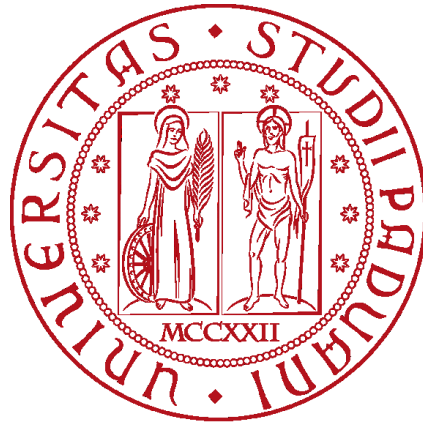


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

Effetti di variazioni ambientali sulla fisiologia della simbiosi nei coralli

Tutor: Prof. ssa Maria Gabriella Marin

Dipartimento di Biologia

Laureando: Riccardo Bernardi Malagugini

Anno Accademico 2021/2022

Abstract

Per compensare le variazioni dei valori medi di molti parametri ambientali, diverse specie di coralli calcificanti adottano strategie che alterano non solo il loro metabolismo ma anche le relazioni con i loro simbionti. Eventi come l'acidificazione degli oceani, il frequente aumento delle temperature e l'attacco di patogeni come proliferazioni batteriche o infezioni virali, mettono a dura prova la gestione di sostanze dannose come i radicali liberi dell'ossigeno.

Anche la disponibilità di luce può avere conseguenze a livello metabolico, come ad esempio sul tasso di deposizione degli scheletri carbonatici, dipendente dal benessere degli endobionti e dalla protezione tramite aminoacidi microsporinici delle cellule del corallo.

Per capire quali risposte possano essere più adattative al variare di un dato fattore ambientale è necessario approfondire i meccanismi biologici più importanti, soprattutto quelli coinvolti nella simbiosi come ad esempio il riconoscimento ospite-alga, i meccanismi immunitari del corallo, i fattori di controllo delle popolazioni di simbionti, apoptosi e autofagia come meccanismi compensatori dello stress. Anche l'insediamento delle larve e l'acquisizione dei simbionti può essere ostacolato da determinati fattori, come ad esempio il pH oceanico, oppure un eccesso di fosfato come inibitore della deposizione dello scheletro carbonatico.

I cambiamenti di espressione genica, trascrizione proteica e feedback regolatori sia nel corallo che nei dinoflagellati endosimbionti permettono l'analisi più approfondita dei problemi derivanti da una interazione specializzata, lasciando aperte possibili soluzioni per far fronte alle conseguenze dei cambiamenti climatici negli ecosistemi di barriera

Indice

1. Introduzione	p. 1
2. Il ruolo centrale del sistema immunitario nella simbiosi	p. 2
3. La comunicazione tra coralli e simbionti	p. 6
4. Temperatura	p. 8
5. Acidificazione degli oceani	p. 10
6. Effetti combinati di pH e temperatura	p. 13
7. Luce	p. 14
8. Disponibilità di Azoto e Fosforo	p. 15
9. Aumentare la resistenza e prevenire lo sbiancamento	p. 17
10. Conclusioni	p. 19
11. Letteratura citata	p. 20
12. Sitografia	p. 24

1. Introduzione

Gli ambienti di barriera corallina sono fra i più importanti ecosistemi marini al mondo: ospitano più di $\frac{2}{3}$ della biodiversità marina globale, sebbene occupino circa l'1% dei nostri oceani. La particolare struttura di questi ambienti è resa possibile grazie alla deposizione di scheletri solidi da parte di coralli detti calcificanti, i quali creano strutture estremamente diversificate tra le varie specie, aumentando il numero di nicchie ecologiche e favorendo la biodiversità. L'incredibile produttività di questi ecosistemi, nonostante le acque oligotrofiche povere di nutrienti, è garantita dalla simbiosi presente tra i dinoflagellati del genere *Symbiodinium* e gli Antozoi sia calcificanti che non, attraverso una relazione altamente specializzata che pone le alghe monocellulari all'interno di un vacuolo detto simbiosoma, a livello delle cellule del gastroderma dei polipi dell'intera colonia corallina.

Questa simbiosi coinvolge lo scambio dei nutrienti e dei fotosintati, dai coralli ai dinoflagellati simbiotici e viceversa, in un equilibrio che genera benefici da entrambe le parti: il corallo regola l'apporto di nutrienti quali ammonio e fosfato ai simbiotici (Tanaka et al., 2018), determinando la crescita della popolazione di alghe all'interno del suo gastroderma, mentre le alghe rilasciano prodotti della fotosintesi (carboidrati, lipidi, aminoacidi) che incrementano nel corallo il tasso di deposizione dello scheletro di carbonato di calcio (Allemand et al., 2004) e soddisfano la maggior parte delle richieste energetiche legate a crescita e riproduzione. Le alghe inoltre, essendo all'interno di un organismo bentonico sono in questo modo riparate non solo dal grazing di erbivori planctonici ma anche dai danni da raggi UV, in quanto il corallo produce delle sostanze dette MAA (aminoacidi microsporinici) in grado di proteggerle da queste radiazioni (van Oppen & Medina, 2020).

Recenti alterazioni delle condizioni climatiche globali e l'inquinamento hanno messo in evidenza la fragilità della relazione simbiotica: la capacità da parte del corallo di espellere i suoi simbiotici è dovuta al fatto che questi in condizioni di stress producono radicali liberi che compromettono la salute dell'organismo coloniale. Condizioni di stress possono essere determinate

da una serie di alterazioni ambientali che comprendono l'acidificazione degli oceani, l'innalzamento delle temperature per periodi prolungati, ma anche la disponibilità di ammonio e fosfati, la densità di popolazione dei simbionti, la vulnerabilità ad attacchi di patogeni, la presenza di sostanze inquinanti e l'intensità luminosa non adeguata.

Il sistema immunitario dei coralli in grado di contrarre simbiosi è particolarmente sofisticato rispetto a quello di altri antozoi, in quanto sono necessarie diverse vie di riconoscimento dei simbionti, di regolazione delle loro popolazioni, di difesa contro patogeni e di gestione dei ROS (radicali liberi dell'ossigeno) (Shinzato et al., 2011; van Oppen & Medina, 2020). L'acquisizione selettiva dei simbionti è infatti mediata da interazioni proteiche che permettono l'ingresso solo per alghe di specie compatibili, che possono essere acquisite o in maniera orizzontale durante i primi stadi di sviluppo, o essere trasmesse in maniera verticale direttamente prima della fecondazione (Hoadley et al., 2019; Rodriguez-Lanetty et al., 2006; Quigley & Bay, 2017).

2. Il ruolo centrale del sistema immunitario nella simbiosi

Nei coralli ospiti, i simbionti unicellulari sono ospitati nel tessuto gastrodermico (endodermico) in vacuoli intracellulari noti come simbiosomi. Questa intima relazione richiede stretta coordinazione di vario genere tra i partner, tra cui:

- la capacità dei partner di riconoscere ospiti/simbionti sia per trasmissione verticale che orizzontale (Quigley & Bay, 2017);
- la necessità degli ospiti di regolare la crescita dei simbionti (vedi disponibilità di azoto e fosforo) (Morris et al., 2019);
- la corrispondente capacità degli ospiti di tollerare la presenza dei simbionti, dalla gestione dei ROS al distinguere patogeni da simbionti (Traylor-Knowles & Connelly, 2017);
- la presenza di adattamenti per il trasporto dei metaboliti e lo scambio di nutrienti sia per i simbionti (Host Release Factor)

(Jones, 2005; Davy & Cook, 2001) sia per gli ospiti (fosfati e azoto) (Morris et al., 2019);

- la possibilità per il corallo di espellere i simbionti nel caso non vi sia più una relazione equa di simbiosi (apoptosi e autofagia) (Rosic et al., 2011).

Per quanto riguarda l'acquisizione di simbionti, seguendo le due modalità di trasmissione, verticale o orizzontale, si possono delineare due diverse strategie: una trasmissione verticale garantisce la possibilità di fare la fotosintesi, tuttavia, l'acquisizione dei simbionti in maniera orizzontale durante le prime fasi di sviluppo fornisce la possibilità di selezionare le specie di alghe più adatte per quel determinato areale, garantendo una fotosintesi più efficace rispetto a quella data dalla trasmissione verticale, dato che il simbionte trasmesso può non essere il più efficiente nel luogo dove si è insediata la nuova colonia (Hoadley et al., 2019). Un chiaro esempio si è visto per le popolazioni di coralli costieri o non costieri di Palau, i primi ospitanti maggiormente popolazioni di *Durusdinium* (clade D) mentre gli altri ospitanti *Cladocopium* (clade C) (Hoadley et al., 2019).

Il sistema di riconoscimento fra ospite e simbionte, sebbene sia poco conosciuto, comprende un meccanismo di chiave-serratura fra lecitine situate sulla membrana cellulare dei coralli e glicoproteine su quella dei dinoflagellati, permettendo in questo modo un riconoscimento specie-specifico (van Oppen & Medina, 2020; Rossetto et al., 2021). Le lecitine sono necessarie per mantenere questo riconoscimento anche dopo la prima interazione. Una volta riconosciuto un simbionte, la nuova colonia corallina ora insediata tende a scartare nuove interazioni per un tempo considerevole in maniera tale da favorire la crescita di una (o poche) specie di simbionti (Palmer et al., 2009). Il vantaggio di avere il minor numero di specie possibili, ma in grande abbondanza all'interno della colonia corallina è un aspetto che riguarda sia il controllo della crescita delle popolazioni di simbionti che le risposte unisone delle alghe ai fattori immunitari del corallo. È più efficace poter controllare l'efficienza e il numero dei propri simbionti producendo un'unica sostanza piuttosto che dover produrre sostanze diverse per ciascuna specie. Recenti studi

dimostrano però che stress termici favoriscono un cambio di popolazione all'interno della colonia; ciò è dovuto al fatto che risulta meno dannoso per il corallo avere simbionti in grado di contrastare lo stress ossidativo in maniera più efficace, prevenendo così i fenomeni di sbiancamento (o riducendo comunque gli effetti dannosi) (Quigley & Bay, 2017; Berkelmans & van Oppen, 2006). La complessità del sistema immunitario dei coralli calcificanti, è particolarmente visibile nell'abbondanza di NLR (nod-like-receptors) contenenti domini NACHT e/o NB-ARC (simili per funzione) (**fig.1**): nel caso di *Acropora digitifera* sono state identificate ben 468 proteine contenenti questi domini (più di quelle presenti nell'uomo) e si ritiene che il numero elevato sia dovuto al fatto che queste proteine sono probabilmente coinvolte nelle interazioni fra alga simbiote e animale. I domini NACHT, infatti, sono condivisi da prodotti genici di resistenza delle alghe e regolatori della morte cellulare e della risposta immunitaria innata negli animali (Shinzato et al., 2011; Traylor-Kowles & Connelly, 2017). Anche l'immunità innata è particolarmente complessa nei coralli capaci di fare simbiosi: essi mostrano un sistema del complemento funzionale (identificate proteine con funzione analoga a C3); molti recettori TLR (Toll-like-receptors), in grado di riconoscere membrane batteriche e infine recettori di molecole scavenger capaci di reagire a condizioni di stress ossidativo. Questi sistemi di difesa sono legati o al sistema di amplificazione delle MAP-chinasi o al sistema di segnalazione tramite il fattore NF-kB, i quali comportano nel nucleo l'attivazione della risposta infiammatoria esprimendo citochine (anche ossido nitrico in caso di stress prolungato) (van Oppen & Medina, 2020).

È risaputo che la fragilità della simbiosi è causata in primo luogo dallo stress ossidativo prodotto da composti reattivi originati dal malfunzionamento del fotosistema II delle alghe endosimbionti, dunque il corallo non solo è in grado di produrre MAAs ma ha anche una catena di smaltimento dei ROS molto efficiente, dove si aggiungono alla superossido dismutasi delle Proteine Fluorescenti (CFP, GFP, RFP, CP) che agiscono sia da schermo contro la luce UV potenzialmente dannosa,

sia da antiossidanti per H_2O_2 , radicale di scarto della superossido dismutasi (van Oppen & Medina, 2020; Palmer et al., 2009).

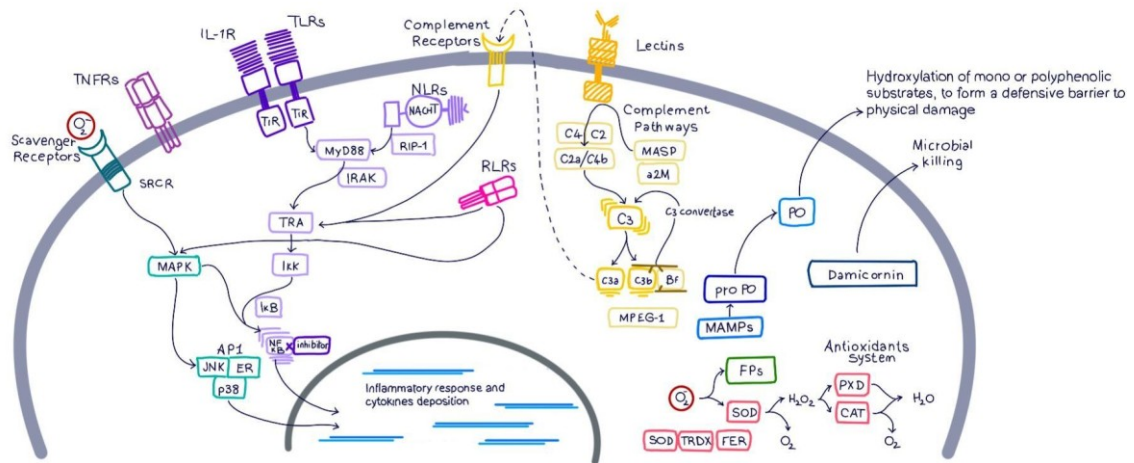


Fig.1 (modificato da Traylor-Knowles & Connelly, 2017)

Diversità dei recettori dell'immunità innata, segnalazioni intracellulari e meccanismi effettori presenti nel sistema immunitario del corallo. I recettori TLR e NLR con domini NACHT interagiscono con omologhi della proteina della risposta mieloide MyD88, con la chinasi legante IL-1R (un attivatore delle interleuchine di tipo 1) e con una molecola intermediaria detta TNF receptor-associated factor 6 (TRAF). Il segnale attiva la chinasi Ikk che scinde gli inibitori del fattore NF- κ B, ora libero di migrare nel nucleo ed aumentare l'espressione delle citochine infiammatorie. Il sistema delle lectine di tipo C è collegato al sistema del complemento, che comprende omologhi di C3, fattore B e serin-proteasi associate a mannosio. Molecole segnale intracellulari della via del complemento contribuiscono alla risposta infiammatoria ricollegandosi all'intermedio TRA, assieme a RLRs e TNFRs (recettori dell'immunità innata sia intracellulari che di membrana). Pattern molecolari di tipo microbico (MAMPs) attivano la via enzimatica proPO, la quale coadiuva la reazione di idrossilazione di substrati mono- o polifenolici da parte di fenolossidasi, per formare una barriera difensiva al danno fisico.

3. La comunicazione fra coralli e simbiotici

Nonostante le potenziali difficoltà a livello immunitario, la simbiosi ha un bilancio energetico estremamente vantaggioso, fintanto che le condizioni ambientali rimangono favorevoli. I meccanismi che mediano lo scambio dei nutrienti sono complessi e regolabili da entrambe le parti: il corallo costruisce lo scheletro carbonatico con una maggiore velocità di giorno, mentre le zooxantelle possono tenere o rilasciare i lipidi ottenuti con la fotosintesi in base alla loro necessità energetica (Tang et al., 2022). Questi modelli non sono basati su un'idea di mutualismo, bensì di competizione; infatti, le zooxantelle simbiotici crescono in base alla disponibilità di azoto e fosforo e allo stesso tempo, la quantità dei fotosintati rilasciati (zuccheri e lipidi) rende la simbiosi per il corallo un vantaggio energetico anziché un costo.

La comunicazione cellulare di un organismo in simbiosi è poco conosciuta, sebbene sia utile per distinguere come questi scambi di nutrienti avvengano e come possano essere regolati di conseguenza. Un modello ideale di studio è *Aiptasia* poiché ha una simbiosi facoltativa, pertanto può essere mantenuto privo di simbiotici lasciando la possibilità di confrontare quali geni sono espressi diversamente (Rädecker et al., 2018). La via di segnalazione mediata da fosfatidil inositolo, sebbene non sia ancora stata studiata in *Aiptasia*, determina nel corallo una risposta cellulare mediata da fosfatidil chinasi e fosfatasi che rispecchia il benessere energetico dell'organismo, regolando crescita cellulare, apoptosi e infiammazione dei tessuti. Il sistema di segnalazione delle ossilipine è regolato positivamente quando è presente la simbiosi, in particolare le ossilipine basate su acido cervonico, suggerendo che alcune ossilipine che si pensava avessero un ruolo anti-infiammatorio possono invece servire per smorzare la difesa immunitaria dell'ospite (Rosset et al., 2021). Gli steroli invece sono essenziali per il fabbisogno energetico poiché molti cnidari non sono in grado di sintetizzarli, tuttavia, sono stati identificati dei trasportatori non canonici omologhi a NPC2 adattati all'ambiente acido del simbiosoma, in grado di trasferire gli steroli dal simbiote all'ospite (**fig2**).

È stato visto inoltre che in alcuni coralli duri come *Montipora capitata* o *Pocillopora acuta* c'è una sovrabbondanza di dipeptidi rispetto ai metaboliti primari, soprattutto in condizioni di stress. Il rapido turnover di queste molecole suggerisce che i dipeptidi potrebbero avere una funzione di comunicazione fra ospite e rispettivi simbiotici (Williams et al., 2021).

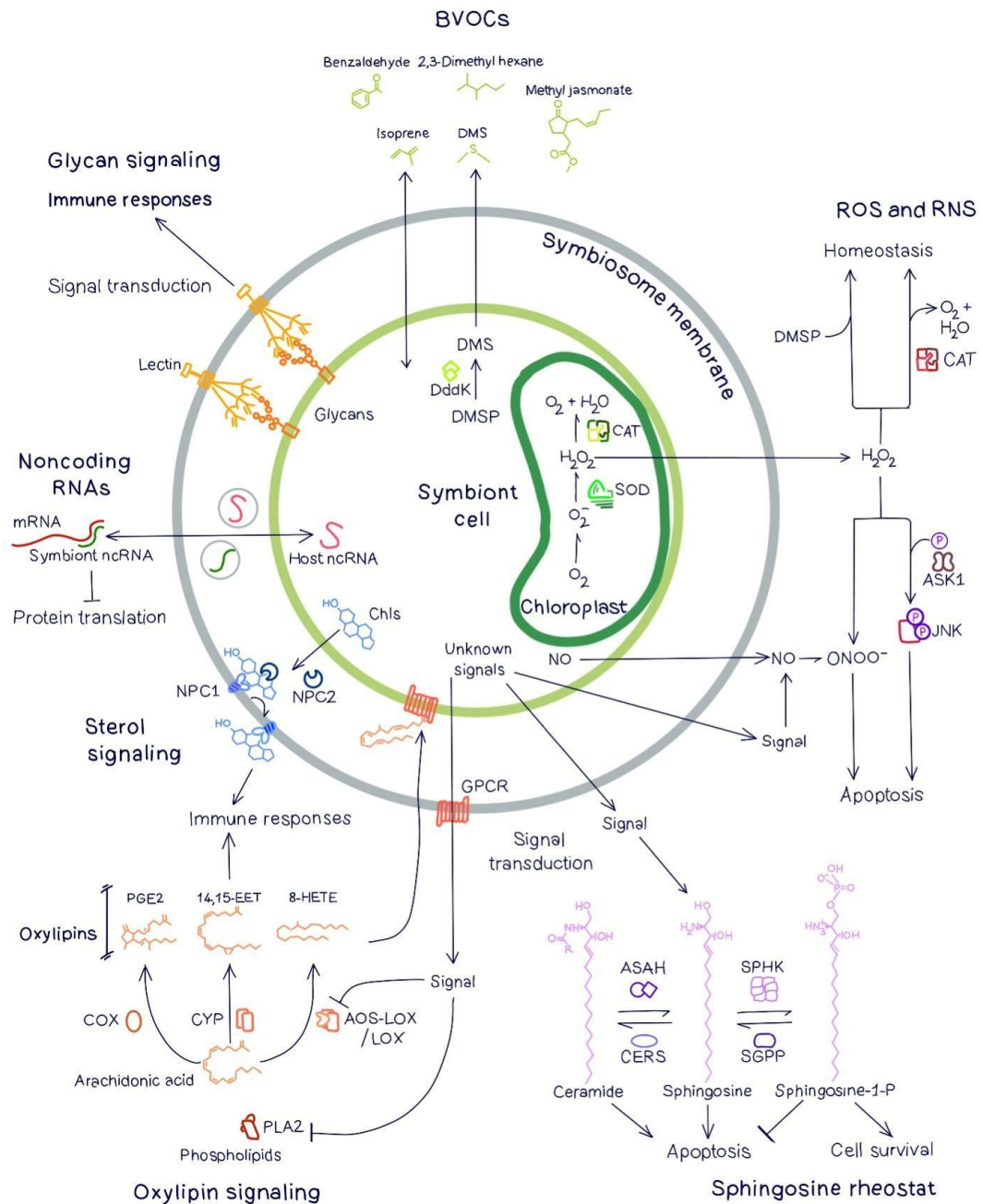


Fig.2 (modificato da Rosset et al., 2021)

Modello dei principali meccanismi di segnalazione fra ospite e simbiote. In alto a sinistra il sistema di riconoscimento attraverso il meccanismo

chiave-serratura fra lecitine e glicani. A partire dall'interno del cloroplasto il sistema di antiossidanti per lo smaltimento di radicali liberi prodotti dalla fotosintesi. In basso a sinistra la segnalazione mediata da ossilipine, di fianco al sistema di scambio degli steroli, ambedue provocanti risposte immunitarie nel corallo.

4. Temperatura

Fra tutti i fattori ambientali, la temperatura gioca il ruolo di maggiore importanza nel determinare una condizione di stress, per entrambi i partner. Come diretta conseguenza del riscaldamento globale, negli ultimi decenni ci sono stati aumenti rilevanti delle temperature superficiali medie estive nella maggior parte delle regioni colpite da fenomeni di sbiancamento. È sufficiente che le temperature si alzino sopra la media (arrivando sopra i 30°C) in un periodo relativamente breve (1 settimana e mezza) per causare la moria di intere popolazioni in ecosistemi di barriera ad acque relativamente basse (Cleves et al., 2020).

Ciò che è attualmente conosciuto riguardo il meccanismo di risposta alle alte temperature comprende in primo luogo l'espressione di proteine di risposta a shock termico (Heat Shock Proteins HSP) da parte sia dei coralli che dei dinoflagellati simbiotici (Rosic et al., 2011; Seveso et al., 2020); vengono indotte anche proteine chaperone, che garantiscono il corretto ripiegamento, aggregazione, disgregazione e trasporto delle altre proteine metabolicamente funzionali. Allo stesso tempo, si è visto che i ROS prodotti dal danno al fotosistema II delle alghe innescano dapprima un'aumentata attività delle vie anti ossidative (per entrambi i partner) e successivamente una produzione di acido nitrico nel corallo grazie all'attivazione del fattore NF-κB che porta ad apoptosi delle cellule del gastroderma (van Oppen & Medina, 2020). Secondo le più recenti analisi di trascrittomica, colonie esposte ad alte temperature vanno incontro alle seguenti risposte per ridurre quanto più possibile i danni ossidativi:

- aumento dell'espressione di proteine di risposta a shock termico HSP,
- aumento dell'espressione di antiossidanti: Cu/ZnSOD (superossido dismutasi), ASPX, CAT(catalasi), FP(proteine fluorescenti),
- diminuzione dell'omeostasi del Ca^{2+} tramite espressione ridotta di proteine contenenti dominio EF-hand,
- riduzione del metabolismo di deposizione dell'esoscheletro (tramite cambiamento strutturale dell'ECM),
- riarrangiamento del citoscheletro di actina,
- diminuzione dell'espressione delle proteine ribosomiali,
- risposte pro-apoptiche.

A differenza dello stress da irraggiamento, descritto in seguito, i danni termici incrementano sia la degradazione sia la denaturazione proteica soprattutto nelle prime ore seguenti l'aumento di temperatura. I danni ossidativi sono una conseguenza di uno stress prolungato che porta a risposte sia metaboliche che immunitarie (nel peggiore dei casi), quando il corallo espelle i propri simbionti o li degrada.

Questi modelli di risposta non sono limitati solo alle colonie adulte, ma studi sullo stress termico sullo sviluppo larvale e sulle larve hanno mostrato risposte cellulari simili. Ruoli importanti sono svolti da proteine come la perossidasi, coinvolta nella gestione dei ROS con una funzione antiossidante, proteine attivatrici come C/EBP che mediano proliferazione cellulare e differenziamento, e infine proteine contenenti il dominio EF-hand (Lee et al., 2018) (legante il calcio) fra cui le calmoduline, che vengono espresse in maniera diversa durante l'innalzamento delle temperature. I loro pattern di espressione genica possono essere usati in sinergia come biomarker assieme ad altri indicatori come NF- κ B, la caspasi 3, Cu/Zn SOD (superossido dismutasi) e TRAF3 (TNF receptor-associated factor 3) mostrando meccanismi di espressione simili tra specie di coralli differenti (Cziesielski et al., 2019).

Durante lo stress termico sono positivamente regolate le vie metaboliche di antiossidanti, Nod like receptors, TNFR (che attivano le risposte pro-

infiammatorie), la via enzimatica di induzione della fenolossidasi (PO), un enzima che interviene nella risposta immunitaria ai danni fisici. Al contrario risentono di una regolazione negativa le lectine di tipo C, facendo terminare il rapporto di simbiosi corallo-alga, in aggiunta alla via di AmAMP1 e delle damicornine, una serie di antimicrobici specifici per molti coralli (come *Acropora millepora*), che abbassandosi riducono le difese utili contro batteri sia gram-positivi che gram-negativi (Mason et al., 2021). La via del complemento invece è complessivamente ridotta o aumentata relativamente a diversi geni chiave per la risposta infiammatoria, stabilendo un bilanciamento non corretto delle rispettive componenti e provocando fenomeni di sbiancamento (Shinzato et al., 2011).

5. Acidificazione degli oceani

Gli effetti primari dell'acidificazione degli oceani sono maggiormente visibili per quanto riguarda i tassi di deposizione degli scheletri carbonatici.

Per l'accrescimento delle colonie infatti, i polipi del corallo usano parte dei fotosintati per la deposizione di una struttura solida, principalmente composta di cristalli di aragonite. Vi sono due metodologie di biomineralizzazione: la prima comprende le reazioni di interfaccia fra le membrane del calicoderma (ectodermico) e l'esoscheletro, non coordinate fra loro. La seconda invece prevede l'escrezione di matrici biologiche che guidino il processo di nucleazione iniziale. Il calcio, pompato attivamente dalla Ca^{2+} ATPasi, si lega con il carbonio derivante dalla CO_2 prodotta da respirazione mitocondriale che diventa ione carbonato, grazie all'azione dell'anidrasi carbonica (Kleypas et al., 2006, Cohen & Holcomb, 2009). Lo spazio fra il calicoderma e lo scheletro carbonatico è occupato da una matrice detta ECM (extracellular calcifying matrix) il cui pH deve essere molto più basico rispetto al pH dell'acqua di mare per consentire la reazione di calcificazione. In aggiunta, grazie alle proteine ricche in asparagina, è possibile legare attivamente il calcio per favorire la reazione con CO_3^{2-} . Alcune di queste sono la Galaxina (unica proteina della matrice di cui si conosce anche il modello strutturale) e le proteine SAP,

identificate in *Acropora*. L'Interazione tra fotosintesi e biomineralizzazione avviene principalmente grazie al flusso di carbonio inorganico disciolto (DIC); la bassa pressione parziale di CO₂ nei tessuti superficiali dovuta alla fotosintesi stimola la deposizione dello scheletro carbonatico in posizione corretta, allo stesso tempo, si ritiene che gli idrogenioni derivati dalla calcificazione vengano neutralizzati a livello di celenteron dal pompaggio di anioni OH⁻ per evitare il che il processo di deposizione avvenga dove non necessario (Kleypas et al., 2006; Allemand et al., 2004). Durante la notte, alte concentrazioni di CO₂, ridotta tensione di ossigeno e bassi livelli di ATP inibiscono la precipitazione di carbonati, correlando la crescita delle colonie coralline direttamente all'attività fotosintetica dei simbionti.

L'acidificazione degli oceani riduce il pH e quindi l'abbondanza di ioni carbonato nell'acqua di mare. I coralli che vivono nell'acqua di mare acidificata continuano a produrre CaCO₃ e consumano tanta energia quanto le loro controparti nell'acqua di mare normale per aumentare il pH della matrice calcificante (Allemand et al., 2004). Tuttavia, nell'acqua di mare acidificata, i coralli non sono in grado di elevare la concentrazione di ioni carbonato al livello richiesto per la normale crescita scheletrica (Cornwall et al., 2021). È stato scoperto che un aumento dello stato energetico dei coralli mediante una maggiore alimentazione eterotrofa o un moderato aumento dei nutrienti inorganici ha contribuito a compensare l'impatto negativo dell'acidificazione dell'acqua di mare. Tuttavia, nonostante il fatto che questa difesa integrata vada a beneficio dei coralli, la maggior parte dei modelli climatici prevede che la disponibilità di nutrienti inorganici e plancton nelle acque superficiali diminuirà a causa del riscaldamento globale. Si prevede che il livello di acidità superficiale degli oceani sarà più alto del 200-250% e che questi livelli di acidità da soli ridurranno il tasso di deposizione dello scheletro carbonatico del 46% (Langdon & Haider, 2022).

Ci sono anche conseguenze a livello di riproduzione, comportamento delle larve e stabilità del microbiota (Nakamura et al., 2011; Albright, 2011). Recenti studi hanno dimostrato che una colonia sottoposta a stress da

riduzione di pH mostra un cambiamento radicale delle abbondanze relative dei propri microrganismi endosimbionti (come *Endozoicomonas*) e che vengano favoriti i microrganismi bio-erosivi come *Ostreobium* (Shore et al., 2021). Le larve planule di molti coralli subiscono invece un cambiamento di preferenze nei confronti del substrato: alterando il loro comportamento larvale non sono più in grado di selezionare il luogo corretto dove insediarsi e quindi molte non riescono nemmeno a raggiungere la fase coloniale (Doropoulos et al., 2012).

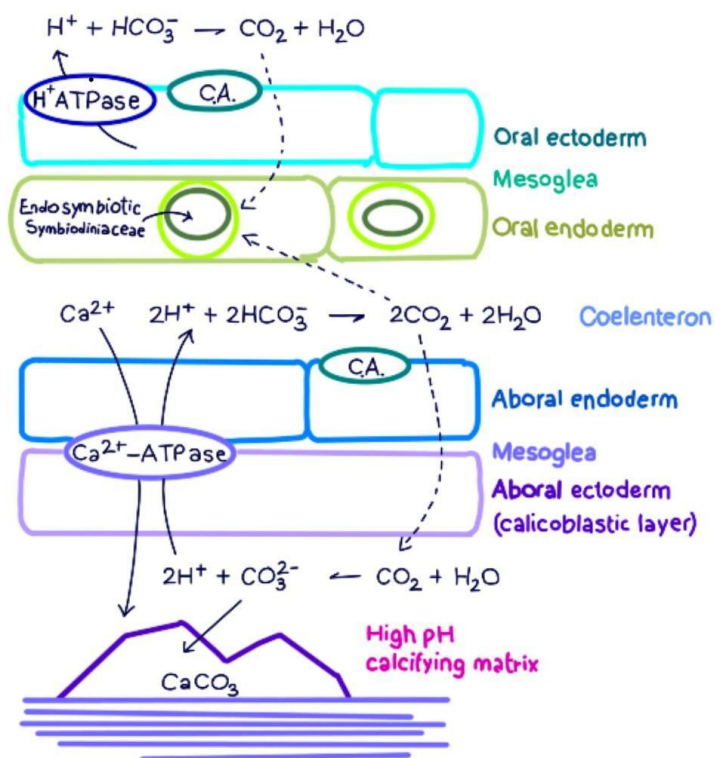


Fig.3 (modificato da Kleypas et al., 2006)

Meccanismi di trasferimento dei carbonati e del calcio nei vari strati cellulari di una colonia. All'esterno dello strato superficiale l'ambiente è reso acido dalla H^+ -ATPasi per poter convertire l'acido carbonico disciolto in CO_2 spontaneamente e farla migrare verso l'endoderma contenente le zooxantelle simbiotiche. Il calcio è attivamente pompato verso la Matrice a carattere basico tramite la Ca^{2+} -ATPasi e gli idrogenioni derivanti dalla reazione di calcificazione (che altererebbero il pH della matrice) sono spostati nel celenteron e riportati a CO_2 dalla anidraasi carbonica (C.A.).

6. Effetti combinati di pH e temperatura

Una volta distinti gli effetti dannosi di ciascun fattore climatico è possibile analizzare le conseguenze combinate di entrambi nei coralli. Essendo un approccio multi- stress, la sperimentazione consiste nel regolare ambedue i parametri in ambiente isolato e monitorare le risposte degli organismi. Un altro problema in questo tipo di analisi è la differente composizione di simbionti per ciascuna colonia, pertanto è opportuno indagare gli effetti di pH e temperatura su specie che sono in simbiosi con un solo tipo di alga, come ad esempio *Acropora silvicornis* (Langdon & Haider, 2022). In questo modo, è possibile distinguere la resistenza data solo dalle condizioni di salute del corallo, indipendentemente dal contributo fornito da diverse specie batteriche e algali (ovvero si evita che colonie della stessa specie ma con simbionti di specie diverse possano manifestare una resistenza maggiore o minore a seconda di quali specie di simbionti siano prevalenti). Per molti coralli, infatti, è comune cambiare le proprie comunità sia microbiche che algali per avere una maggiore resistenza alle ondate di calore (Karp et al., 2022; Rocha de Souza et al., 2022; Silverstein et al., 2015). È chiaro come una pre-esposizione delle colonie ad un ambiente più acido diminuisca le possibilità di sopravvivenza nel momento in cui la temperatura si alza: vi è un evidente impatto sul numero di giorni di vita per i coralli mantenuti a pH più basso, con una riduzione complessiva del tempo medio di sopravvivenza che va dal 19% al 35%. Inoltre, gli effetti di un ambiente acido sono esacerbati in maniera proporzionale alla temperatura, tanto è più alto lo stress termico, tanto più dannosi sono gli effetti dell'acidità sulla sopravvivenza delle colonie (Doropoulos et al., 2012; Langdon & Haider, 2022). L'unico fattore che può influire sulla sopravvivenza di ciascun corallo in questo tipo di esperimento è la variabilità genetica tra colonie della stessa specie, pertanto, è possibile identificare quali genotipi siano maggiormente resistenti a condizioni medie ed elevate di stress combinati.

7. Luce

Acque oligotrofiche di regioni tropicali garantiscono elevata disponibilità di luce, la risorsa determinante per regolare la quantità di fotosintesi nei simbionti dei coralli. La morfologia delle colonie e la quantità di alghe per centimetro quadrato consentono una intensità luminosa diversa a seconda degli strati cellulari, permettendo una grande varietà di nicchie ecologiche all'interno del singolo corallo. Come detto in precedenza, la selezione di simbionti in grado di acclimatarsi in luoghi ad intensità luminose differenti concede ai coralli una maggiore adattabilità alle varie nicchie ecologiche di barriera e allo stesso tempo, una stessa specie di simbionte può essere acclimatata a condizioni di intensità luminosa differenti all'interno di parti diverse di un'unica colonia corallina.

I principali sistemi di difesa contro intensità luminose potenzialmente dannose sono due: gli amminoacidi microsporinici e la densità di popolazione dei simbionti (diversi milioni per cm^2), dove le alghe di epiteli superficiali schermano quelle negli strati inferiori. Gli amminoacidi microsporinici (MAAs), in particolare, sono presenti nel genoma degli antozoi in grado di fare simbiosi a causa di diversi eventi di Horizontal Gene Transfer a partire da batteri simbionti ancora in forme ancestrali e si pensa che la via metabolica degli MAAs oggi presente sia il risultato di una co-evoluzione che ha coinvolto anche le zooxantelle simbionti nel corallo (van Oppen & Medina, 2020; Downs et al., 2013).

Quando l'intensità luminosa è eccessiva, condizioni di stress luminoso danneggiano i simbionti, tuttavia le risposte susseguenti a condizioni di forte irraggiamento sono diverse dalle risposte dovute all'innalzamento della temperatura. La luce va a danneggiare principalmente le lamelle tilacoidali dei cloroplasti dei simbionti, lasciando intatte le membrane plastidiali e mitocondriali (danneggiate invece dagli stress termici). I danni alle catene nucleotidiche sono triplicati rispetto a condizioni di luce normali, e danni alle proteine portano ad un'elevata concentrazione di ubiquitine, accompagnate da elevati livelli di antiossidanti come la

glutathione perossidasi o le Fluorescent proteins (Palmer et al., 2009), dimostrando che da uno stress luminoso deriva anche uno stress ossidativo. Anche le concentrazioni di MnSOD nei mitocondri delle zooxantelle aumentano sebbene siano decisamente inferiori rispetto a quelle derivanti da temperature elevate, suggerendo che stress luminosi colpiscano selettivamente i cloroplasti delle alghe simbiotiche, mentre le alte temperature danneggiano indistintamente ambedue gli organelli (Downs et al., 2013).

8. Disponibilità di Azoto e Fosforo

L'azoto è uno dei nutrienti più importanti che concorrono all'equilibrio della simbiosi, il suo apporto è regolato dall'ospite per bilanciare la crescita delle popolazioni di simbiotici in modo da sfruttare al meglio le condizioni ambientali correnti evitando eccessiva competizione fra le popolazioni al suo interno. L'azoto inorganico è preferibilmente acquisito dalle alghe sotto forma di ammonio (NH_4^+) rispetto al nitrato (NO_3^-) poiché probabilmente l'assimilazione di quest'ultimo devia elettroni usati di norma per la fotosintesi. Il fosforo è disponibile per la maggior parte sotto forma di fosfati (PO_4^{3-}) forniti sia da fonti naturali che antropiche (Morris et al., 2019).

L'approvvigionamento di N da parte delle colonie coralline non deriva soltanto dall'alimentazione eterotrofa di piccole prede, una consistente parte dell'azoto è probabilmente fornita al corallo da quegli organismi che fanno parte del microbiota della colonia. Come evidenziato da alcuni studi infatti, alcuni batteri diazotrofi vivono sia nel muco sia fra le cellule dei tessuti delle colonie contribuendo al necessario apporto di azoto per alcune specie come *Acropora millepora* (Lema et al., 2012).

Diversi studi dimostrano che il bilanciamento fra la disponibilità di azoto ammoniacale e di fosforo nel corretto rapporto può determinare le condizioni di salute di un corallo. Un moderato apporto di NH_4^+ e fosforo sembrano migliorare le condizioni di salute delle alghe simbiotiche e aumentare la resistenza alle alte temperature. Al contrario, elevate

concentrazioni di nitrato hanno effetti negativi sia sulla popolazione di simbionti che sulla resistenza alle alte temperature, indipendentemente dalla concentrazione di fosfato, che regola invece la densità di popolazione dei simbionti in maniera direttamente proporzionale (Morris et al., 2019). Coralli con un'alta densità di popolazione delle zooxantelle a causa di sovrabbondanza di azoto e fosforo sono solitamente sani, anche se si pensa che popolazioni di alghe con un'elevata densità possano far volgere la simbiosi verso un parassitismo, trattenendo più fotosintati per i loro rispettivi scopi metabolici (Morris et al., 2019) (**fig4**).

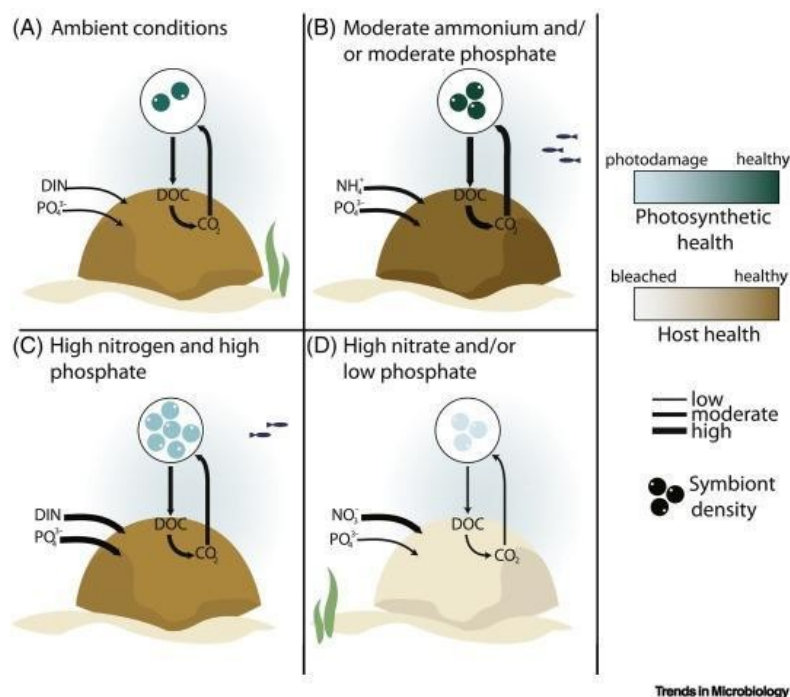


Fig.4 (da Morris et al., 2019)

Impatto della disponibilità di nutrienti inorganici sul metabolismo del carbonio che coinvolge alghe e corallo. **A)** Condizioni oligotrofiche vincolano la crescita delle alghe che sono quindi stimolate a trasferire il carbonio al corallo. I fotosintati trasferiti sotto forma di carbonio organico disciolto (DOC) facilitano il processo inverso mediato dalla respirazione (CO₂) e si pensa che questi flussi integrati stabilizzino considerevolmente la simbiosi stessa. **B)** Un aumento bilanciato sia di ammonio che di fosfati aumenta l'abbondanza delle alghe e promuove la salute e la stabilità di ambedue gli organismi. **C)** Un' eccessiva disponibilità di nutrienti

inorganici, come ad esempio DIN e fosfati, comporta un rapido aumento della popolazione algale promuovendo una eccessiva competizione, abbassando di fatto la performance fotosintetica complessiva. **D)** Un apporto eccessivo di nitrati, così come una mancanza di fosfati, può compromettere il riciclo di carbonio tra fotosintesi e respirazione, portando a sbiancamento.

Per quanto riguarda la suscettibilità ai fenomeni di bleaching, quindi, è determinante la disponibilità di un adeguato rapporto N/P; un eccesso di azoto inorganico senza un corrispettivo aumento di fosforo aumenta la suscettibilità dei coralli ad altri fattori di stress come luce e temperatura. Inoltre, temperature elevate possono stimolare direttamente la divisione cellulare (attraverso un aumento del metabolismo) e le riduzioni della densità dei simbionti algali durante lo sbiancamento possono liberare risorse, compreso l'azoto inorganico, per la crescita della popolazione rimanente (Morris et al., 2019).

9. Aumentare la resistenza e prevenire lo sbiancamento

Sebbene gli interventi diretti di tipo antropico per la salvaguardia degli ambienti corallini possano aiutare considerevolmente la resilienza degli organismi, il primo obiettivo da raggiungere per permettere la sopravvivenza a livello ecosistemico è ridurre quanto più possibile le emissioni di anidride carbonica nell'atmosfera; in caso contrario è molto probabile che nessun intervento di conservazione sarà in grado di risolvere i frequenti fenomeni di bleaching. Esistono due principali approcci per la protezione delle barriere, distintamente focalizzati su prevenire lo sbiancamento di barriere ancora sane o su risanare barriere danneggiate. La prima tecnica consiste nell'applicazione di microrganismi benefici su una colonia prima che le temperature raggiungano valori troppo alti, generando condizioni di stress (Peixoto, 2022). È necessario identificare quali batteri (o altri microrganismi) siano effettivamente benefici (BMC) prima di procedere con l'inserimento sulle colonie in vivo. A causa della

capacità dei coralli di cambiare l'abbondanza e la composizione del loro microbiota, questi microrganismi possono trovarsi già nella colonia prima dello stress, ma anche nell'ambiente circostante, poiché vengono acquisiti durante condizioni ambientali avverse. È stato visto che successivamente all'inoculazione di BMC le colonie hanno una consistente riduzione della perdita di colore, inoltre l'attività di alcuni BMC ha ruolo antivirale, suggerendo che questo metodo di prevenzione è efficace sia per stress termici che per attacchi da parte di patogeni (Rosado et al., 2019).

Il miglior metodo di risanamento per quelle barriere che sono già andate incontro a fenomeni di sbiancamento è rappresentato dal ricorso a strutture artificiali dette "coral arks" (Baer et al., 2022), delle impalcature icosaedriche costruite con PVC, fibra di vetro e acciaio inossidabile, sospese in colonna tramite delle funi collegate al fondale. Queste strutture replicano un substrato ideale sul quale può insediarsi quanta più biodiversità possibile in modo da garantire la sopravvivenza di chi si è insediato anche durante periodi in cui le temperature sono troppo alte. Infatti il maggior vantaggio di queste strutture, non a caso sono chiamate "arche", è che si possono spostare verticalmente, così come sono trainabili da un'imbarcazione: una maggiore profondità ha acque più fredde ed un inquinamento della costa può essere evitato semplicemente muovendo l'intera struttura. Per portare i coralli sulle "arche" è necessario propagarli per frammentazione o per insediamento delle larve planule, mentre per quanto riguarda quegli organismi criptici, di piccole dimensioni, che popolano la barriera, l'importazione avviene tramite costruzioni più piccole dette "coral arms", aventi delle strutture lamellari colonizzabili dagli organismi che tipicamente occupano nicchie, cunicoli, cavità scavate nella scogliera. Una volta consolidata, la comunità presente in un' "arca" ha la capacità di ripopolare una barriera danneggiata; infatti, gli organismi che costituiscono quella comunità sono nelle migliori condizioni e in grado di liberare gameti e larve che colonizzeranno successivamente le parti danneggiate dell'ecosistema (<https://coralarks.org/>; Baer et al., 2022).

10. Conclusioni

Tenendo conto di tutti i meccanismi che regolano il rapporto fra corallo e zooxantelle risulta evidente che la simbiosi è una relazione estremamente delicata, minacciata da condizioni climatiche sempre più instabili o avverse. È probabile che la maggior parte di questi ecosistemi scomparirà nei prossimi decenni se non vi saranno dei miglioramenti nelle condizioni ambientali; tuttavia, interventi antropici mirati alla conservazione potrebbero mitigare la grande perdita ecosistemica tramite soluzioni innovative sia di prevenzione che di ripopolamento. Una delle migliori strategie per poter aumentare la resilienza del meccanismo di simbiosi è capire quali processi fisiologici regolano il rapporto stesso, molecole che mediano la comunicazione (Williams et al., 2021) così come geni che assumono la funzione di biomarker (Dilworth et al., 2022).

Considerando gli aumenti previsti di temperatura media e acidificazione degli oceani, è possibile che i servizi ecosistemici forniti dalle scogliere coralline subiscano forti riduzioni, che avranno una portata maggiore in caso di mancata collaborazione fra centri di ricerca, comunità locali ed enti finanziatori. La necessità di istituire delle aree protette, di lavorare a nuove tecniche per interventi mirati ed efficaci, di collaborare con aziende ed imprese locali diventa sempre più stringente. Non si tratta solo di dar vita ad una serie di progetti che possono promuovere la salvaguardia di specifici ambienti, ma di contribuire in maniera essenziale alla sopravvivenza globale di un intero ecosistema.

11. Letteratura citata

- Albright, R., 2011. Reviewing the effects of ocean acidification on sexual reproduction and early life history stages of reef-building corals. *Journal of Marine Sciences*, 2011: 473615.
- Allemand, D., Ferrier-Pagès, C., Furla, P., Houlbrèque, F., Puverel, S., Reynaud, Tambutté, E., Tambutté, S., Zoccola, D., 2004. Biomineralisation in reef-building corals: from molecular mechanisms to environmental control." *Comptes Rendus - Palevol*, 3, 6–7: 453–467.
- Baer, J., Carilli, J., Hartmann, A., Chadwick, B., Hatay, M., van der Geer, A., Aquino, J., Ballard, A., Scholten, Y., Barnes, W., Little, M., Brzenski, J., Lius, X., Haas, A., Rohwer, F., 2022. Coral Reef Arks: A standardized in situ mesocosm and potential reef restoration tool. *ICRS 2022 Book of Abstracts, 15th International Coral Reef Symposium, Bremen, 3-8 July 2022, session 3C*: 210.
- 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: 2305-2312.
- Cleves, P. A., Krediet, C.J., Lehnert, E. M., Onishi, M., Pringle, J.R., 2020. Insights into coral bleaching under heat stress from analysis of gene expression in a sea anemone model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117, 46: 28906-28917.
- Cohen, A.L., Holcomb, M., 2009. Why corals care about ocean acidification: Uncovering the mechanism. *Oceanography*, 22, 4:118–127.
- Cornwall, C., Comeau, S., Kornder, N.A., Perry, C.T., van Hoodonk, R., DeCarlo, T.M., Pratchett, M.S., Anderson, K.D., Browne, N., Carpenter, R., Diaz-Pulido, G., D'Olivo, J.P., Doo, S.S., Figueiredo, J. Fortunato, S.A.V., Kennedy, E., Lantz, C.A., McCulloch, M.T., González-Rivero, M., Schoepf, V., Smithers, S.G., Lowe, R.J., 2021. Global declines in coral reef calcium carbonate production under ocean acidification and warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118, 21: e2015265118.
- Czienski, M. J., Schmidt-Roach, S., Aranda, M., 2019. The past, present, and future of coral heat stress studies. *Ecology and Evolution* 9,17: 10055-10066.
- Davy, S. K., Cook, C. B., 2001. The influence of "host release factor" on carbon release by zooxanthellae isolated from fed and

- starved *Aiptasia pallida* (Verrill). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, Molecular & integrative physiology*, 129, 487–494.
- Dilworth, J., Million, W., Ruggeri, M., Hall, E.R., Dungan, A., Muller, E., Kenkel, C.D., 2022. Transcriptomic signatures of physiological response to climate change stressors in a threatened coral. ICRS 2022 Book of Abstracts, 15th International Coral Reef Symposium, Bremen, 3-8 July 2022, session 10E: 716
 - Doropoulos, C., Ward, S., Diaz-Pulido, G., Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P.J., 2012. Ocean acidification reduces coral recruitment by disrupting intimate larval-algal settlement interactions. *Ecology Letters*, vol 15, 4: 338-346.
 - Downs, C. A., McDougall, K.E., Woodley, C.M., Fauth, J.E., Richmond, R.H., Kushmaro, A., 2013. Heat-stress and light-stress induce different cellular pathologies in the symbiotic dinoflagellate during coral bleaching. *PloS one*, 8, 12: e77173.
 - Hoadley, K. D., Lewis, A.M., Wham, D. C., Tye Pettay, D., Grasso, C., Smith, R., Kemp, D.W., LaJeunesse, T., Warner, M.E., 2019. Host-symbiont combinations dictate the photo-physiological response of reef-building corals to thermal stress. *Scientific Reports*, 9: 9985.
 - Jones, R., 2005. The ecotoxicological effects of Photosystem II herbicides on corals. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 5-7: 495-506.
 - Karp, R., Dennison, C., Wen, A., Cunning, R., Baker, A., 2022. Testing the relative ability of twelve Caribbean coral species to shuffle symbionts following bleaching in a controlled experiment. ICRS 2022 Book of Abstracts, 15th International Coral Reef Symposium, Bremen, 3-8 July 2022, session 10E: 723
 - Kleypas, J.A., Feely, R.A., Fabry, V.J., Langdon, C., Sabine, C.L., Robbins, L.L., 2006. Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers: A Guide for Future Research. Report of a workshop held 18–20 April 2005. NSF, NOAA, and the U.S. Geological Survey, St. Petersburg, Florida, 88 pp.
 - Langdon, C., Haider, K., 2022. Elevated CO₂ alters the heat stress response of *Acropora cervicornis*. ICRS 2022 Book of Abstracts, 15th International Coral Reef Symposium, Bremen, 3-8 July 2022, session 9E: 648.
 - Lee, S.T.M., Keshavmurthy, S., Fontana, S., Takuma, M., Chou & Chaolun, W-H., Chen, A., 2018. Transcriptomic response in *Acropora muricata* under acute temperature stress follows preconditioned seasonal temperature fluctuations. *BMC Research Notes*, 11: 119.

- Lema, K. A., Willis, B.L., Bourne, D.G., 2012. Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 9: 3136-3144.
- Mason, B., Cooke, I., Moya, A., Augustin, R., Lin, M.F., Satoh, N., Bosch, T.C.G., Bourne, D.G., Hayward, D.C., Andrade, N., Forêt, S., Ying, H., Ball, E.E., Miller, D.J., 2021. AmAMP1 from *Acropora millepora* and damicornin define a family of coral-specific antimicrobial peptides related to the Shk toxins of sea anemones. *Developmental and Comparative Immunology*, 114: 103866.
- Morris, L.A., Voolstra, C.R., Quigley, K.M., Bourne, D.G., Bay, L.K., 2019. Nutrient availability and metabolism affect the stability of coral-Symbiodiniaceae symbioses. *Trends in Microbiology* vol. 27,8: 678-689.
- Nakamura, M., Ohki, S., Suzuki, A., Sakai, K., 2011. Coral larvae under ocean acidification: survival, metabolism, and metamorphosis. *PloSone*, 6, 1: e14521.
- Palmer, C.V., Modi, C.K., Mydlarz, L.D., 2009. Coral fluorescent proteins as antioxidants. *PloSone*, 4,10: e7298.
- Peixoto, R., 2022. Coral probiotics: Premise, Promise, Updates. ICRS 2022 Book of Abstracts, 15th International Coral Reef Symposium, Bremen, 3-8 July 2022, Plenary talks:12
- Quigley, K.M., Willis, B.L., Bay, L.K., 2017. Heritability of the *Symbiodinium* community in vertically- and horizontally-transmitting broadcast spawning corals. *Scientific Reports*, 7: 8219.
- Rocha de Souza M., Bruce J., Conklin E., Cros A., Drury C., Jury C., Toonen R., 2022. Investigating the contribution of symbiont community on coral holobiont performance under long-term experimental warming and acidification. ICRS 2022 Book of Abstracts, 15th International Coral Reef Symposium, Bremen, 3-8 July 2022, session 10E: 729
- Rodriguez-Lanetty, M., Wood-Charlson, E., Hollingsworth, L.L., Krupp, D.A., Weis, V.M., 2006. Temporal and spatial infection dynamics indicate recognition events in the early hours of a dinoflagellate/coral symbiosis. *Marine Biology*, 149: 713–719.
- Rosado, P. M., Leite, D., Duarte, G., Chaloub, R. M., Jospin, G., Nunes da Rocha, U., P Saraiva, J., Dini-Andreote, F., Eisen, J. A., Bourne, D. G., Peixoto, R. S., 2019. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. *The ISME journal*, 13, 4: 921–936.
- Rosic, N. N., Pernice, M., Dove, S., Dunn, S., Hoegh-Guldberg, O., 2011. Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 and Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in response to

thermal stress: possible implications for coral bleaching. *Cell stress & chaperones*, 16, 1: 69–80.

- Rosset, S. L., Oakley, C. A., Ferrier-Pagès, C., Suggett, D. J., Weis, V. M., Davy, S. K., 2021. The molecular language of the cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Trends in Microbiology*, 29, 4: 320–333.
- Rådecker, 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: 214.
- Seveso, D., Arrigoni, R., Montano, S., Maggioni, D., Orlandi, I., Berumen, M.L., Galli, P., Vai, M., 2020. Investigating the heat shock protein response involved in coral bleaching across scleractinian species in the central Red Sea. *Coral Reefs* 39: 85–98.
- Shinzato, C., Shoguchi, E., Kawashima, T., Hamada, M., Hisata, K., Tanaka, M., Fujie, M., Fujiwara, M., Koyanagi, R., Ikuta, T., Fujiyama, A., Miller, D. J., Satoh, N., 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature*, 476: 320–323.
- Shore, A., Day, R. D., Stewart, J. A., & Burge, C. A., 2021. Dichotomy between regulation of coral bacterial communities and calcification physiology under ocean acidification conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 87, 6: e02189-20.
- Silverstein, R. N., Cuning, R., Baker, A. C., 2015. Change in algal symbiont communities after bleaching, not prior heat exposure, increases heat tolerance of reef corals. *Global Change Biology*, 21, 1: 236–249.
- Tanaka, Y., Suzuki, A. Sakai, K., 2018. The stoichiometry of coral-dinoflagellate symbiosis: carbon and nitrogen cycles are balanced in the recycling and double translocation system. *The ISME Journal*, 12: 860–868.
- Tang, C. H., Shi, S. H., Li, H. H., Lin, C. Y., Wang, W. H., 2022. Lipid profiling of coral symbiosomes in response to copper-induced carbon limitation: A metabolic effect of algal symbionts on the host immune status. *Chemosphere*, 293: 133673.
- Traylor-Knowles N., Connelly M.T., 2017. What is currently known about the effects of climate change on the coral immune response. *Current Climate Change Reports*, 3: 252–260.
- van Oppen, M., Medina, M., 2020. Coral evolutionary responses to microbial symbioses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 375: 20190591.
- Williams, A., Chiles, E. N., Conetta, D., Pathmanathan, J. S., Cleves, P. A., Putnam, H. M., Su, X., & Bhattacharya, D., 2021.

Metabolomic shifts associated with heat stress in coral holobionts.
Science Advances, 7, 1: eabd4210.

12. Sitografia

- https://coralarks.org/docs/abassi_liu.pdf (2022)
- https://coralarks.org/docs/coral_arks_white_paper.pdf (2022)
- https://coralarks.org/docs/Permit_Curacao.pdf (2022)