



**UvA-DARE (Digital Academic Repository)**

**Corals through the light : phylogenetics, functional diversity and adaptive strategies of coral-symbiont associations over a large depth range**

Rodrigues Frade, P.

[Link to publication](#)

*Citation for published version (APA):*

Rodrigues Frade, P. (2009). Corals through the light : phylogenetics, functional diversity and adaptive strategies of coral-symbiont associations over a large depth range.

**General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

**Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## SAMENVATTING

Koraalriffen behoren tot de meest biodiverse ecosystemen ter wereld en zijn van groot economisch belang voor de lokale bevolking van tropische kustgebieden. De sleutel tot succes van een dusdanig rijk ecosysteem in een zeer voedselarme omgeving als de tropische zeeën legt tevens het delicate evenwicht van het koraalrif bloot: een zeer stressgevoelige symbiose tussen een rifbouwende, dierlijke gastheer (een steenkoraal) en een fotosynthetiserende dinoflagellaat van het genus *Symbiodinium*. Samen vormen ze een zogenaamde holobiont, waarbij de ecologische en evolutionaire veerkracht afhangt van de gezamenlijke fysiologie van de symbiotische partners. Licht is de belangrijkste energiebron voor het koraalrif, waarvan de intensiteit snel afneemt op grotere diepten langs de rifhelling.

Het hoofddoel van dit proefschrift is te begrijpen hoe koraal-holobionten gedijen langs de enorme lichtgradiënten die voorkomen op rifhellingen. De endosymbiont speelt een cruciale rol in het leveren van nutriënten voor het onderhoud en de skeletopbouw van haar gastheer. Hierdoor wordt aangenomen dat de belangrijkste eigenschap van de holobiont in reactie op licht de aanwezigheid is van taxonomisch en functioneel verschillende typen symbionten die meer of minder specifieke associaties aangaan met de vele koraalsoorten van het rif. Dit proefschrift richt zich op de fylogenetische en functionele diversiteit van koraal-symbiont associaties en hun aanpassingsstrategieën voor het overleven in grote lichtgradiënten.

Het koraalgenus *Madracis* Milne Edwards en Haime 1849 en zijn symbiont populaties is in deze studie gebruikt als biologisch model, aangezien het genus een verspreiding vertoont over een enorme diepte, van 2 tot meer dan 100 meter. Alle experimentele data zijn verzameld op het onderzoeksinstituut CARMABI, bij rifstation Buoy One, op Curaçao, Nederlandse Antillen.

### **Wat is de genetische variatie binnen *Symbiodinium* in het koraalgenus *Madracis* langs grote diepte-gradiënten, en is er een relatie tussen de samenstelling van *Symbiodinium* genotypen en de verspreiding over verschillende diepten van de gastheer?**

De functionele diversiteit van koraal-alg associaties over grote verticale verspreidingsgradiënten is onderbelicht binnen de wetenschap. Dit komt vooral door de geringe beschikbare gegevens over de genetische variatie binnen *Symbiodinium* beneden de 10 tot 15 meter waterdiepte. In **Hoofdstuk 2** behandel ik de genetische variatie van *Symbiodinium* in de, tot nog toe, 6 verschillende bekende Caribische zogenaamde “morfotypen” van het koraalgenus *Madracis*. Hierbij bestudeerde ik een diepte-gradiënt van 5 tot 60 meter en keek ik naar de genetische variatie van de symbiont op 2 verschillende posities op het oppervlak van de gastheerkolonie. Drie *Symbiodinium* genotypen zijn geïdentificeerd door gebruik te maken van gekoppelde ITS2 rDNA “polymerase chain reaction” en “denaturing gradient gel electrophoresis” (PCR-DGGE). ITS2 type B7 werd gevonden in alle 6 morfotypen van *Madracis* en op alle diepten en is geclassificeerd als de generalist onder de symbionten binnen het genus. Type B13 werd alleen gevonden op een aantal kolonies van *M. mirabilis*, die alleen voorkomt in ondiep water. Type B15 werd juist alleen gevonden op grotere diepten en verving daar geleidelijk type B7 in *M. pharensis*, die op alle diepten voorkomt. Er was geen verschil in symbiontasamenstelling binnen kolonies. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de samenstelling van symbionten binnen *Madracis* gastheerspecifiek is en gerelateerd is aan diepte. De resultaten in dit hoofdstuk worden bediscussieerd in relatie tot een aantal fysische parameters die zijn gemeten, zoals

lichtintensiteit, het onderwater lichtspectrum en de watertemperatuur. De resultaten laten zien dat het zeer waarschijnlijk is dat de ecologische niches van de symbionten gescheiden zijn. Dit komt overeen met resultaten uit andere, recente studies. Tevens wordt de toepasbaarheid van de rDNA ITS regio voor ecologische en evolutionaire studies naar koraalsymbionten bevestigd.

### **Wat is de fysiologische plasticiteit van de symbiotische associaties binnen *Madracis* langs de rifhelling, en wat is daarbij de rol van de gastheer respectievelijk de symbiont?**

In **Hoofdstuk 3** bestudeer ik de *in situ* geïntegreerde fotobiologie van symbiotische associaties van *Madracis* langs grote dieptegradiënten. Ik maak hierbij gebruik van een innovatieve holistische multivariate benadering. In 4 *Madracis* morfotypen (*M. mirabilis*, *M. pharensis*, *M. senaria*, *M. formosa*) en hun 3 symbiontgenotypen (B7, B13 en B15) werden, langs een grote dieptegradiënt van 5 tot 40 meter, verschillende parameters gemeten, zoals fotosyntheseactiviteit (met behulp van chlorofyl *a* fluorescentie technieken), pigmentcompositie (door middel van “high-performance liquid chromatographie”, HPLC), symbiontdichtheid (flowcytometrie) en celgrootte (microscopie). Resultaten onderschrijven de belangrijke rol van lichtintensiteit op de fysiologie van koralen. Fotobiologische mechanismen zijn ofwel gereguleerd door de omgeving of door genetische factoren. Voorbeelden daarvan zijn fotochemische efficiëntie en de celgrootte van symbionten. De verschillende holobiontstrategieën, mogelijk in relatie tot de celdichtheid van symbionten in het gastheerweefsel, variëren in de optimalisatie van lichttoegst (pigmenten die licht opnemen) of van fotobeschermende mechanismen (zogenaamde “nonphotochemical quenching”). Deze strategieën zijn gerelateerd aan de verticale verspreiding van de gastheersoort en de dominantie van die soort op de rifhelling. Over het algemeen lijkt de functionele diversiteit van de symbionten de verspreiding van de gastheer niet te verklaren. Daarentegen laat deze studie zien dat de gastheer eigenschappen bezit waarmee hij de interne omgeving, waarin de endosymbiont voorkomt, kan aanpassen en de fotobiologie van de holobiont kan controleren.

### **Wat is de functionele variatie tussen de genotypen van symbionten in *Madracis pharensis*, en is er een functie voor kleurrijke niches in de regulatie van de verspreiding van symbionten?**

In het kader van de hierboven genoemde gastheereigenschappen en vanwege het feit dat de vorige studie onvolledig bewijs leverde voor de functionele verschillen tussen de ITS2 symbionttypen, zal ik in **Hoofdstuk 4** de verspreiding van symbionten en de rol van de variatie in fotobiologie door symbionten bestuderen in 1 gastheersoort: *M. pharensis*. Deze soort komt voor in de 3 kleurtypen bruin, groen en paars. De kleur van een gastheerweefsel is gerelateerd aan de aanwezigheid van fluorescerende eiwitten. Deze kunnen het licht, voordat het bij de endosymbiont terechtkomt, versterken of dempen. In deze studie werd de verspreiding van *Symbiodinium* ITS2 in *M. pharensis* bestudeerd voor elk kleurtype op 10 en 25 meter waterdiepte, onder 2 verschillende lichtcondities (onbeschut en beschut). De verspreiding was zowel afhankelijk van diepte als van kleur. Op het diepe rif (25 meter) waren groene en paarse kolonies dominant met symbiont ITS2 type B15. In de ondiepe zone werden voornamelijk bruine kolonies met symbiont type B7 gevonden. Lichtcondities op beide diepten hadden geen effect op de aanwezigheid van bepaalde symbionttypen. Deze ecologische verspreiding duidt

erop dat de aanwezigheid van bepaalde typen symbionten in ieder geval gedeeltelijk wordt gereguleerd door kleurniches. De meeste functionele variatie (een aantal parameters alleen gemeten op 25 m diepte) was gebaseerd op twee fotobiologische componenten die relateren aan ofwel het genotype van symbionten, of licht microhabitat, wat respectievelijk adaptatie en acclimatisatie reflecteert. In vergelijking tot ITS2 type B7, kwam type B15 in de gastheer voor met significant lagere celdichtheden, grotere cellen, hogere pigmentconcentraties, hogere ratio peridinine/chlorofyl *a* en een kleinere hoeveelheid van het fotobeschermende xanthofyl. Type B15 is dus in potentie beter aangepast aan een diepere habitat met een lagere lichtintensiteit dan type B7. Deze suggestie komt overeen met de verspreiding van de symbionten over de dieptegradiënt. Celgrootte van symbionten kan een belangrijke rol spelen in de aanpassing van koraalholobionten in de diepere regionen van het rif. De duidelijke verschillen tussen verscheidene functionele parameters van symbionten *in situ*, duiden op een verschillende ecologische afkomst die gebaseerd is op lichtadaptatie. Daarnaast wordt de bruikbaarheid van de ITS2 marker voor *Symbiodinium* voor ecologische studies bevestigd.

**Komen betainen veel voor in rifbouwende koralen, en zo ja, correleren zij met lichtgradiënten langs de rifthelling, wat een rol suggereert in de verdediging tegen oxidatieve stress?**

Snelle klimaatverandering is desastreus voor het koraalrif, met name door de verhoogde temperatuur van het zeewater. In combinatie met een hoge lichtintensiteit resulteert dit vaak in fysiologische stressreacties, leidend tot het zogenaamde koraal “bleaching” en koraalsterfte. Bleaching van koralen komt door verlies of afname van de symbiontpopulaties of hun fotosynthetische pigmenten. Dit proces is vaak gerelateerd aan de productie van reactieve zuurstofvormen die schadelijk zijn voor eiwitten en membraanfuncties van zowel de fotosymbiont als de gastheer. Weerstand van algsymbionten tegen omgevingsstress is vaak gerelateerd aan diverse fotobeschermende mechanismen, zoals pigmenten die zijn betrokken bij het uitdrijven van overdadige excitatieenergie in PSII. Echter, in vasculaire planten en vrijlevende algen komen betainen voor die bekend staan als metabolieten die een beschermende werking hebben in PSII. Deze metabolieten zijn betrokken geweest in succesvolle genetische technologiestudies naar de vermindering van temperatuurs- en stralingsgerelateerde cellulaire stress. In **Hoofdsuk 5** is de aanwezigheid en hoeveelheid van verscheidene betainen gescreend van 10 rifbouwende koraalsoorten, inclusief *Madracis*, over een dieptegradiënt van 5 tot 10 meter, door middel van “liquid chromatography – mass spectrometry” (LC-MS). In alle koraalsoorten zijn glycine betaine, proline betaine en zeker 5 andere soorten betainen gevonden in fysiologisch significante hoeveelheden. Daarnaast varieerden de concentraties betaine in relatie tot de waterdiepte, waarmee hun rol wordt bevestigd als moleculen die de fotosynthese beschermen tegen negatieve effecten van hoge straling. Alhoewel dit patroon niet gerelateerd was aan symbionttype, laat deze studie wel zien dat betainen in koraalholobionten fenotypisch zeer plastisch zijn en deelnemen in het proces van acclimatisatie. De studie suggereert dat betainen een beschermende rol zouden kunnen hebben tegen “bleaching” van rifbouwende koralen en opent deuren voor nieuw onderzoek.

**Komen morfologie en moleculaire fylogenie overeen in het koraal genus *Madracis* en is er bewijs voor de rol van hybridisatie in de evolutie van zogenaamde “brooding”**

## **koralen?**

Om de ecologie van koraal-symbiont associaties volledig te begrijpen is het van groot belang om de aard van de evolutionaire eenheden te begrijpen die daarbij betrokken zijn. Vele studies hebben aangetoond dat de classificatie van koraalsoorten aan de hand van morfologie vaak niet overeenkomt met de moleculaire fylogenie. Steenkoralen zijn geassocieerd met lage reproductieve barrières en met inter-specifieke hybridisaties die morfologie en DNA fylogenie ontkoppelen. Alhoewel bekend is dat het plaatsvinden van mass spawning de kans op hybridisatie maximaliseert, lijkt introgressieve hybridisatie ook voor te komen in “brooding” koralen. In **Hoofdstuk 6** zal ik de grenzen van *Madracis* soorten en de rol van hybridisatie in “brooding” koralen onderzoeken. Fylogenetische en populatiestructuur analyses werden toegepast op sequentie data die verkregen waren van 3 DNA intron markers voor de 6 *Madracis* soorten. Nucleaire DNA polyfyliëën tussen taxa werden herhaaldelijk vastgesteld, met als uitzondering *M. senaria*, de enige monofyletische soort binnen het genus. Sterker nog, *M. senaria* is de enige *Madracis* soort die planulae loslaat volgens een lunair patroon gedurende een generieke seizoenscyclus. *Madracis pharensis* laat divergentie zien in relatie tot diepte, waardoor het aannemelijk is dat er een sterke populatiestructuur bestaat op basis van aan diepte gerelateerde omgevingsfactoren. Deze scheiding komt overeen met het patroon van de verticale verdeling van symbionten (ITS2 type B7 in ondiepe kolonies en type B15 in de dieper gelegen kolonies). Uit de resultaten blijkt dat de meeste *Madracis* taxa polyfyletisch zijn en een hoge mate van gedeeld polymorfisme hebben. Samen met bewijs van relatief oude fossiele vondsten, duidt dit erop dat introgressieve hybridisatie waarschijnlijk een grote rol heeft gespeeld in de evolutie van *Madracis*. Morfotypen van *Madracis* blijven herkenbaar doordat hybridisatie niet sterk genoeg is, of omdat disruptieve selectie overheerst over het homogeniserende effect van genen flow. Divergentie met betrekking tot een dieptegradiënt in *M. pharensis* suggereert dat de functionele verschillen van symbionttypen een rol kunnen spelen in de op diepte gebaseerde disruptieve selectie van de koraalgastheer. Dit kan gedeeltelijk de patronen verklaren van holobiont niche diversificatie op rihellingen.

De belangrijkste conclusies van dit proefschrift zijn:

1. Het genus *Madracis* is een uitstekend model om de functionele diversiteit en fotoecologie van koraal-symbiont associaties en hun aanpassing aan grote diepte-gradiënten te bestuderen.
2. *Symbiodinium* ITS2 typen hebben een eigen ecologische en evolutionaire afkomst, zijn gastheer-specifiek, en hebben een verschillend verspreidingspatroon langs een dieptegradiënt.
3. Constantheid in symbiontpopulaties langs lichtgradiënten binnen een enkele kolonie suggereren dat er, naast licht, andere factoren een controlerende rol spelen in de variatie van symbionttypen.
4. De aanpassingsstrategieën van holobionten met betrekking tot licht worden niet per definitie verklaard door de diversiteit van de symbionten, maar eerder door een combinatie van fysiologische eigenschappen van gastheer en symbiont die, samen, het opnemen van licht optimaliseren in een beschutte habitat, of een fotobescherming leveren in een onbeschutte habitat.
5. Gastheer-specifieke morfologische en fysiologische eigenschappen kunnen een belangrijke rol spelen in de controle van het verticale verspreidingspatroon van holobionten.

6. *Symbiodinium* ITS2 typen verschillen in hun *in situ* fysiologische activiteit en aanpassingsvermogen voor bepaalde lichtregimes. Hieruit blijkt de belangrijke rol van symbiont niche diversificatie en de rol van diversiteit van symbionten in de aanpassing van koralen op hun omgeving.
7. Koraalgastheren associëren met verschillende assemblages van symbionten, waardoor ze in verscheidene ecologische niches kunnen voorkomen.
8. De potentie van een enkel symbionttype voor fotosynthetische acclimatisatie is groot, maar andere parameters, zoals celgrootte, zijn genetisch zeer beperkt en waarschijnlijk het resultaat van aanpassing.
9. De ecologische verspreiding van symbionttypen langs een dieptegradiënt en van kleurtypen suggereren dat spectrale licht niches een rol kunnen spelen in symbiont fotobiologie en aanpassing.
10. Rifbouwende koralen bevatten vele verschillende betaïnen die fenotypisch plastisch zijn en kunnen beschermen tegen “bleaching”-gerelateerde omgevingsstress.
11. Introgressieve hybridisatie heeft waarschijnlijk een belangrijke rol gespeeld in de evolutie van “brooding” koralen, zoals de zogenaamde “broadcast spawners”.
12. De functionele verschillen binnen symbionttypen kunnen een rol spelen in de diepte-gerelateerde disruptieve selectie van hun koraalgastheer. Hiermee leveren zij een bijdrage aan genetische divergentie en diversificatie van niches van rifbouwende koralen.
13. Dieper gelegen riffen bevatten cruciale informatie over diversiteit en functioneren van koraal-symbiont associaties en kunnen een sleutelrol spelen in het begrijpen van hoe een koraalrif reageert op klimaatverandering.