni gruppi di coralli abbiano una tolleranza fisiologica intrinseca allo stress ambientale, probabilmente determinando una maggiore capacità di far fronte ai futuri cambiamenti climatici. Diversi coralli differiscono sostanzialmente per la resistenza fisiologica allo stress ambientale, ma i meccanismi fisiologici alla base della maggiore resilienza dei coralli rimangono poco chiari. Recenti studi hanno dimostrato che le simbiosi possono avere un ruolo sia positivo che negativo nei processi di acclimatamento dei coralli nei confronti delle perturbazioni ambientali (Levin et al., 2016; Franzellitti et al., 2018).

Il presente studio ha come obiettivo quello di valutare l'acclimatamento e il grado di plasticità fisiologica del corallo temperato *Balanophyllia europaea* in condizioni naturalmente ipercapniche e acidificate in funzione della sua partnership simbiotica con le alghe zooxantelle del genere *Symbiodinium spp.* A questo scopo, è stato strategico l'utilizzo di un laboratorio naturale stabilito a largo dell'isola di Panarea (isole Eolie). A Panarea è presente un cratere vulcanico sottomarino caratterizzato da emissioni costituite per il 99% da anidride carbonica e a temperatura ambiente, acidifica l'acqua circostante creando un gradiente di pH/pCO₂ che ricostruisce oggi le condizioni di acidificazione previste per la fine del secolo secondo gli scenari previsionali dell'IPCC (IPCC 2014). I polipi di *B. europaea* sono stati raccolti da popolazioni naturali che vivono lungo questo gradiente di pH e che, pertanto, rappresentano un ideale modello di studio per valutare i processi di acclimatamento dell'olobionte all'acidificazione degli

oceani. Sono stati valutati parametri correlati con l'attività fotosintetica delle alghe e, tramite la tecnica del sequenziamento massivo, è stata valutata la variazione della diversità relativa dei cladi di *Symbiodinium spp.* I risultati ottenuti saranno discussi e interpretati alla luce delle variazioni fisiologiche già osservate negli stessi coralli a carico dei processi di accrescimento, riproduzione e biocalcificazione (Goffredo et al., 2014; Fantazzini et al., 2015) e contribuiranno a definire un quadro complessivo del livello di plasticità fisiologica globale di *B. europaea* nello scenario dei cambiamenti climatici previsti per il Mediterraneo.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Il vulcano sottomarino di Panarea come laboratorio naturale per studiare gli effetti dell'acidificazione sui coralli

Fino al 2002, Panarea era classificato come vulcano “non attivo”, ma un evento di degassamento, avvenuto nei primi giorni di novembre di quell'anno, ha modificato la situazione.



Questa significativa emissione di gas, avvenuta a largo dell'isola di Bottaro, ha generato un cratere profondo 10 metri e importanti quantità di gas magmatici ricchi in SO_2 , HF e HCl (Capaccioni et al., 2005; Capaccioni et al., 2007) (Figura 9).

Figura 9. Fumarole sottomarine a largo di Panarea (www.salinaservizituristici.it)

Questo episodio ha evidenziato come il complesso vulcanico sia ancora in attività e alimentato da fluidi magmatici che risalgano dalle profondità e che interagiscono con i camini idrotermali presenti nelle zone più superficiali.

Nel corso dell'anno 2015, durante un'indagine scientifica, è stato scoperto un sistema idrotermale, unico nel suo genere, proprio nelle acque superficiali tra Panarea e l'isola di Basiluzzo. Questo sito è stato chiamato “Smoking Land” proprio per la presenza di moltissimi camini sottomarini (oltre 200). Misurazioni in loco hanno evidenziato la presenza di uno strato di acqua caratterizzato da valori variabili di acidità e con alte concentrazioni di carbonio inorganico disciolto (DIN) e oligoelementi; questi valori diminuiscono a mano a mano che ci si allontana dalle fumarole. Per quanto riguarda i popolamenti animali e vegetali, grazie al ROV, è stato possibile scoprire un'alta percentuale di alghe rosse

(*Peysonnelia spp.*), colonizzata dall'alga verde *Flabiella petiolata* e da spugne, briozoi e policheti tubicoli. È stato inoltre visto che la varietà di taxa era più abbondante in prossimità dei camini rispetto alle aree rocciose limitrofe (Esposito et al., 2018).

3.2 Disegno sperimentale

L'esperimento descritto in questo studio si inquadra in una più vasta attività di ricerca che è partita nell'ambito del progetto europeo "CoralWarm", e che è tuttora condotta da ricercatori del Dipartimento di scienze biologiche, geologiche e ambientali (BiGeA) dell'Università di Bologna. La ricerca comprende l'utilizzo del sistema vulcanico di Panarea come laboratorio naturale per la valutazione degli effetti dell'acidificazione degli oceani sugli organismi marini calcificanti (Goffredo et al., 2014; Fantazzini et al., 2015). Il cratere di Panarea è caratterizzato da bocche vulcaniche sottomarine che emettono elevate quantità di CO₂. Il cratere principale occupa un'area di 20 x 14m a una profondità di circa 10 metri. Genera una colonna persistente di bolle che salgono dal fondo marino fino alla superficie del mare. In questo ambiente idrotermicamente in equilibrio con l'ambiente circostante, le emissioni di CO₂ stabiliscono un gradiente di pH e pCO₂ costante che si estende dal centro del cratere alla sua periferia (Goffredo et al., 2014; Fantazzini et al., 2015).

La specie di corallo utilizzata nel presente studio è il corallo sclerattinico simbionte *Balanophyllia europaea* (Risso, 1826) (Figura 10). Questo corallo, chiamato anche corallo scarlatto o madrepora molare, fa parte della famiglia *Dendrophylliidae*. È un organismo solitario, solitamente più esteso in larghezza che in altezza. Il margine del calice è più spesso rispetto al resto del corallo e i lati hanno spine o granulati. Il colore del corpo va dal marrone al verde-marrone e il polipo possiede tentacoli quasi trasparenti che possono presentare dei piccoli punti gialli o rossi per la presenza di zooxantelle; per questa ragione, *Balanophyllia europaea* colonizza acque superficiali e luminose, fissandosi su substrati duri fino alla profondità massima di 50 metri. È un corallo ermafrodita e incuba gli embrioni fino a stadi di sviluppo avanzati in cavità interne dette

celenteron (Goffredo et al., 2002; Goffredo et al., 2008). Raggiunge la maturità sessuale intorno ai 3 anni ed ha un'aspettativa di vita pari a 20 anni. È una specie endemica del Mar Mediterraneo; si trova infatti lungo tutte le coste italiane ad eccezione di quelle ioniche (www.iucn.it).



Figura 10. Esemplare di *B. europaea*

I campionamenti sono stati effettuati nel mese di aprile del 2018 e hanno interessato il prelievo di esemplari di *B. europaea* da popolamenti naturali in tre diversi siti posti a diverse distanze dal centro del cratere, in accordo con i precedenti studi (Goffredo et al. 2014; Fantazzini et al. 2015) e secondo lo schema sperimentale riportato in Figura 11. La valutazione dei parametri chimico-fisici (Fantazzini et al., 2015) mostra che i tre siti presentano livelli di pCO₂ e pH analoghi ai valori medi attuali degli oceani (Sito 1) o a quelli previsti dagli scenari dell'IPCC per il 2100 (IPCC, 2014). Nel sito 2 i valori sono analoghi a quelli della proiezione basata sul mantenimento dei valori attuali di CO₂, RPC (Representative Concentration Pathway) 6.0. Nel sito 3 i parametri sono affini a quelli della cosiddetta previsione "business-as-usual" di CO₂ (RCP 8.5).

I coralli sono stati raccolti tramite immersioni subacquee e immediatamente immersi nella soluzione di conservazione (RNA later, Sigma Aldrich), mantenuti a 4°C per tutto il trasporto, e infine conservati a -80°C. Per ciascun sito, sono stati prelevati 14 coralli.

Una volta terminato il prelievo, i campioni sono stati immersi nella soluzione di conservazione (RNA later, Sigma Aldrich), mantenuti a 4°C per tutto il trasporto, e infine conservati a -80°C.

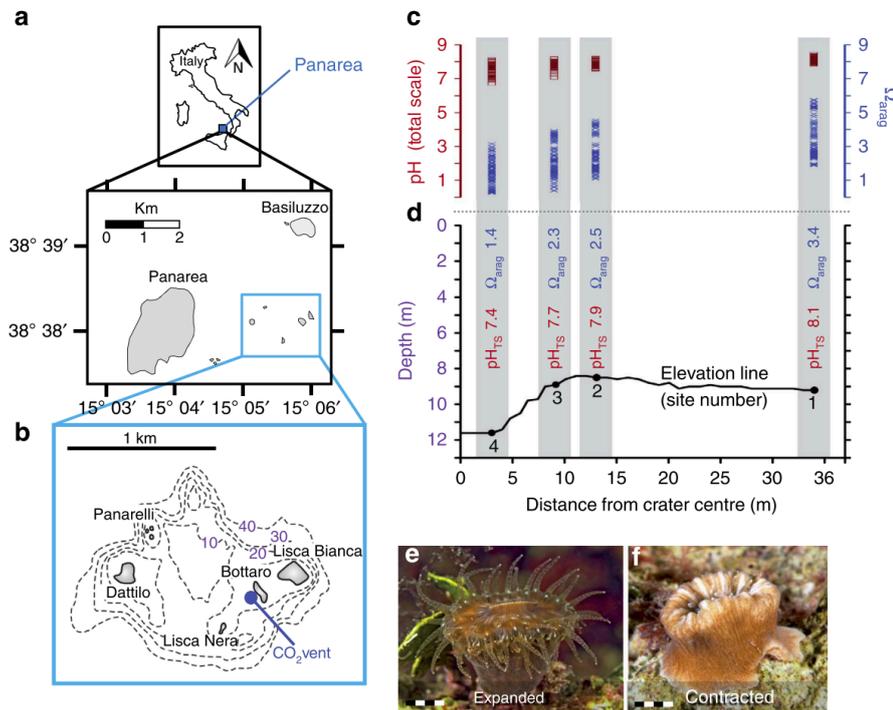


Figura 11. Sito e schema di campionamento (a) nei pressi dell'isola di Panarea. (b) Le emissioni di CO_2 generano un gradiente di pH stabile. Lo schema riporta i tre siti di campionamento posti a 9, 13 e 34 m di distanza dal cratere vulcanico. (c) Valori di pH_{TS} registrati nei siti analizzati; essi mostrano un aumento man mano che ci si allontana dal cratere. Sono inoltre mostrati i valori di pCO_2 registrati nei diversi siti esaminati. (d) Profilo batimetrico caratterizzante i siti (Fantazzini et al., 2015).

3.3 Valutazione dei parametri correlati alla fotosintesi

3.3.1 Valutazione del contenuto di clorofilla e numero di cellule algali

Il tessuto del polipo è stato rimosso dagli scheletri utilizzando un aerografo e una soluzione PBS 1X e il volume dell'omogenato è stato registrato. Il tessuto estratto è stato poi omogeneizzato usando un omogeneizzatore elettrico (MRC, HOG-160-1/2) per 3 x 10 secondi. Il tessuto ospite è stato separato dalle cellule alghe mediante centrifugazioni sequenziali. L'estrazione del tessuto è stata quindi separata in 30 μ l per poter effettuare la quantificazione della proteina ospite, 30 μ l per il conteggio delle cellule di alghe e 2 ml per la misurazione della

concentrazione di clorofilla. Dopo la rimozione del tessuto e l'omogeneizzazione, l'omogenato è stato centrifugato a 5000xg per 5 minuti a 4° C per separare i detriti e le cellule del simbionte dal tessuto ospite del corallo. Il surnatante con il tessuto ospite è stato quindi posto in una nuova provetta aggiungendo successivamente un cocktail inibitore della proteasi 50x (cat G652A, Promega). In seguito, è stata avviata una sonicazione (ultrasuoni atomizzatore sonda Sonicator) per 3x30 secondi per completare l'estrazione di tutte le proteine. La concentrazione delle proteine è stata misurata utilizzando il metodo di Bradford (Bradford, 1976).

3.3.2 Conteggio delle cellule algali

Il conteggio delle cellule è stato condotto utilizzando un microscopio invertito Ti Nikon Eclipse; 10µl di omogenato sono stati collocati su un emocitometro (BOECO, Germania) e focalizzati su un ingrandimento di 20X. Ciascuno dei cinque campi selezionati per frammento (1mm² ciascuno) è stato fotografato sia in campo chiaro che in luce fluorescente a una emissione di 440nm (clorofilla). Il conteggio delle cellule è stato eseguito utilizzando NIS-Elements Advanced Research (versione 4.50.00, Nikon).

Per la calibrazione della soglia sono stati utilizzati i seguenti parametri: 0,5 <Circolarità <1. Il diametro tipico doveva essere compreso tra 5µm e 15µm.

3.3.3 Concentrazione della clorofilla

Le concentrazioni di clorofilla-a sono state misurate utilizzando 2 ml di omogenato di tessuto che è stato filtrato su un filtro Whatman GF/C e incubato per una notte con 1 ml di acetone freddo al 90% a 4 ° C. Dopo l'incubazione, il filtro è stato omogeneizzato manualmente e la soluzione è stata filtrata con un filtro a siringa da 0.22 µm e l'eluato è stato utilizzato per la valutazione dell'assorbanza alle lunghezze d'onda di 630, 647, 664 e 691 nm utilizzando il NanoDrop (Thermo-Fisher). La concentrazione di clorofilla è stata ottenuta utilizzando la seguente equazione (Ritchie, 2008):

$$\text{Eq.1 Chl-}a \text{ [}\mu\text{g ml}^{-1}\text{]} = -0.3319 * \text{ABS}_{630} - 1.7485 * \text{ABS}_{647} + 11.9442 * \text{ABS}_{664} - 1.4306 * \text{ABS}_{697}.$$

3.3.4 *Analisi statistica*

I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei valori ottenuti per ciascuno sito (N = 3). I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) non-parametrica a 1-via (test di Kruskal-Wallis) seguita dal test di Mann-Whitney per i confronti fra coppie. Le deviazioni dalle assunzioni dell'ANOVA parametrica sono state testate mediante il test di Shapiro-Wilk (normalità) e il test di Bartlett (omogeneità della varianza). L'analisi statistica e i grafici sono stati con R (R Core Team, 2017). Le differenze tra i dati sono state considerate significative per valori di $p < 0.05$.

3.4 Amplificazione selettiva della regione ITS2 di *Symbiodinium spp.* e sequenziamento massivo

3.4.1 *Strategia di amplificazione della regione ITS2*

L'insieme delle procedure per il sequenziamento massivo della regione ITS2 di *Symbiodinium spp.* è schematizzato in Figura 12 e, brevemente, è composto delle seguenti fasi:

- Estrazione del DNA totale
- Individuazione e amplificazione della regione ITS2 di *Symbiodinium spp.* a partire dal DNA totale; in questa fase, agli ampliconi vengono aggiunti i cosiddetti "adattameri", ossia frammenti di DNA a sequenza nota che sono funzionali alla fase di sequenziamento massivo
- Quantificazione dei prodotti di PCR
- Sequenziamento massivo

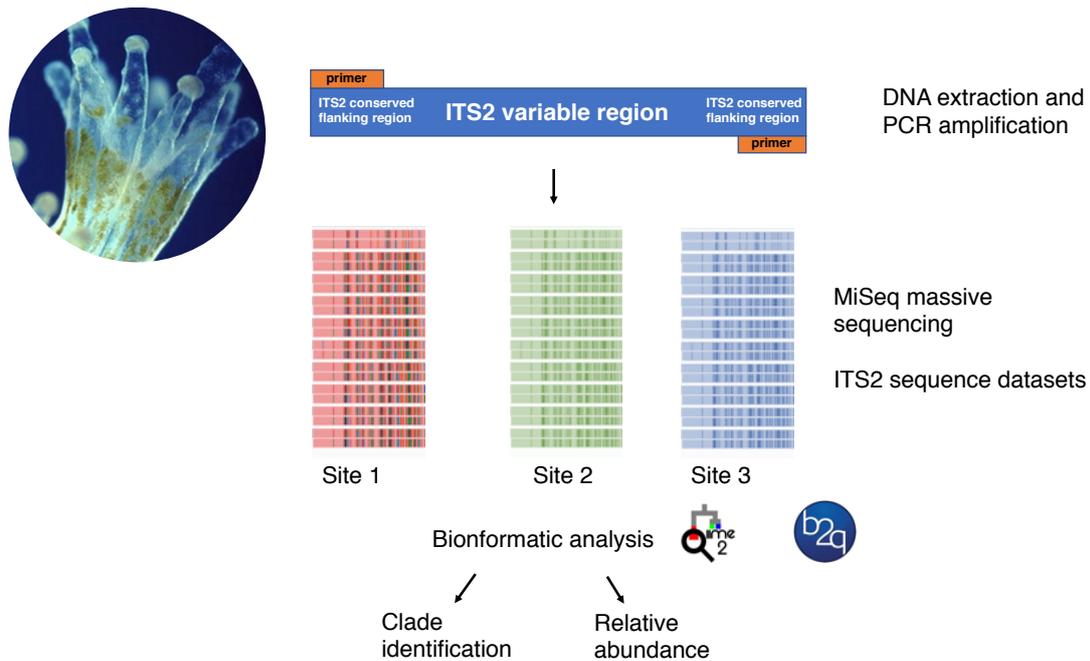


Figura 12. Schema delle fasi di preparazione dei campioni: per prima cosa è stato estratto il DNA e dopo aver trattato opportunamente i campioni è stato possibile procedere con l'amplificazione della regione ITS2 tramite PCR; successivamente è stato effettuato il sequenziamento massivo MiSeq e infine le analisi bioinformatiche, volte all'identificazione dei cladi di *Symbiodinium spp.* e alla sua abbondanza nei tre siti di Panarea esaminati.

Il DNA è stato estratto dall'olobionte utilizzando il kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) e seguendo il protocollo per l'omogenizzazione dei campioni utilizzato precedentemente per l'estrazione dell'RNA totale da *B. europaea* (Franzellitti et al. 2018).

L'individuazione della regione ITS2 delle zooxantelle è avvenuta mediante PCR usando primers specifici fiancheggianti la regione da amplificare. La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) consente l'amplificazione di specifici frammenti di acidi nucleici, ossia la produzione in vitro di un elevato numero di copie di una specifica sequenza di DNA. Tale metodologia fu messa a punto nel 1983 da Kary B. Mullis il quale ottenne, per questo, il premio Nobel per la chimica nel 1993. La PCR si basa sulle proprietà dell'enzima DNA polimerasi di ripetere in vitro ciò che accade normalmente *in vivo* durante il processo di duplicazione del DNA, ossia la sintesi di nuovi filamenti complementari ad un filamento stampo, e sulla possibilità di mirare tale sintesi ad uno specifico tratto di DNA scegliendo opportunamente gli inneschi o primers. Tutto ciò ha lo scopo di rendere disponibili

elevate quantità di materiale genetico per future applicazioni in tempi relativamente brevi.

Il processo è svolto in natura dall'enzima DNA Polimerasi, che è in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo segmento di DNA in presenza di un filamento di acido nucleico denaturato, di nucleotidi da polimerizzare, e di giuste condizioni di temperatura e pH. Per iniziare questa reazione, è necessaria la presenza di opportuni primers, oligonucleotidi sintetici lunghi 10-30 bp, complementari alle regioni fiancheggianti il frammento genico da amplificare. I primers, appaiandosi a queste regioni, costituiscono un piccolo tratto di DNA a doppia catena, dal quale la DNA-polimerasi può iniziare la sintesi, ossia la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore e quella 5' del deossinucleotidtrifosfato (dNTP) complementare allo stampo.

Nel nostro caso, la sequenza amplificata è la sequenza ITS2, un marker genetico utilizzato per esaminare la diversità del *Symbiodinium spp.*, che dipende dalla posizione geografica, dalla profondità e dal suo stato di salute (Arif et al., 2014). La regione ITS2 fa parte dell'operone rDNA nucleare eucariotico e si trova tra il 5.8S e rRNAs 28S (Schultz et al., 2006; Hunter et al., 2007). L'organizzazione dell'operone è molto simile tra gli eucarioti mentre la regione ITS2 varia molto in base alla specie. Per questa ragione esso è un marker molto utile per analisi filogenetiche (Hunter et al., 1997). Le strutture secondarie di ITS2 sono ben conservate tra gli eucarioti e possono essere utilizzate per l'identificazione della specie.

La struttura secondaria di questo operone presenta una caratteristica forma a quattro o a cinque "dita" (Figura 13).

Hunter et al. nel 2007 hanno scoperto che i cladi A, E, G e D hanno quattro eliche mentre i cladi B, C, F e H ne hanno cinque così come il clade I, che è stato scoperto successivamente (Pochon et al., 2010).

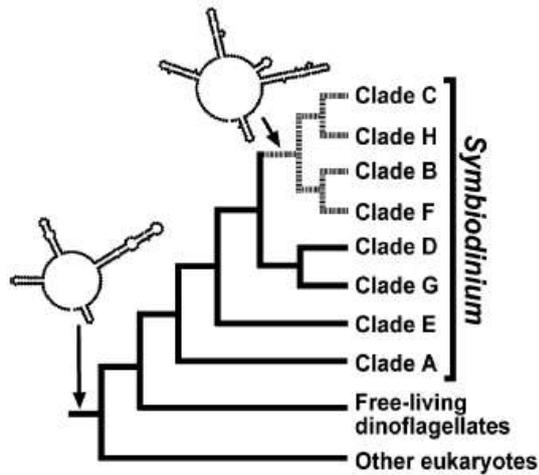


Figura 13. Le due configurazioni di ITS2 di *Symbiodinium spp.* e relazione filogenetica tra i vari cladi (Hunter et al., 2007).

I primers utilizzati sono costituiti da due parti (Figura 14): una porzione specifica per la regione fiancheggiante la porzione del gene ITS2 da amplificare (riportata da Arif et al., 2014), e una porzione 5' costituita dall'adattamero, o "barcode", utilizzato nella successiva fase di sequenziamento massivo, e che dipende dalla piattaforma tecnologia utilizzata.

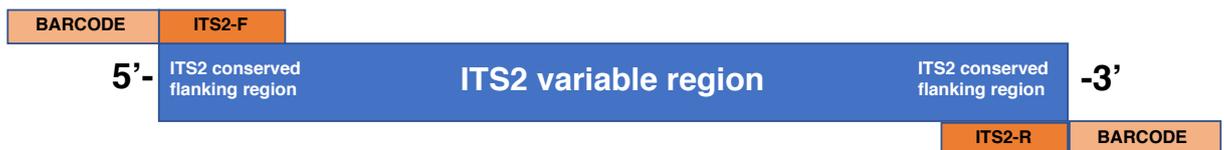


Figura 14. Schema della regione ITS2 amplificata nel corso della PCR; come si può notare dall'illustrazione, sia all'estremità 5' che 3' sono stati appaiati dei primers specifici e dei barcode per permettere la realizzazione corretta della reazione di amplificazione.

Ciascun campione è stato processato in duplicato e ciascuna reazione è stata condotta in un volume finale di 25 μL contenente 2 μL di DNA, primers forwards e reverse alla concentrazione 0.2 μM , e 1 unità dell'enzima GoTaq DNA polymerase (Promega).

La reazione di PCR consiste in 35 cicli composti dalle seguenti fasi:

- 1) Fase di denaturazione: la soluzione viene portata a una temperatura pari a 94°C, per far sì che i due filamenti di DNA si separino.
- 2) Fase di *annealing*: i primers si appaiano alle sequenze complementari sui due filamenti stampo. La temperatura di *annealing* è un parametro capace di determinare la specificità della reazione, quindi può variare in funzione dei frammenti che devono essere amplificati e dei primers utilizzati, ma in generale è compresa tra i 40 e 60°C.
- 3) Fase di estensione: la temperatura viene innalzata ad un valore in genere intermedio tra quello di denaturazione e quello di appaiamento (68-72°C), che risulti ottimale per l'attività della DNA polimerasi; questa catalizza l'estensione dei filamenti di nuova sintesi a partire dall'estremità ossidrilica 3'.

I prodotti della PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi orizzontale su gel di agarosio al 2% in buffer TBE 1M Tris, acido borico 0.9 M, e EDTA 1mM) utilizzando il colorante GelRed (Biotium, VWR International) e il transilluminatore Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad Laboratories).

La concentrazione di DNA è stata determinata con il fluorimetro Qubit e il kit DNA HS (High Sensitivity) (Thermo-Fisher). La concentrazione è stata, quindi, aggiustata a 20 ng/μL (volume minimo accettabile = 20 μL) e i campioni sono stati inviati alla ditta esterna per la procedura di sequenziamento massivo.

3.4.2 Sequenziamento massivo MiSeq

Il sequenziamento massivo MiSeq è un tipo di tecnologia che integra i processi di cluster, amplificazione, sequenziamento e analisi in un unico strumento. Esso sfrutta il sequenziamento mediante sintesi Illumina, ossia la chimica di sequenziamento di ultima generazione; essa rileva le basi singole mentre vengono incorporate in maniera massiccia in filamenti di DNA. Il risultato è un sequenziamento base per base molto accurato, in grado di eliminare gli errori attribuibili al sequenziamento, anche in regioni ripetute o omopolimeri. La combinazione di preparazione delle librerie è molto rapida e veloce (Figura 15).



Figura 15. Passaggi effettuati dalla tecnologia MiSeq: per prima cosa sono aggiunti degli adattatori al fine di preparare sequenze idonee per il sequenziamento; a questo punto, viene avviato il sequenziamento e i dati ottenuti verranno annotati e registrati nello strumento per permettere la creazione di report biologici d'interesse.

Per gli scopi di questa tesi, i prodotti di PCR sono stati sopposti ad un secondo step di amplificazione per l'attacco degli adattatori alle sequenze barcode e per l'index (Nextera XT index kit) per il sequenziamento ed identificazione dei campioni. Il sequenziamento è stato effettuato su piattaforma Illumina MiSeq nel formato Paired End 2x300 bp.

3.4.3 Analisi bioinformatica

Per quanto riguarda l'analisi bioinformatica, sono stati effettuati dei passaggi sequenziali (Figura 16) al fine di ottenere le sequenze idonee per l'analisi tassonomica e l'assegnazione dei cladi. Il primo passaggio permette di visualizzare i dati grezzi (*raw sequences*) ottenuti dal processo di PCR. Essi non comprendono solo le sequenze appartenenti a *Symbiodinium spp.*, ma costituiscono l'insieme di tutte le sequenze presenti nel campione. Il processo di *trimming* permette l'eliminazione del barcode, ossia la porzione di sequenza che identifica l'adattamento. A questo punto, è stato possibile procedere con il *denoising*, uno step che consente l'eliminazione del cosiddetto rumore di fondo, ossia tutto quello che non comprende il target della nostra ricerca. Successivamente, viene effettuato il controllo qualità e il *data filtering* in modo tale da eliminare i dati di scarsa qualità e focalizzarsi solo su quelli con valori rilevanti. In seguito, si procede con la generazione di unità tassonomiche operative (OTU) utili per la successiva assegnazione dei livelli tassonomici, che

verrà effettuata tramite il programma Blast2GO che utilizza uno specifico database sulle alghe unicellulari (Arif et al., 2014), idoneo alla classificazione dei cladi di *Symbiodinium spp.* presenti nei campioni di Panarea.

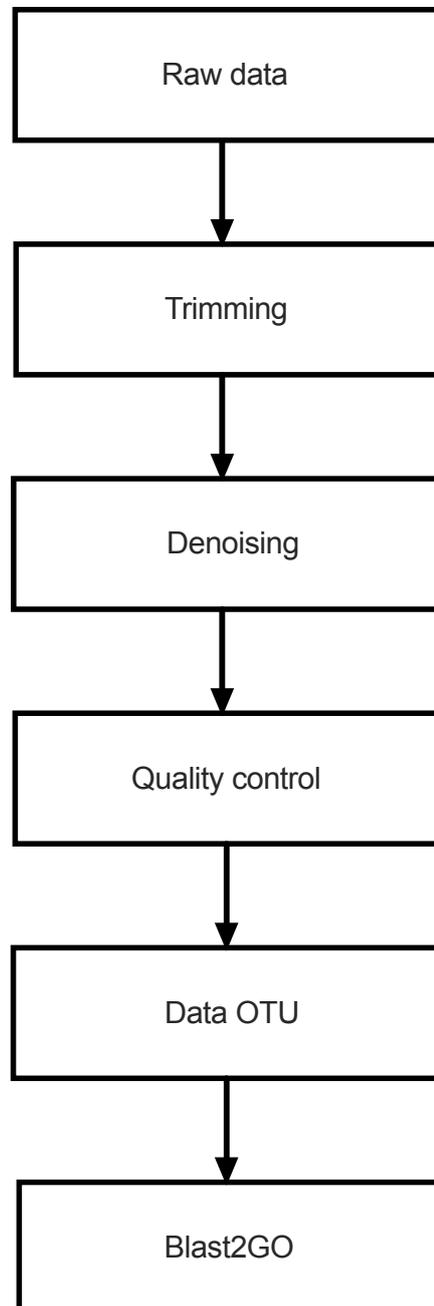


Figura 16. Passaggi effettuati durante l'analisi bioinformatica.

4 RISULTATI

4.1 Parametri correlati alla fotosintesi

I parametri correlati alla fotosintesi vengono mostrati in Figura 17. E' possibile notare come venga registrato un aumento significativo della densità di cellule algali nel tessuto dei coralli provenienti dal Sito a pH 7.7 (Sito 3) (Figura 17A). La quantità di clorofilla per cellula rimane costante al variare del pH (Figura 17B), mentre la quantità di clorofilla totale è significativamente aumentata (Figura 17C).

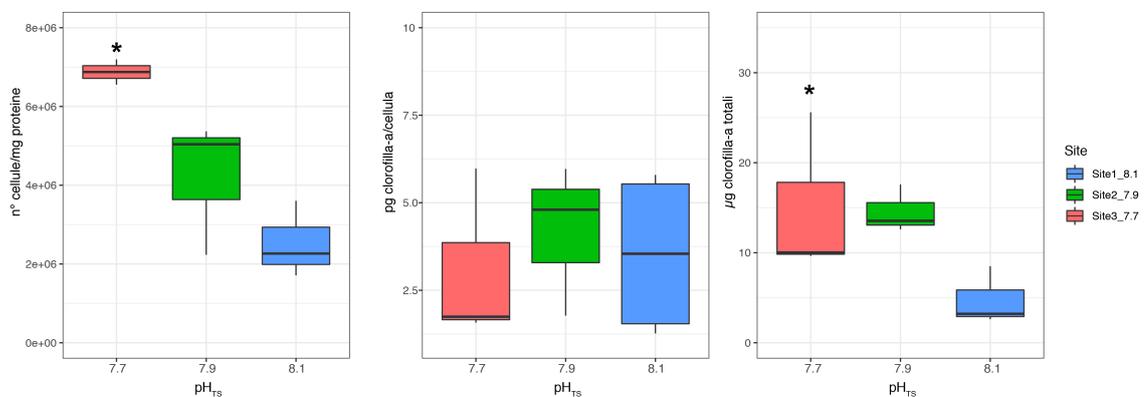


Figura 17. Parametri correlati all'attività fotosintetica delle zooxantelle simbionti con *B. europaea* lungo il gradiente di Panarea. (A) Densità delle cellule algali. (B) Concentrazione della clorofilla per cellula algale. (C) Quantità totale di clorofilla. I valori sono riportati come medie \pm sem di 3 campioni ciascuno composto da un pool di 3 polipi (N = 3). *p < 0.05 vs sito a pH 8.1 (sito 1).

4.2 Identificazione dei cladi di *Symbiodinium* spp. e stima dell'abbondanza relativa

L'amplificazione della regione ITS2 di tutti i campioni di DNA che corrispondono ai coralli prelevati lungo il gradiente di Panarea ha generato un prodotto di dimensioni attese (250 bp; Arif et al., 2014) come mostrato in Figura 18.

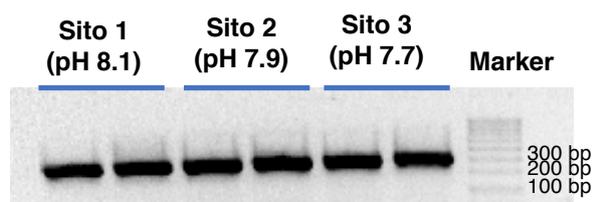


Figura 18. Risultati dell'elettroforesi su gel; come si può vedere, in tutti e tre i siti esaminati la regione ITS2 di interesse è stata amplificata.

Il sequenziamento massivo di questi prodotti di PCR ha generato 2 dataset “grezzi” per ciascun campione, che, dopo la procedura di controllo qualità e *filtering*, hanno generato 3 dataset contenenti ciascuno 4680 (Sito 1), 499 (Sito 2) e 921 (Sito 3) sequenze che sono state utilizzate per l'identificazione dei cladi di *Symbiodinium* e la stima dell'abbondanza relativa tramite Blast2Go. La Tabella 2 riporta i risultati dell'analisi qualitativa della fase di sequenziamento.

Tabella 2. Risultati qualitativi del sequenziamento massivo: numero di dati grezzi (*raw data*), delle sequenze dopo il filtraggio (*data filtering*) e delle sequenze di *Symbiodinium spp.*

	Sito 1	Sito 2	Sito 3
Raw data	91781	124801	83787
Data filtering	4680	499	921
Sequenze annotate*	434	274	883

*Sequenze riconosciute da Blast2Go come sequenze ITS2 di *Symbiodinium spp*

Di seguito viene mostrata un esempio di tabella generata da QIIME 2 per il data filtering (Tabella 3).

Tabella 3. Esempio di tabella generata dalle analisi bioinformatiche in cui vengono mostrate le percentuali riferite ai tipi di organismi individuati all'interno dei campioni con le relative classificazioni tassonomiche.

Tassonomia	Totale	Sito 1	Sito 2	Sito 3
Non assegnato	2.2%	5.1%	0.4%	1.1%
Fungi	97.4%	94.8%	99.6%	97.7%
Fungi/Ascomycota	0.0%	0.1%	0.0%	0.0%
Fungi/Glomeromycota	0.04%	0.0%	0.0%	1.3%

L'analisi condotta tramite Blast2Go e l'utilizzo di un database appositamente costruito, contenente tutte le sequenze note e classificate per i diversi cladi di *Symbiodinium spp.* (Arif et al., 2014), ha permesso di identificare nei 3 siti analizzati 3 principali cladi: clade A, B, e C, e all'interno di questi i sottotipi A1med e A16 (clade A), B19 e B33 (clade B), e C16_3b. La nomenclatura seguita è quella riportata da Arif et al. (2014).

I risultati dell'analisi di sequenza condotta da Blast2Go nel processo di annotazione è riportata in Figura 19, e dimostra un'elevata omologia tra le sequenze ottenute dai campioni di Panarea e quelle target presenti nel database.

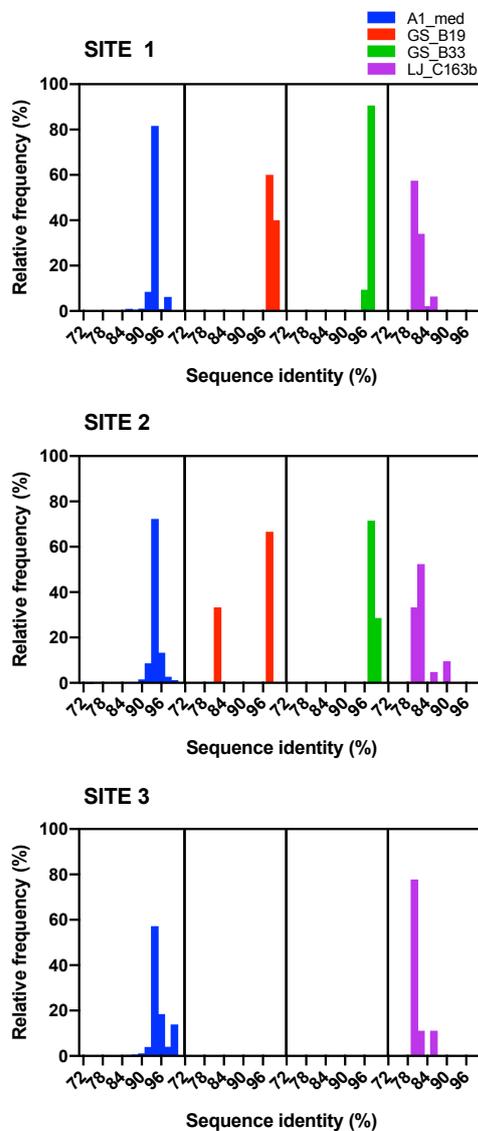


Figura 19. Grafici relativi all'analisi eseguita con Blast2GO per valutare la distribuzione dei valori d'identità di sequenza nucleotidica rilevate nei dataset corrispondenti ai campioni del gradiente di Panarea.

La Figura 20 riporta l'abbondanza relativa di questi cladi alle tre condizioni di pCO₂/pH lungo il gradiente di Panarea. Il clade A1med è quello più abbondante in tutte e tre le condizioni raggiungendo il 99% delle sequenze annotate in corrispondenza del pH 7.7 (sito 3). Gli altri cladi, che comunque rappresentano una frazione minoritaria del totale, mostrano valori percentuali decrescenti col pH (e con l'aumento di pCO₂); in corrispondenza del pH 7.7 non sono state rilevate sequenze omologhe a quelle clade GS_B19 e LJ_B33, mentre il clade C_16 3b è lo 0.71% del totale.

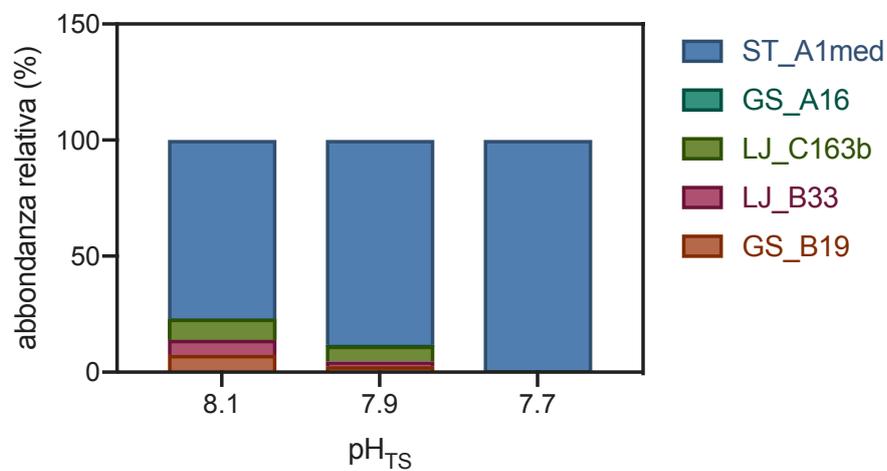


Figura 20. Grafico relativo all'abbondanza dei cladi di *Symbiodinium spp.* presenti nei campioni di Panarea. Il clade A presenta due sottotipi (A1med e A16), così come il clade B (B19 e B33) e il clade C con il sub clade C16_3b.

5 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Le condizioni ambientali del gradiente di Panarea, in particolare l'aumento dei livelli di pCO_2 , rappresentano idealmente una condizione favorevole all'attività fisiologica dell'alga, in quanto aumenta la disponibilità del substrato (CO_2) utilizzato nei processi di fotosintesi; contemporaneamente, però, è una situazione potenzialmente sfavorevole alla fisiologia del corallo, in quanto è noto come la riduzione dei valori di pH dell'acqua di mare possa avere rilevanti effetti avversi su diversi processi fisiologici, come la calcificazione, che è il tratto fisiologico distintivo dei coralli scleractini, l'osmoregolazione, il metabolismo e la riproduzione (Mayfield e Gates, 2007; Byrne, 2012).

I dati riportati in questa tesi mostrano che l'acclimatazione a condizioni di aumento di pCO_2 e riduzione di pH, determinano condizioni favorevoli all'aumento della densità delle cellule algali nel tessuto di *B. europaea*, senza, però, che vi sia una variazione della capacità fotosintetica della singola cellula algale, come invece osservato in precedenti studi (Kets et al., 2010; Mateos-Naranjo et al., 2010; Norikane et al., 2010; Towanda & Thuesen del 2012). L'effetto netto è un aumento della capacità fotosintetica totale (= aumento di clorofilla totale) e quindi una aumentata disponibilità nutrizionale per il corallo.

È interessante notare che la variazione dei parametri fotosintetici misurata da Caroselli et al. (2015) in polipi di *B. europaea* esposti ad aumento di temperatura, quindi una condizione sfavorevole alla fisiologia dell'alga, mostra un andamento opposto a quello osservato nel presente studio in condizioni di aumento di pCO_2 . Infatti, l'aumento di temperatura ha indotto la riduzione della densità delle cellule algali nell'ospite e l'incremento della quantità di clorofilla per cellula. L'effetto netto è una non variazione della quantità di clorofilla totale, che non consente quindi di mitigare gli effetti avversi delle elevate temperature sul corallo (Caroselli et al. 2015).

La variazione dei parametri correlati alla fotosintesi osservata in questo studio è accompagnata da una riduzione della diversità di cladi presenti nei campioni a pH acido. Addirittura, nel sito 3, dove il pH raggiunge un valore medio di 7.7, il clade A1 "Mediterraneo" (Casado-Amezù et al., del 2014) rappresenta il 99%

del totale. Questo clade è quello prevalente nel Mediterraneo occidentale (Savage et al., 2002; Barbrook et al., 2006; Visram et al. 2006; Casado-Amezúa et al. 2014) e comprende una varietà di sub cladi, attualmente descritti solo da analisi statistiche molecolari con l'uso di marcatori ITS (Casado-Amezúa et al. 2014). Fisiologicamente, il clade A1 Mediterraneo è considerato un sub clade potenzialmente resistente a aumenti di temperatura a breve termine rispetto ai cladi presenti in altri bacini (Rodolfo-Metalpa et al., 2006). Pertanto, la riduzione della diversità dei cladi di *Symbiodinium spp.* in *B. europaea* lungo il gradiente di Panarea, in favore del clade che ha una maggiore tolleranza allo stress, è parte dei fenomeni di acclimatamento dell'olobionte alle condizioni di pH acido.

Quali sono le implicazioni fisiologiche (per il corallo) dell'aumento della capacità fotosintetica totale osservata in condizioni di pH acido a Panarea? In generale, si ritiene che l'aumento dell'attività fotosintetica di *Symbiodinium spp.* mitighi gli effetti dell'acidosi nelle cellule dell'ospite esposto ad elevate pCO₂ perché sottrae CO₂ all'ambiente intracellulare del corallo (Gibbin et al., 2014). In questo senso, la simbiosi avrebbe un ruolo di buffer per gli effetti dell'acidificazione degli oceani sui coralli. Però, i risultati riportati in questa tesi devono essere interpretati nel quadro più generale delle modificazioni fisiologiche e morfologiche osservate in *B. europaea* lungo il gradiente di Panarea (Goffredo et al. 2014; Fantazzini et al., 2015; Caroselli et al., 2018) che sono riassunte e schematizzate nella Figura 21. L'insieme dei dati dimostra che l'aumento della disponibilità nutrizionale concorre a sostenere la plasticità fisiologica di *B. europaea* nell'acclimatazione alle condizioni di pH acido del gradiente di Panarea, permettendo a questa specie di mantenere tassi di estensione lineare adeguati al raggiungimento dell'output riproduttivo (Fantazzini et al., 2015; Caroselli et al., 2018). Tuttavia, è ragionevole supporre che, in condizioni di pH acido, gli organismi debbano impiegare un maggiore quantitativo energetico per mantenere l'omeostasi di alcuni processi fisiologici, come ad esempio il controllo del pH interno e la composizione relativa delle specie carbonatiche nel fluido di calcificazione, che determina la riduzione dei tassi di calcificazione netta e l'aumento osservato della porosità dello scheletro carbonatico (Fantazzini et al. 2015).

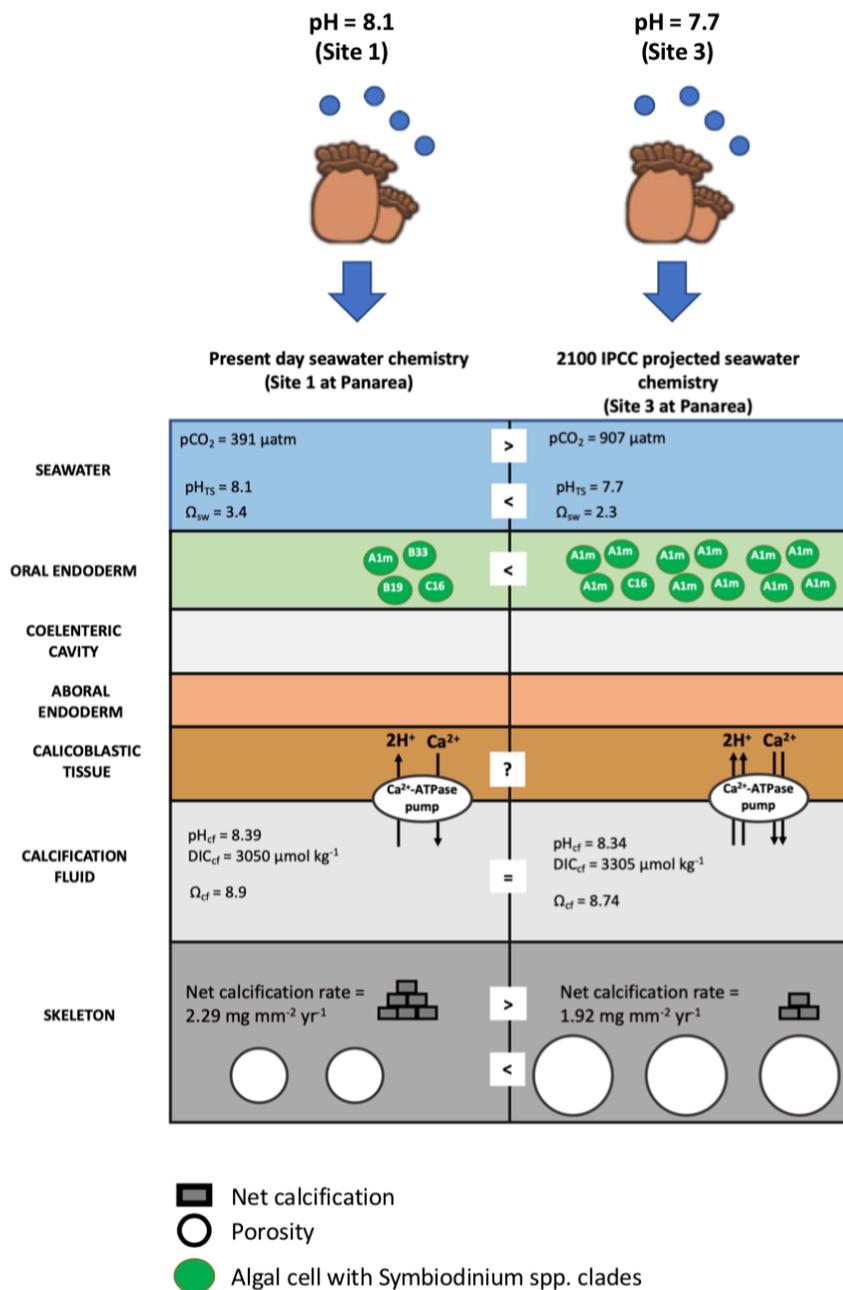


Figura 21. Riassunto schematico che mostra gli impatti ipotizzati dell'acclimatazione a pH acido su *Balanophyllia europaea* lungo il gradiente di Panarea. A pH bassi come quelli previsti per il 2100 (sito 3), *B. europaea* mantiene invariati i tassi di estensione lineare e l'output riproduttivo rispetto a quanto misurato ai parametri ambientali attuali rappresentati dal Sito 1 (Fantazzini et al., 2015; Caroselli et al., 2018). La densità algale e la quantità di clorofilla totale aumentano rispetto ai valori registrati a pH 8, mentre la diversità dei cladi di *Symbiodinium spp.* viene drasticamente ridotta, con il clade A1 che nel Sito 3 rappresenta il 99% del totale (presente studio). In queste condizioni, *B. europaea* mantiene invariati i valori di pH (pH_{cf}) e l'omeostasi delle specie carbonatiche nel fluido di calcificazione (DIC e Ω_{cf}), probabilmente con un maggiore dispendio energetico necessario per mantenere gli effetti di trasporto degli ioni carbonato (i meccanismi di trasporto sono qui esemplificati dalla Ca ATP-asi, uno dei principali mediatori della biocalcificazione nei coralli). A causa dell'alto dispendio energetico che è probabilmente necessario per mantenere la calcificazione, *B. europaea* cambia il suo fenotipo scheletrico con una morfologia caratterizzata da ridotta densità apparente e maggiore porosità in macroscale e ridotti (misurato) tassi di calcificazione netti. (Fantazzini et al., 2015; Goffredo et al., 2014).

Il quadro generale mostra, quindi, che gli esemplari di *B. europaea* che vivono in un ambiente con valori di pH previsti per il 2100 secondo l'IPCC, abbiano raggiunto un nuovo equilibrio omeostatico in cui la maggiore densità algale garantisce un (maggiore) apporto nutrizionale per sostenere i processi fisiologici necessari alla fitness dell'olobionte, e contemporaneamente abbiano sviluppato un fenotipo poroso a causa della possibile alterazione/depotenziamento dei meccanismi molecolari che controllano la calcificazione. La drastica riduzione della diversità dei cladi di *Symbiodinium spp.* determina che la quasi totalità delle alghe presenti nel tessuto del corallo appartenga a un clade estremamente resistente alle perturbazioni ambientali, e quindi verosimilmente in grado di fornire all'olobionte una maggiore tolleranza allo stress ambientale. Però, la conseguente perdita di flessibilità della partnership simbiotica potrebbe rappresentare un fattore negativo nel caso di future condizioni ambientali mutate (Carpenter et al., 2008; Goffredo et al., 2008; Goffredo et al., 2009; Caroselli et al., 2011; Maynard et al., 2015; Baker et al., 2018).

I campioni prelevati durante questo lavoro di Tesi sono stati, in parte, utilizzati per il sequenziamento e l'annotazione di un trascrittoma di riferimento per *B. europaea* e per l'insieme di *Symbiodinium spp.* ad esso associato che è attualmente in corso. La definizione di questo trascrittoma permetterà di avere gli strumenti molecolari necessari alla comprensione dei meccanismi che regolano la partnership simbiotica in questo corallo e la sua regolazione nel quadro delle modificazioni fisiologiche e morfologiche osservate nei coralli di Panarea.

BIBLIOGRAFIA

- Al-Horani F, Al-Moghrabi SM, de Beer D. 2003. Microsensor study of photosynthesis and calcification in the scleractinian coral, *Galaxea fascicularis*: active internal carbon cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 288:1–15.
- Arif C, Daniels C, Bayer T, Banguera-Hinestroza E, Barbrook A, Howe CJ, LaJeunesse TC, Voolstra CR. 2014. Assessing *Symbiodinium* diversity in scleractinian corals via next-generation-based genotyping of the ITS2 rDNA region. *Mol Ecol* 23: 4418–4433.
- Baeza JA. 2007. The origins of symbiosis as a lifestyle in marine crabs (genus *Petrolisthes*) from the eastern Pacific: Does interspecific competition play a role? *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 42:7-21.
- Baillie BK, Belda-Baillie CA, Silvestre V, Sison M, Gomez AV, Gomez ED, Monje V. 2000. Genetic variation in *Symbiodinium* isolates from giant clams based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns. *Marine Biology* 136.
- Baker AC. 2001. Reef corals bleach to survive change. *Nature* 411:765-766.
- Baker AC. 2003. Flexibility and Specificity in Coral-Algal Symbiosis: Diversity, Ecology and Biogeography of *Symbiodinium*. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34:661-689.
- Baker DM, Freeman CJ, Wong JCY, Fogel ML, Knowlton N. 2018. Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. *ISME J.* 12, 921–930.
- Barbrook AC, Visram S, Douglas AE, Christopher JH. 2006. Molecular diversity of dinoflagellate symbionts of Cnidaria: the psbA minicircle of *Symbiodinium*. *Protist* 157:159–171.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brown, BE, Downs CA, Dunne RP, Gibb SW. 2002. Preliminary evidence for tissue retraction as a factor in photoprotection of corals incapable of xanthophyll cycling. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 277:129-144.
- Byrne M. 2012. Global change ecotoxicology: Identification of early life history bottlenecks in marine invertebrates, variable species responses and variable experimental approaches. *Mar. Environ. Res.* 76, 3–15.
- Capaccioni B, Tassi F, Vaselli O, Tedesco D, Rossi PL, 2005. The November 2002 degassing event at Panarea Island (Italy): five months of geochemical monitoring. *Annals of Geophysics*.
- Capaccioni B, Tassi F, Vaselli O, Tedesco D, Poreda R. 2007. Submarine gas burst at Panarea Island (southern Italy) on 3 November 2002: A magmatic versus

hydrothermal episode. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* (1978–2012), 112(B5).

-Caroselli E, Prada F, Pasquini L, Marzano FN, Zaccanti F, Falini G, Levy O, Dubinsky Z, Goffredo S. 2011. Environmental implications of skeletal micro-density and porosity variation in two scleractinian corals. *Zoology* 114, 255–264.

-Caroselli E, Falini G, Goffredo S, Dubinsky Z, Levy O. 2015a. Negative response of photosynthesis to natural and projected high seawater temperatures estimated by pulse amplitude modulation fluorometry in a temperate coral. *Front Physiol* 6:317.

-Caroselli E, Gizzi F, Prada F, Marchini C, Airi V, Kaandorp J, Falini G, Dubinsky Z, Goffredo S. 2018. Low and variable pH decreases recruitment efficiency in populations of a temperate coral naturally present at a CO₂ vent. *Limnol. Oceanogr.* 9999:1–11.

-Carpenter KE, Abrar M, Aeby G, Aronson RB, Banks S, Bruckner A, Chiriboga A, Cortés J, Delbeek JC, Devantier L, Edgar GJ, Edwards AJ, Fenner D, Guzmán HM, Hoeksema BW, Hodgson G, Johan O, Licuanan WY, Livingstone SR, Lovell ER, Moore JA, Obura DO, Ochavillo D, Polidoro BA, Precht WF, Quibilan MC, Reboton C, Richards ZT, Rogers AD, Sanciangco J, Sheppard A, Sheppard C, Smith J, Stuart S, Turak E, Veron JE, Wallace C, Weil E, Legno E. 2008. One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science* 321, 560; 10.1126/science.1159196.

-Casado-Amezúa P, Machordom A, Bernardo J, González-Wangüemert M. 2014. New insights into the genetic diversity of zooxanthellae in Mediterranean anthozoans. *Symbiosis* 63: 41–46.

-Casado-Amezúa P, Terrón-Sigler A, Pinzón JH, Furla P, Forcioli D, Allemand D, Ribes M, Coma R. 2016. General ecological aspects of anthozoan–*Symbiodinium* interactions in the Mediterranean Sea. In: Goffredo S, Dubinsky Z (eds) *The cnidaria, past, present and future: the world of medusa and her sisters*. Springer, Switzerland, pp 375–386.

-Connell SD, Gillanders BM. 2007. *Marine Ecology*. Oxford University Press.

-Davy SK, Allemand D, Weis VM. 2012. Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012;76:229–261.

-Decelle J, Carradec Q, Pochon X, Henry N, Romac S, Mahé F, Dunthorn M, Kourlaiev A, Voolstra CR, Wincker P, de Vargas C. 2018. Worldwide Occurrence and Activity of the Reef-Building Coral Symbiont *Symbiodinium* in the Open Ocean. *Curr. Biol.* 28:3625–3633.e3.

-Douglas AE. 2010. *The Symbiotic Habit*. First edition. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

- Esposito V, Anadaloro F, Canese S, Boroluzzi G, Bo M, Di Bella M, Italiano F, Sabatino G, Battaglia P, Consoli P, Giordano P, Spagnoli F, La Cono V, Yakimov MM, Scotti G, Romeo T. 2018. Exceptional discovery of a shallow-water hydrothermal site in the SW area of Basiluzzo islet (Aeolian archipelago, South Tyrrhenian Sea): An environment to preserve.
- Fantazzini P, Mengoli S, Pasquini L, Bortolotti V, Brizi L, Mariani M, Di Giosia M, Fermani S, Capaccioni B, Caroselli E, Prada F, Zaccanti F, Levy O, Dubinsky Z, Kaandorp JA, Konglerd P, Hammel JU, Dauphin Y, Cuif J-P, Weaver JC, Fabricius KE, Wagermaier W, Fratzl P, Falini G, Goffredo S. 2015. Gains and losses of coral skeletal porosity changes with ocean acidification acclimation. *Nat. Commun.* 6:7785.
- Frank AB. 1877. Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krstofflechten. *Cohn Beitr Biol Pflanz* 2:123-200.
- Franzellitti S, Airi V, Calbucci D, Caroselli E, Prada F, Voolstra CR, Mass T, Falini G, Fabbri E, Goffredo S. 2018. Transcriptional response of the heat shock gene hsp70 aligns with differences in stress susceptibility of shallow-water corals from the Mediterranean Sea. *Mar. Environ. Res.* 140:444–454.
- Gibbin EM1, Putnam HM2, Davy SK3, Gates RD2. 2014. Intracellular pH and its response to CO₂-driven seawater acidification in symbiotic versus non-symbiotic coral cells. *J Exp Biol.* Jun 1;217(Pt 11):1963-9.
- Goffredo S, Arnone S, Zaccanti F. 2002. Sexual reproduction in the Mediterranean solitary coral *Balanophyllia europaea* (*Scleractinia*, *Dendrophylliidae*). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 229, 83–94.
- Goffredo S, Caroselli, E, Mattioli G, Pignotti E, Zaccanti F. 2008. Relationships between growth, population structure and sea surface temperature in the temperate solitary coral *Balanophyllia europaea* (*Scleractinia*, *Dendrophylliidae*). *Coral Reefs* 27, 623–632.
- Goffredo S, Caroselli E, Mattioli G, Pignotti E, Dubinsky Z, Zaccanti F. 2009. Inferred level of calcification decreases along an increasing temperature gradient in a Mediterranean endemic coral. *Limnol. Oceanogr.* 54, 930–937.
- Goffredo S, Prada F, Caroselli E, Capaccioni B, Zaccanti F, Pasquini L, Fantazzini P, Fermani S, Reggi M, Levy O, Fabricius KE, Dubinsky Z, Falini G. 2014. Biomineralization control related to population density under ocean acidification. *Nat. Clim. Chang.* 4:593–597.
- Gordon BR, Loggatt W. 2010. *Symbiodinium*—invertebrate symbioses and the role of metabolomics. *Marine Drugs.* 2010;8:2546–68.
- Goulet TL. 2006. Most corals may not change their symbionts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 321, 1–7.

-Hughes TP, Hughes TP , Kerry JT , Álvarez-Noriega M , Álvarez-Romero JG , Anderson KD , Baird AH , Babcock RC , Beger M , Bellwood DR , Berkelmans R , Bridge TC , Butler IR , Byrne M , Cantin NE , Comeau S , Connolly SR, Cumming GS , Dalton SJ , Diaz-Pulido G , Eakin CM , Figueira WF , Gilmour JP , Harrison HB , Airone SF , Hoey AS , Hobbs JA , Hoogenboom MO , Kennedy EV , Kuo CY , Lough JM 1, , Lowe RJ, Liu G , McCulloch MT , Malcolm HA , McWilliam MJ Pandolfi JM , Pears RJ , Pratchett MS , Schoepf V , Simpson T , Skirving WJ , Sommer B , Torda G , Wachenfeld DR , Willis BL , Wilson SK . 2017. Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* 543:373–377.

-Hunter, CL, Morden CW, and Smith CM. 1997. The utility of ITS sequences in assessing relationships among zooxanthellae and coral. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium* 2:1599-1602.

-Hunter, RL, LaJeunesse TC, Santos SR. 2007. Structure and Evolution of the rDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) Region 2 in the Symbiotic Dinoflagellates (*Symbiodinium*, Dinophyta). *Journal of Phycology* 43:120-128.

-IPCC. 2014. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Intergov. Panel Clim. Chang. Geneva (Switzerland).

-Jones, AM, Berkelmans, R, van Oppen, MJH, Mieog, JC, Sinclair W. 2008. A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 275,1359 -1365.

-Kerrigan AM, Brown DG. 2009. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology.*

-Kets K, Darbah JNT, Sober A, Riikonen J, Sober J, Karnosky DF. 2010. Diurnal changes in photosynthetic parameters of *Populus tremuloides*, modulated by elevated concentrations of CO₂ and/or O₃ and daily climatic variation. *Environ. Pollut.* 158, 1000–1007

-Keshavmurthy S, Meng PJ, Wang JT, Kuo CY, Yang SY, Hsu CM, Gan CH, Dai CF, Chen CA. 2014. Can resistant coral-*Symbiodinium* associations enable coral communities to survive climate change? A study of a site exposed to long-term hot water input *Peer J* 2014 2 e327.

-Kwiatkowski, L, Cox P, Halloran PR, Mumby PJ, Wiltshire A.J. 2015. Coral bleaching under unconventional scenarios of climate warming and ocean acidification. *Nat. Clim. Chang.* 5, 777–781.

-LaJeunesse TC, Trench RK. 2000. Biogeography of Two Species of *Symbiodinium* (Freudenthal) Inhabiting the Intertidal Sea Anemone *Anthopleura elegantissima* (Brandt). *Biological Bulletin* 199:126-134.

- LaJeunesse TC. 2001. Investigating the biodiversity, ecology and phylogeny of endosymbiotic dinoflagellates in the genus *Symbiodinium* using the ITS region in search of a "species" level marker. *Journal of Phycology* 37:866-880.
- LaJeunesse, TC, Smith R, Walther M, Pinzon J, Pettay DT, McGinley M, Aschaffenburg M, Medina-Rosas P, Cupul-Magana AL, Perez LA, Reyes-Bonilla H, Warner ME. 2010. Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coraldinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *Proceedings of The Royal Society Biological Sciences* 277:2925-2934.
- Lee SY, Jeong HJ, Kang NS, Jang TY, Jang SH, LaJeunesse TC. 2015. *Symbiodinium tridacnidorum* sp. nov., a dinoflagellate common to Indo-Pacific giant clams, and a revised morphological description of *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal, emended Trench & Blank. *Eur. J. Phycol.* 50, 155–172.
- Levin RA, Beltran VH, Hill R, Kjelleberg S, McDougald D, Steinberg PD, Oppen MJH van. 2016. Sex, scavengers, and chaperones: transcriptome secrets of divergent *Symbiodinium* thermal tolerances. *Mol. Biol. Evol.* 33:2201–2215.
- Levy O, Kaniewska P, Alon S, Eisenberg E, Karako-Lampert S, Bay LK, Reef R, Rodriguez-Lanetty M, Miller DJ, Hoegh-Guldberg O. 2011. Complex diel cycles of gene expression in coral-algal symbiosis. *Science* (80-). 331:175.
- Liu H, Stephens TG, González-Pech RA, Beltran VH, Lapeyre B, Bongaerts P, Cooke I, Aranda M, Bourne DG, Forêt S, Miller DJ, van Oppen MJH, Voolstra CR, Ragan MA, Chan CX. 2018. *Symbiodinium* genomes reveal adaptive evolution of functions related to coral-dinoflagellate symbiosis. *Commun. Biol.* 1:95.
- Logan DDK, LaFlemme AC, Weis VM, Davy SK. 2010. Flow-Cytometric Characterization of the Cell-Surface Glycans of Symbiotic Dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.). *Journal of Phycology* 46:525-533.
- Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Andrades-Moreno L, Davy AJ. 2010. Growth and photosynthetic responses of the cordgrass *Spartina maritima* to CO₂ enrichment and salinity. *Chemosphere* 81, 725–731
- Mayfield AB, Gates RD. 2007. Osmoregulation in anthozoan-dinoflagellate symbiosis. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147:1-10.
- Maynard J, van Hooidonk R, Eakin CM, Puotinen M, Garren M, Williams G, Heron SF, Lamb J, Weil E, Willis B, Hervell CD. 2015. Projections of climate conditions that increase coral disease susceptibility and pathogen abundance and virulence. *Nature Climate Change*, 5, 688-694.
- Mies M, Voolstra CR, Castro CB, Pires DO, Calderon EN, Sumida PYG. 2017c. Expression of a symbiosis-specific gene in *Symbiodinium* type A1 associated with coral, nudibranch and giant clam larvae. *R. Soc. Open Sci.* 4:170253. doi: 10.1098/rsos.170253.

- Moya A, Tambutté S, Béranger G, Gaume B, Scimeca JC, Allemand D, Zoccola D. 2008. Cloning and use of a coral 36B4 gene to study the differential expression of coral genes between light and dark conditions. *Mar. Biotechnol.* 10:653– 663.
- Moya A, Tambutté S, Bertucci A, Tambutté E, Lotto S, Vullo D, Supuran CT, Allemand D, Zoccola D. 2008. Carbonic anhydrase in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: characterization, localization, and role in biomineralization. *J. Biol. Chem.* 283:25475–25484.
- Muscatine L, Hand C. 1958. Direct evidence for the transfer of materials from symbiotic algae to the tissues of a coelenterate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 44:1259 –1263.
- Muscatine L, Lenhoff HM. 1965. Symbiosis of hydra and algae. II. Effects of limited food and starvation on growth of symbiotic and aposymbiotic hydra. *Biol. Bull.* 129:316 –328.
- Norikane A, Takamura T, Morokuma M, Tanaka M. 2010. In vitro growth and single-leaf photosynthetic response of *Cymbidium* plantlets to super-elevated CO₂ under cold cathode fluorescent lamps. *Plant Cell Rep.* 29, 273–283
- Perez SF. 2007. Exploring the cellular mechanisms of Cnidarian bleaching in the sea anemone *Aiptasia pallida*. Dissertation. Oregon State University, Oregon.
- Pochon X, Montoya-Burgos JI, Stadelmann B, Pawlowski J. 2006. Molecular phylogeny, evolutionary rates, and divergence timing of the symbiotic dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38:20-30.
- Pochon X, Gates RD. 2010. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56:492-497.
- Pochon X, Stat M, Takabayashi M, Chasqui L, Chauka LJ, Logan DDK, Gates RD. 2010. Comparison of endosymbiotic and free-living *Symbiodinium* (Dinophyceae) diversity in Hawaiian reef environment. *Journal of Phycology* 46:53-65.
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raharinirina NA, Brandt G, Merico A. 2017. A trait-based model for describing the adaptive dynamics of coral-algae symbiosis. *Front. Ecol. Evol.* 5, 31.
- Ritchie RJ. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls *a*, *b*, *c*, and *d* and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46, 115–126.

- Robinson JD, Warner ME. 2006. Differential impacts of photoacclimation and thermal stress on the photobiology of four different phylotypes of *Symbiodinium* (Pyrrophyta). *Journal of Phycology* 42:568-579.
- Rodolfo-Metalpa R, Richard C, Allemand D, Bianchi CN, Morri C, Ferrier-Pagès C. 2006. Response of zooxanthellae in symbiosis with the Mediterranean corals *Cladocora caespitosa* and *Oculina patagonica* to elevated temperatures. *Marine Biology* 150: 45–55.
- Rouzé H, Lecellier GJ, Saulnier D, Planes S, Gueguen Y, Wirshing HH, Berteaux-Lecellier V. 2017. An updated assessment of *Symbiodinium* spp. that associate with common scleractinian corals from Moorea (French Polynesia) reveals high diversity among background symbionts and a novel finding of clade B. *PeerJ* 5:e2856
- Rowan R, Powers DA. 1991. A molecular genetic classification of zooxanthellae and the evolution of animal-algal symbioses. *Science* 251:1348-1351.
- Sampayo EM, Dove S, LaJeunesse TC. 2009. Cohesive molecular genetic data delineate species diversity in the dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *Molecular Ecology* 18:500-519.
- Savage AM, Goodson MS, Visram S, Trapido-Rosenthal H, Wiedenmann J, Douglas AE. 2002. Molecular diversity of symbiotic algae at the latitudinal margins of their distribution: dinoflagellates of the genus *Symbiodinium* in corals and sea anemones. *Mar Ecol Prog Ser* 244:17–26.
- Schultz J, Muller T, Achtziger M, Siebel PN, Dandekar T, Wolf M. 2006. The internal transcribed spacer 2 database - a web server for (not only) low level phylogenetic analyses. *Nucleic Acids Research* 34:Web Server Issue.
- Stat M, Carter D, Hoegh-Guldberg O. 2006. The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts - Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systemics* 8:23-43.
- Stat M, Morris E, Gates RD. 2008. Functional diversity in coral-dinoflagellate symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:9256–9261.
- Takabayashi M, Santos SR, Cook CB. 2004. Mitochondrial DNA phylogeny of the symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*, *Dinophyta*). *Journal of Phycology* 40:160-164.
- Towanda T, Thuesen EV. 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.
- Trappe JM. 2005. A B Frank and mycorrhizae: The challenge to evolutionary and ecologic theory. *Mycorrhiza* 15:277-281.

- Trench RK. 1971. The Physiology and Biochemistry of Zooxanthellae Symbiotic with Marine Coelenterates. I. The Assimilation of Photosynthetic Products of Zooxanthellae by Two Marine Coelenterates. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 177, 225–235.
- Trench RK. 1971. The Physiology and Biochemistry of Zooxanthellae Symbiotic with Marine Coelenterates. II. Liberation of Fixed ¹⁴C by Zooxanthellae *in Vitro*. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 177, 237–250.
- Trench RK. 1971. The Physiology and Biochemistry of Zooxanthellae Symbiotic with Marine Coelenterates. III. The Effect of Homogenates of Host Tissues on the Excretion of Photosynthetic Products *in Vitro* by Zooxanthellae from Two Marine Coelenterates. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 177, 251–264.
- Venn AA, Tambutté E, Holcomb M, Allemand D, Tambutté S. 2011. Live tissue imaging shows reef corals elevate pH under their calcifying tissue relative to seawater. *PLoS One* 6:e20013.
- Vidal-Dupiol J, Adjeroud M, Roger E, Foure L, Duval D, Mone Y, Ferrier-Pages C, Tambutte E, Tambutte S, Zoccola D, Allemand D, Mitta G. 2009. Coral bleaching under thermal stress: putative involvement of host/symbiont recognition mechanisms. *BMC Physiology*.
- Visram S, Wiedenmann J, Douglas AE. 2006. Molecular diversity of symbiotic algae of the genus *Symbiodinium* (Zooxanthellae) in cnidarians of the Mediterranean Sea. *J Mar Biol Assoc UK* 86: 1281–1283.
- Weis VM, Reynolds WS, DeBoer MD, Krupp DA. 2001. Host-symbiont specificity during onset of symbiosis between the dinoflagellates *Symbiodinium spp.* and planula larvae of the scleractinian coral *Fungia scutaria*. *Coral Reefs* 20, 301–308.
- Weis VM. 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *The Journal of Experimental Biology* 211:3059-3066.
- Weis VM, Davy SK, Hoegh-Guldberg O, Rodriguez-Lanetty M, Pringle JR. 2008. Cell Biology in model systems as the key to understanding corals. *Trends in Ecology and Evolution* 23:369-376.
- Wooldridge SA. 2012. Breakdown of the coral-algae symbiosis: towards formalising a linkage between warm-water bleaching thresholds and the growth rate of the intracellular zooxanthellae. *Biogeosciences*. 2012;9:8111–39.

RINGRAZIAMENTI

Volevo ringraziare la professoressa Silvia Franzellitti che mi ha aiutato a sviluppare e portare avanti questo progetto. Ringrazio inoltre le dottoresse Margherita Musella e Giorgia Paladino che hanno svolto le analisi bioinformatiche, senza le quali sarei stata persa. Ringrazio inoltre la mia famiglia, il mio ragazzo e tutti gli amici che mi sono stati vicini in questi anni, permettendomi di intraprendere questo percorso di studi che tanto mi appassiona e coinvolge. Ringrazio chi ha creduto in me e anche chi non ci ha creduto, perché mi ha spronato a dare il meglio e a non arrendermi mai, nemmeno di fronte agli ostacoli più difficili da superare.

Questo traguardo è tutto per noi: grazie per esserci stati sempre.