

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



---

**Maestría en Ciencias en Ciencias de la Vida  
con orientación en Biotecnología Marina**

---

**Expresión diferencial de genes de las proteínas fluorescentes y  
su asociación con indicadores fisiológicos de estrés en  
*Pocillopora verrucosa* en dos comunidades coralinas.**

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

Presenta:

**Erick Delgadillo Nuño**

Ensenada, Baja California, México  
2018

Tesis defendida por

**Erick Delgadillo Nuño**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
CoDirectora de Tesis

---

**Dr. Marco Agustín Liñán Cabello**  
CoDirector de Tesis

**Dr. Edgar Alfonso Lopez Landavery**

**Dr. Luis Eduardo Calderon Aguilera**

**Dr. Horacio Jesús De La Cueva Salcedo.**



---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
Coordinador del Posgrado de Ciencias de la Vida

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Erick Delgadillo Nuño © 2018*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Erick Delgadillo Nuño** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la vida con orientación en Biotecnología Marina.

**Expresión diferencial de genes de las proteínas fluorescentes y su asociación con indicadores fisiológicos de estrés en *Pocillopora verrucosa* en dos comunidades coralinas.**

**Resumen aprobado por:**

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
CoDirectora de Tesis

---

**Dr. Marco Agustín Liñán Cabello**  
CoDirector de Tesis

El deterioro de los arrecifes de coral es un problema global de suma importancia. La mayoría de los arrecifes en el mundo presentan pérdidas en la cobertura coralina y los eventos de blanqueamiento son cada vez más frecuentes, debido a la constante presión ambiental y al cambio climático. A pesar de esto, la regulación de estos ecosistemas es deficiente. Se necesita una mayor comprensión fisiológica y ecológica de la simbiosis coral-algal para la protección y conservación de los arrecifes de coral. En el presente estudio, se pretende evaluar la respuesta fisiológica y transcriptómica del coral *Pocillopora verrucosa* de morfologías verde y café. Para esto, se reubicaron dos colonias coralinas bajo diferentes profundidades en su ambiente original y en un arrecife severamente impactado. Posteriormente, se tomaron muestras durante un periodo de 24 horas (T1-cenit; 2:00 pm, T2-ocaso; 8:00 pm, T3 medianoche; 12:00 am; T4-amanecer; 8:00 am) entre los días 17, 18 y 19 de mayo de 2017. De esta manera, se tomaron 34 muestras de para análisis de RNA y 34 para análisis fisiológicos. Los resultados de los análisis fisiológicos indican que los holobiontes de ambas morfologías presentaron el mismo nivel de respuestas antioxidante y de salud durante las 24 horas posteriores a su reubicación. Aunque no hubo resultados significativos, los patrones parecen indicar que hay diferencia en la respuesta fisiológica entre las morfologías verde y café en los corales reubicados en la Boquita. En lo que respecta a la colonia verde, esta presentó un mayor promedio en la concentración de FPs ( $p=0.04$ ). Además, los niveles de expresión de los genes que codifican esta proteína se expresaron significativamente más en el coral verde, independientemente de la localidad. Exceptuando las FP, cuando ambas morfologías se encuentran en Carrizales, presentan un perfil de expresión similar. Sin embargo, los corales reubicados en La Boquita reportaron un perfil totalmente opuesto entre sí. Ambos corales tuvieron un descenso en la expresión del gen *psbA* del fotosistema II, pero solo el coral café presentó un incremento significativo en la expresión de los genes con función antioxidante (*PXDNL*, *CAT*, *GSTT2B2*, *GPT1*, *GSS*, *GPX5* y *GST*) y de digestión (*Capn9*). Mientras que el fenotipo verde sólo presentó incrementos *Capn9* y *CAT*. Los datos nos indican que ambos corales reubicados en La Boquita presentaron estrés oxidativo. Sin embargo, la morfología café es la más afectada tras la reubicación en el ambiente marginal y esto coincide con el bajo nivel de expresión y concentración de FPs. Lo que sugiere una diferencia en la capacidad de aclimatación debido quizás el efecto antioxidante de las FPs.

**Palabras clave: GFP, esteres oxidativo, expresión génica, *P.verrucosa***

Abstract of the thesis presented by **Erick Delgadillo Nuño** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in life science with orientation in marine biotechnology.

**Differential gene expression of fluorescent proteins and their association with physiological stress indicators in *Pocillopora verrucosa* from two coral communities.**

Abstract approved by

---

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
CoDirectora de Tesis

---

**Dr. Marco Agustín Liñán Cabello**  
CoDirector de Tesis

The deterioration of coral reefs is a global problem of the utmost importance. Most of the reefs in the world present losses in coral reef coverage and bleaching events are becoming more frequent, due to constant environmental pressure and climate change. Despite this, the regulation of these ecosystems is deficient, and a greater physiological and ecological understanding of coral-algal symbiosis is needed for the protection and conservation of coral reefs. In the present study, we intend to evaluate the physiological and transcriptomic response of the *Pocillopora verrucosa* coral of green and brown morphologies. For this, two coral colonies were relocated under different depths in their original environment and in a severely impacted reef. Subsequently, samples were taken during a period of 24 hours (T1-zenith, 2:00 pm, T2-sunset, 8:00 p.m., T3 midnight, 12:00 a.m., T4-dawn, 8:00 a.m.) between May 17-19, 2017. Thirty-four samples were taken for RNA analysis and 34 for physiological analysis. The results of the physiological analysis indicate that the holobionts of both morphologies presented the same level of antioxidant and health responses during the 24 hours after their relocation. Although there were no significant results, the patterns seem to indicate that there is a difference in the physiological response between the green and brown morphologies in the corals relocated in La Boquita. However, the green colony showed a higher average concentration of FPs ( $p = 0.04$ ). In addition, the expression levels of the genes encoding this protein were expressed significantly more in the green coral, regardless of location. Except for FP, when both morphologies were found in Carrizales, they presented a similar expression profile. However, the corals relocated to La Boquita reported a completely opposite profile. Both corals had a decrease in *psbA* gene expression of photosystem II, but only the brown coral showed a significant increase in the expression of genes with antioxidant function (*PXDNL*, *CAT*, *GSTT2B2*, *GPT1*, *GSS*, *GPX5* and *GST*) and digestion (*Capn9*), while the green phenotype only showed increases in *Capn9* and *CAT*. These characteristics indicate that both corals relocated in La Boquita presented oxidative stress. However, the brown morphology is the most affected after relocation in the marginal environment and this coincides with the low level of expression and concentration of FPs.

**Key Words: GFP, oxidative stress, gene expression, *P.verrucosa***

## Dedicatorias

A mi padre, Manuel Delgadillo†. Quien me enseñó que lo más importante en la vida es buscar la verdadera felicidad (Junto al Mar) y a la vez, que el que no vive para servir, no sirve para vivir.

A mi suegro y amigo, Andoni Justel†. Un magnífico ser humano, ejemplo de entrega, dedicación y amor, al igual que mi padre.

## Agradecimientos

Agradezco a CONACYT por la Beca. Sigamos presionando al gobierno para obtener más recursos, más becas y más ciencia. Nos conviene a todos los mexicanos.

Agradezco a CICESE por abrirme sus puertas y dejarme ser parte de esta magnífica institución. Gracias por compartir conmigo sus maestros, sus clases, sus laboratorios su prestigio y por el trato tan amable y humano de todo el personal que conforma este gran equipo.

Gracias especialmente a la Dra. Clara E. Galindo. Gracias Clarisa por el apoyo que he brindaste desde el inicio. Por tu falta de prejuicios, tu asesoría liberal que ínsita al crecimiento, tu comprensión y tu confianza en mí en una de las etapas más duras y gratificante de mi vida. El desarrollo de este trabajo no hubiera sido posible sin la oportunidad que me diste.

Gracias a FACIMAR de U de C, gracias por la cooperación en este trabajo, por sus laboratorios, instalaciones, profesores y colegas. Y gracias principalmente por mi formación como Oceanólogo y por dejarme sus puertas abiertas.

Gracias al Dr. Marco A. Liñán, por ser mi más grande mentor en las ciencias marinas. Tuya eres el culpable de mi fascinación por los Corales y de mi amor por el Buceo. Gracias por aconsejarme durante mi licenciatura y seguir haciéndolo. Y gracias por todo el apoyo que me has brindado durante estos años.

A Maider, mi pareja de vida. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, gracias por expandir mis límites y soportar mis defectos. Gracias por darme todo el amor y el cariño que me das y por llenar mi vida de energía. Te amo.

Better days are coming you see, Visions of you and me.  
Elevate your soul...  
Fly, come with me 🎵🎵

N.O.W.

Gracias a Manuel A. Delgadillo, mi hermano colega, por su ayuda en el laboratorio y con mis pequeños tropiezos. Gracias también por estar conmigo en la última etapa de mi maestría.

Gracias al a mi madre Leticia Nuño, por su apoyo incondicional, su ayuda, su comida y su amor. Te debo más que la vida Madre Hermosa.

Gracias Adán Hernández por ayudarme con el acondicionamiento del experimento *invito* que fallo, pero estuvo genial. Por ayudarme a tomar las muestras en las campañas de buceos y acompañarme durante todo un mes. Gracias carnalito, se te aprecia machín. Sin ti no hubiera podido con el muestreo.

Gracias a Maribel Barajas, mi vieja amiga y colega, por alojarme en su casa a durante el mes que duro mi estancia. Gracias por el cuarto, por el café cuántico, la hamaca y los sustos.

Gracias al Dr. Eugenio Carpizo por sus asesorías sobre ecología molecular en corales y por odiar conmigo la burocracia, pero ayudarme con ella.

Gracias al Dr. Luis Calderón por todos los aportes que me brindo y por colaborar con nosotros en este proyecto.

Gracias al Dr. Horacio De la Cueva, por enseñarme más estadística, por sus observaciones tan provechosas, por el café y las pequeñas charlas.

Gracias al Dr. Edgar Landavery por su ayuda en el laboratorio y fuera de el mismo. Gracias Edgar por tus recomendaciones tan acertadas.

Gracias al Dr. Oscar por la bioinformática y el buen rollo. Gracias por enseñarme tus trucos y conocimientos *in silicos* y por interesarte tanto en mi trabajo. Te sigo debiendo una.

Gracias al M. en C. Ricardo por la bioinformática, gracias por apoyarme y por las pláticas trascendentales.

Agradezco a Edna por mantener nuestro laboratorio en regla y hacernos tan eficientes a todos bajo su coordinación. Aunque parece que regañas nos enseñas muchísimo, Gracias.

Agradezco a la Dra. Fabiola por apoyarnos con la logística de la secuenciación.

Gracias a Mateo por ayudarme en las trabas bioinformáticas y por ayudarme en el laboratorio aquella vez. Gracias por hacer segunda en las tablas y por la gravedad del asunto con el amigo Jack.

Gracias a Jordi por aparecer de la nada con su buena vibra, contarme sus malos momentos, por compartir un poco de su vida y por ayudarme en el laboratorio aquella vez, con Mateo.

Gracias a Blanca por su interés en los corales y por continuar con los resultados que no puedo seguir analizando. Gracias por ayudarnos en la creación de conocimiento de los arrecifes coralinos.

Gracias a la Dra. Rufina.

Gracias a la Dra. Rosa por sus clases de Biología celular y de estadística frecuentista, me ayudaron mucho a reformar mis conocimientos, además de las risas que me causaron.

Gracias a la Dra. Asunción traernos el curso de bioinformática del 2017 y por sus clases de introducción a la bioinformática.

A Syd Barrett†, Roger Waters, David Gilmour, Nick Manson y Richard Wright† “Pink Floyd” por *Meddle* y todos sus discos llenos de melodías exquisitas que alimentan la mente a través de generaciones.

A Friedlieb Ferdinand Runge por descubrir la Cafeína. Preciado alcaloide del grupo de las xantinas. Sólido, cristalino, blanco y de sabor amargo, que actúa como una droga psicoactiva levemente disociativa. Factor clave en el desarrollo de este trabajo.

Sé muy bien que hay que abrir los ojos,  
Siempre atento para no tropezar.  
Paz y amor para liberar de la injusticia.  
Dar de ti siempre lo mejor...♪♪  
Porter



## Tabla de contenido

---

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias. ....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras. ....	x
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
<b>1.1. Antecedentes</b> .....	1
1.1.1. Biología de los corales.....	1
1.1.2. Estado actual de los arrecifes.....	5
1.1.3. Comunidades coralinas del Pacífico central mexicano .....	8
.....	10
1.1.4. Respuesta ante el estrés termo-oxidativo y foto-oxidativo.....	10
<b>1.2. Justificación</b> .....	19
<b>1.3. Hipótesis</b> .....	20
<b>1.4. Objetivo general</b> .....	21
1.4.1. Objetivos particulares .....	21
Capítulo 2. Metodología.....	22
<b>2.1. Sitio de estudio</b> .....	22
<b>2.2. Toma de Muestras</b> .....	23
<b>2.3. Análisis Fisiológicos Moleculares</b> .....	24
2.3.1. Extracción y separación de los tejidos del holobionte.....	24
2.3.2. Peso seco del tejido.....	25
2.3.3. Cuantificación de proteína total.....	25
2.3.4. Chl <i>a</i> .....	25
2.3.5. Densidad de células del endosimbionte .....	26
2.3.6. Aminoácidos tipo Micosporina (MAAs).....	26
2.3.7. Proteínas Fluorescentes (FPs) .....	27
<b>2.4. Indicadores de estrés oxidativo</b> .....	27

2.4.1. Daño celular MDA (TBARS).....	27
2.4.2. Capacidad Antioxidante total (Aox) .....	28
<b>2.5. Análisis Genómicos</b> .....	28
2.5.1. Extracción de RNA .....	28
2.5.2. Análisis RNA Seq.....	29
Capítulo 3. Resultados.....	32
<b>3.1. Indicadores fisiológicos</b> .....	32
3.1.1. Chl <i>a</i> .....	32
3.1.2. Densidad de endosimbionte .....	33
3.1.4. Aminoácidos tipo Micosporina (MAAs).....	36
3.2.1. Capacidad antioxidante total en endosimbionte.....	38
3.2.2. Lipoperoxidación (MDA) en el Endosimbionte .....	39
3.2.3. Capacidad Antioxidante Total del Cnidario.....	40
3.2.4. Lipoperoxidación (MDA) en Cnidario .....	42
<b>3.3. Correlaciones</b> .....	43
<b>3.4. Indicadores Genómicos</b> .....	46
3.4.1 Ensamble de Novo.....	46
3.4.2 Expresión diferencial.....	47
Capítulo 4. Discusión .....	51
Capítulo 5. Conclusiones .....	57
Capítulo 6. Recomendaciones.....	58
Literatura citada.....	59
Anexos.....	68

## Lista de figuras

- Figura 1 Diagrama esquemático de los principales elementos anatómicos de un pólipos y características básicas del esqueleto calcáreo de los corales escleractinios. Ilustrado por Geoff Kelley. Corals of the world. Veron. Vol I. 2000, traducido por E. Delgadillo-Nuño. Fotografía de un pólipos por U.S. Department of Commerce National Oceanic and Atmospheric Administration Ocean and Atmospheric Research..... 15
- Figura 2. Distribución de los arrecifes coralinos en México. 1) Golfo de California y oeste del Pacífico mexicano. 2). Archipiélago Revillagigedo. 3). Islas Mariás. 4). Costa del Pacífico Sur. 5). Golfo y banco de Campeche. 6). Caribe mexicano. La Protección de los Arrecifes de Coral en México: Rescatando la biodiversidad marina y sus beneficios para la humanidad. Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente, AIDA 2015 (Cederstav et al. 2015).....23
- Figura 3. Sitio de estudio en Manzanillo, Colima. México. Arrecife de Carrizales (19.09° N, 104.44° W) en la Bahía Cenicero. Arrecife de La Boquita (19°12.25'N, 104°28.52'W) en la Bahía Santiago. En el mapa se delimita la cota de la Laguna de Juluapan con una línea azul y la antigua desembocadura en color amarillo. Las zonas urbanas se resaltan en color purpura. Los puntos de muestreo están señalados por etiquetas amarillas.....36
- Figura 4. A) Concentraciones de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de *Pocillopora verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran las concentraciones de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).....46
- Figura 5. A) Densidad de células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  de *Pocillopora verrucosa* de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) y *Pocillopora verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran la Densidad de células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$ .....47
- Figura 6. Concentraciones promedio de FPs (mg/mg de proteína total) de ambas morfologías de *Pocillopora verrucosa* expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos (n=16). Las concentraciones son estadísticamente diferentes ( $p=0.04$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney.....48
- Figura 7. A) Concentraciones promedio de FPs (mg/mg de proteína total) de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) y de *Pocillopora verrucosa* con morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran el porcentaje de FPs del total de proteína.....49
- Figura 8. A) Concentraciones de MAAs ( $\text{pmol}/\text{mg}$  de proteína) de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MAAs ( $\text{pmol}/\text{mg}$  de proteína) de *Pocillopora verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran las concentraciones de MAAs ( $\text{pmol}/\text{mg}$  de proteína).....50

- Figura 9. A) Capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del endosimbionte de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de antioxidantes totales (mM por mg de proteína) del endosimbionte de *Pocillopora verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran las concentraciones de antioxidantes totales del endosimbionte.....51
- Figura 10. A) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *Pocillopora verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran los puntos de muestreo. En el eje Z se muestran las concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo.....52
- Figura 11. A) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *Pocillopora verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran los puntos de muestreo. En el eje Z se muestran las concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo. ....53
- Figura 12. A) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *Pocillopora verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *Pocillopora verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran los puntos de muestreo. En el eje Z se muestran las concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo.....55
- Figura 13. Diagrama Venny que muestra el número de genes putativos exclusivos de la morfología verde (en azul) y de la morfología café (en amarillo) y los porcentajes que comparten entre si. Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.....60
- Figura 15 Transcritos de *P. verrucosa*, con expresión diferencial significativa, el color púrpura denota subexpresión, amarillo sobreexpresión. Morfología verde de Carrizales (CV), morfología verde de La Boquita (BV), morfología café de Carrizales (CC) y Morfología café de La Boquita (BC). Amarillo = transcritos con regulación positiva, Morado = transcritos con regulación negativa. Valores en  $\log_2$ . ....61
- Figura 16 Transcritos de *P. verrucosa*, con expresión diferencial significativa. Morfología verde de Carrizales (CV), morfología verde de La Boquita (BV), morfología café de Carrizales (CC) y Morfología café de La Boquita (BC). Genes: GFP-like protein (GFP), Photosystem II protein D1 (psbA), Calpain-9 (Capn9), Peroxidase-like protein (PXDNL), Catalase (CAT), Gamma-glutamyltranspeptidase 1 (GGT 1), Epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5), Glutathione S-transferase (GST) y Glutathione synthetase (GSH). Rojo = transcritos con regulación positiva, verde = transcritos con regulación negativa. Valores en  $\log_{10}$ .....63

## Lista de tablas

- Tabla 1. Correlaciones entre FPs, densidad celular, Chl-a, MAAs, antioxidantes totales (Aox), lipoperoxidación (MDA) y proteína total en el cnidario (Cn), endosimbionte (En) y en el holobionte (Ho). Los Valores en rojo muestran las correlaciones significantes a  $p < 0.05$  (N=34).....46
- Tabla 2. Lista de genes de interes con ontologia genica. GFP-like (GFP), Photosystem II protein D1 (psbA), Calpain-9 (Capn9), Peroxidasin-like (PXDNL), Catalase (CAT), Gamma-glutamyltranspeptidase 1 (GGT 1), Epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5), Glutathione S-transferase (GST) y Glutathione synthetase (GSH).....50

# Capítulo 1. Introducción

---

## 1.1. Antecedentes

### 1.1.1. Biología de los corales

Los arrecifes coralinos son el resultado de una simbiosis entre animales phylum *Cnidaria*, clase *Anthozoa*, orden *Scleractinia* y microorganismos fotosintéticos endosimbióticos del género *Symbiodinium*, reino *Chromalveolata*, división *Pyrrhophyta*, clase *Dinophyceae*, que a menudo se denominan zooxantelas (Roth 2014). Esta relación simbiótica propicia que los organismos fotosintéticos logren aprovechar la luz solar y el dióxido de carbono de manera más eficiente (Verón et al. 2000). La simbiosis confiere al animal hospedero la capacidad generadora de energía de una planta a través de la fotosíntesis, potenciando su capacidad para crear grandes estructuras calcáreas. A cambio, los corales proporcionan a sus endosimbiontes con nutrientes esenciales en un hábitat seguro y soleado en océanos pobres en nutrientes (Roth 2014).

Además, los organismos fotosintéticos potencian diversos procesos biológicos en ambos organismos; aumentan la capacidad para desactivar y remover desechos metabólicos y elevan la capacidad para concentrar y reciclar nutrientes limitados como el fósforo y el nitrógeno (Verón et al. 2000). La simbiosis permite que los corales puedan existir en ambientes oligotróficos como los océanos y es responsable de crear grandes estructuras sólidas. Debido a estas características, los corales son considerados “holobiontes” fotosintéticos de alta eficiencia que presentan propiedades ópticas que permiten la distribución de la luz sobre todo su tejido (Hoogenboom et al. 2012; Brodersen et al. 2014). Los beneficios de la simbiosis entre corales y dinoflagelados del género *Symbiodinium* se conocen bien. No obstante, los costos de la asociación, especialmente cuando están bajo estrés, continúan siendo el foco de muchas investigaciones (Yakovleva et al. 2009).

Los corales hermatípicos secretan carbonato de calcio significativamente más rápido que los corales ahermatípicos, los cuales no poseen asociación simbiótica (Hidaka 2016). El esqueleto individual de un pólipo coralino tiene forma tubular y es denominado “coralito”. Estas estructuras calcáreas presentan placas verticales en posición radial y se unen entre si mediante paneles horizontales, a el colectivo de estos se les llama “coenosteum” (Veron et al. 2000) (Figura 1).

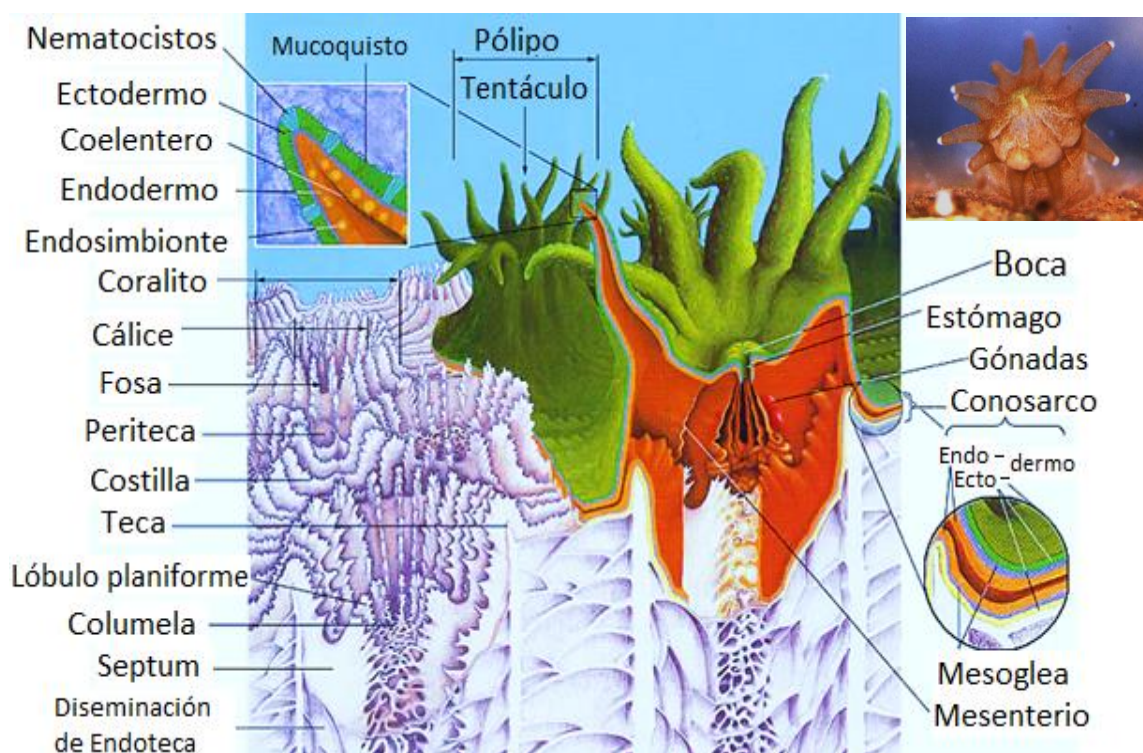


Figura 2 Diagrama esquemático de los principales elementos anatómicos de un pólipo y características básicas del esqueleto calcáreo de los corales escleractinios. Ilustrado por Geoff Kelley. Corals of the world. Veron. Vol I. 2000, traducido por E. Delgadillo-Nuño. Fotografía de un pólipo por U.S. Department of Commerce National Oceanic and Atmospheric Administration Ocean and Atmospheric Research.

El género *Pocillopora* (familia Pocilloporidae) es un taxón abundante y extendido a lo largo de la zona tropical del Indo Pacífico. El género presenta especies endémicas, especialmente en el Pacífico central y oriental. A pesar de ello, no existen distinciones claras entre estos grupos aislados, llamadas subespecies geográficas y especies endémicas regionales. Por ejemplo, *Pocillopora verrucosa*, *P. meandrina* y *P. elegans* son especies particularmente difíciles de diferenciar mediante sus características morfológicas. Su morfología es muy variable, al ser

influida por condiciones ambientales como el grado de exposición a turbulencia, variación en la profundidad y disponibilidad de nutrientes. Debido a esto, los caracteres morfométricos que permiten su distinción son pocos, haciendo difícil la delimitación de las fronteras entre estas especies (Glynn 1999). El género *Pocillopora* presenta diversas morfologías y coloraciones, como azul, cian, verde, rosa, café pálido, café oscuro, café verdoso, amarillo, crema y, en raras ocasiones, púrpura.

Esta gran variedad de coloraciones son una característica distintiva de los arrecifes coralinos y se debe en gran parte a las cromoproteínas no fluorescentes (CPs, por sus siglas en Inglés) y proteínas fluorescentes (FPs, por sus siglas en Inglés) de la familia de las proteínas verdes fluorescentes (GFP-like protein, por sus siglas en Inglés) (Lukyanov et al. 2000; Labas et al. 2002; Field et al. 2006; Field and Matz 2010; Roth et al. 2010; D'Angelo et al. 2012; Gittins et al. 2015; Takahashi-Kariyazono et al. 2015).

Estas proteínas son ubicuas en el orden *Scleractinia* (Miyawaki 2002; Field et al. 2006; Alieva et al. 2008; Lapshin et al. 2015). Las coloraciones fluorescentes verde (480-520 nm) y roja (575-600 nm) son las dominantes en 33 especies de coral (representantes de ocho familias) en la Gran Barrera de Coral de Australia (Gruber et al. 2008). Estas proteínas existen desde antes de la separación de los filos *Bilateria* y *Cnidaria* hace 700 millones de años y han evolucionado varias veces en los diferentes linajes (Shagin et al. 2004; Alieva et al. 2008).

En algunas especies, las FPs se pueden encontrar en concentraciones relativamente altas, representando hasta el 14% de las proteínas totales, algunas con vida media mayor a 20 días (Leutenegger et al. 2007). Estas proteínas presentan una variabilidad intraespecífica sorprendente. Los corales poseen multicopias de genes de FPs numerosas, las cuales pueden aumentar considerablemente el rango dinámico y modular los niveles de su transcripción en respuesta a la luz ambiente, variaciones de temperatura o estrés oxidativo (Gittins et al. 2015). Las FPs absorben energía lumínica de emisión primaria y emiten luz en diferentes longitudes de onda, principalmente cian (485–495 nm), verde (480-520 nm), amarillo (525–570 nm) y rojo (575–600 nm) (Alieva et al. 2008).



Se cree que las proteínas similares a la GFP pueden funcionar para regular las condiciones fisiológicas en los *Antozoos*. Al parecer, estas moléculas en corales de aguas poco profundas juegan un papel en la fotoprotección. Sin embargo, las especies de corales mesotópicos (30–150 m), que se encuentran en condiciones de luz escasa, también presentan fluorescencia. Tomando en cuenta que estas moléculas absorben luz azul y UVR, la cual penetra hasta 200 m, y emiten luz de menor energía, existe la posibilidad de que las FPs ayuden a mejorar la fotosíntesis mediante la absorción, cribado o dispersión de la luz en el tejido del holobionte. Ya que los picos de excitación principales de las proteínas fluorescentes caen en cualquier lado del pico fotosintético principal, lo que puede reducir la competencia y ser importante en un entorno de energía limitada. No obstante, no podemos descartar que la fluorescencia pueda ser un remanente de una función que ya no es relevante, al menos para los corales mesotópicos (Roth et al. 2015).

La luz es un factor regulador clave que da forma a la productividad, fisiología y ecología del holobionte coralino, ya que los simbioses dependen de la luz para satisfacer sus demandas metabólicas (Roth 2014). Los arrecifes se ubican mayormente en la zona eufótica donde la intensidad lumínica es fluctuante, desde niveles altos y dañinos en superficie, hasta condiciones sombrías limitantes en la parte inferior de esta zona (Salih et al. 2000). El espectro de luz juega un papel fundamental en la biología de corales. Se sabe que la luz azul de baja longitud de onda (440–480 nm) propicia un mayor crecimiento de corales, aumentando la densidad de células del endosimbionte, tasa de fotosíntesis, niveles de clorofila, FPs y otras moléculas fotoprotectoras como  $\beta$ -carotenoides. Mientras que la luz roja (640–680 nm), promueve la necrosis y mortalidad de ciertos corales (D'Angelo et al. 2008; Wijgerde et al. 2014).

Aunque no se sabe con certeza por que los corales responden de manera diferente ante las diferentes longitudes de onda, podemos suponer que estos procesos fisiológicos que se ven mejorados con la luz azul son el resultado de la adaptación de los corales para aprovechar de manera diferencial las longitudes de onda de la radiación fotosintéticamente activa (PAR), aprovechando las longitudes de onda azul que tienen mayor persistencia en la columna de agua (Levy et al. 2006). Debido a la relación simbiótica, los arrecifes de coral son extremadamente sensibles a cambios ambientales y frecuentemente expulsan sus simbioses fotosintéticos

cuando están fisiológicamente estresados, esto se conoce como blanqueamiento coralino (Roopnarine y Dineen 2016).

Al igual que otros fotoautótrofos, *Symbiodinium* debe equilibrar la cantidad de luz solar absorbida para mantener altas tasas de productividad sin incurrir en daños. El carbono fijado por *Symbiodinium* se transloca para alimentar el crecimiento y la calcificación del coral. Además, el oxígeno producido como subproducto de la fotosíntesis puede promover las tasas máximas de calcificación de los corales (Roth 2014). Las capacidades heterotróficas de los corales pueden variar considerablemente debido a un conjunto de factores que incluyen la luz, la temperatura y flujo de agua, abundancia y composición de zooplancton, concentraciones de material particulado suspendido y fluctuaciones altas de nitrógeno disponible. El carbono podría ser un factor importante que afecta la susceptibilidad al blanqueamiento de los corales entre y dentro de los hábitats del arrecife (Borell et al. 2008).

### 1.1.2. Estado actual de los arrecifes

Los arrecifes de coral cubren tan sólo el 0.1% (600,000 km<sup>2</sup>) de la superficie del planeta. A pesar de su cobertura escasa estos ecosistemas son de alto valor ecológico, económico y social, siendo uno de los ambientes más diversos del planeta. Con una productividad alta, albergan una gran biodiversidad y proveen servicios ambientales valiosos como protección de la línea de costa, pesca, turismo, recreación, investigación y valor estético. Parte de su funcionalidad está dada por la estructura tridimensional compleja de los arrecifes, la cual proporciona un hábitat propicio para la vida y una barrera que modifica el régimen de energía de las olas, actuando como protección para la vida marina (Perry et al. 2013).

Los arrecifes de coral han sido impactados a escala global en las últimas décadas (Baker et al. 2008). Estos ecosistemas se encuentran en un estado de decadencia debido a la combinación sinérgica entre diversos factores ambientales y actividades humanas destructivas derivadas del crecimiento poblacional. Por ejemplo, la pérdida de hábitat por desarrollo no sustentable, la

destrucción de manglares y humedales, la contaminación de los arrecifes por fuentes puntuales o dispersas, el aumento de la tasa de sedimentación, los daños físicos por anclaje, la sobreexplotación, la pesca destructiva y las enfermedades (Mora et al. 2006; Baker et al. 2008; Baird et al. 2009; Perry et al. 2013; Roth y Deheyn 2013; Roth et al. 2013; Anithajothi et al. 2014; Haas et al. 2014). Los estresores más significativos para los arrecifes de coral son los incrementos anómalos en la temperatura superficial del mar, índices de radiación UV altos y la sedimentación. Estas condiciones adversas, ya sean individualmente o de manera sinérgica, inducen al coral a un estado de estrés que puede desencadenar ciertos procesos fisiológicos de aclimatación. Si los estresores persisten, el coral sufre un proceso de blanqueamiento y posteriormente se produce la pérdida de cobertura coralina y el arrecife muere.

Actualmente el cambio climático está firmemente establecido por la ciencia como una realidad y los ecosistemas se enfrentan a diversos desafíos emergentes en las próximas décadas (Baker et al. 2008). Los arrecifes de coral se encuentran entre los ecosistemas más sensibles al calentamiento global y se desconocen los factores que predicen el potencial de dispersión de los corales. (Strader et al. 2016). Desde principios de la década de 1980 se han producido episodios de blanqueamiento y mortalidad de arrecifes de coral, principalmente debido al calentamiento del océano inducido por el clima. Casi todos los años se registran estos eventos en uno o más de los mares tropicales del mundo. Los episodios de blanqueamiento son esporádicos y los más graves suelen estar acompañados de fenómenos océano-atmósfera como El Niño (ENOS), que se caracteriza por elevaciones de la temperatura del océano (Baker et al. 2008). Además, las enfermedades de los corales representan una grave amenaza para la supervivencia de los arrecifes de coral. *Shiloi vibrio* es una de las bacterias asociada a eventos de blanqueamiento durante veranos con temperaturas entre 26 y 31 °C (Murali et al. 2010).

Se cree que la ausencia de zooxantelas en ovocitos de muchas especies de coral y la capacidad de transmitir fácilmente zooxantelas a las larvas son estrategias para contrarrestar ciertos estresores ambientales. Las larvas del coral *Acropora intermedia* con endosimbiontes presentan alta actividad de las defensas antioxidantes y altos niveles de daño celular por estrés oxidativo, en contraste con las larvas que no presentan simbiontes. Las larvas de coral con zooxantelas tienen una supervivencia más baja que aquellos que carecen de zooxantelas cuando

se exponen a altas temperaturas. Debido al estrés oxidativo que se origina en los endosimbiontes, el cual causa daño celular en el huésped bajo estrés por calor (Yakovleva et al. 2009).

Los cambios ambientales amenazan la persistencia de estos ecosistemas al alterar la composición y función de comunidades coralinas completas (Baker et al. 2008; Roopnarine et al. 2016). Lo anterior, propicia un crecimiento diferencial entre los taxones presentes en las comunidades coralinas como respuesta ante los estresores ambientales. Esto desencadenaría una serie de interacciones ecológicas intraespecíficas totalmente nuevas que, en ciertos casos, generan un desarrollo preponderante para algunas especies de coral, provocando un impacto profundo en la resiliencia de los arrecifes coralinos (Sogin et al. 2016; Mumby 2017). En muchos lugares, los esfuerzos por conservar estos ecosistemas han resultado inútiles. En Singapur, más del 60% del hábitat de los arrecifes de coral ha desaparecido debido a décadas de presión constante a causa del desarrollo urbano (Chou 2016).

En el sur del Golfo Árabe se registró un evento de blanqueamiento severo a finales de 1990 que causó una mortalidad generalizada. Más de una década después los corales seguían dominando el bentos (40% de cobertura en 10 sitios de más de 350 km), pero las comunidades coralinas variaban espacialmente. Los sitios al oeste, los cuales presentaron peores condiciones durante el blanqueamiento de los 90, actualmente tienen poca diversidad y riqueza de especies con comunidades dominadas por *Porites* sp. (88% de cobertura). Por otro lado, se ha dado una recuperación limitada de los corales *Acropora* sp. (<1% de cobertura), los cuales representaban las comunidades dominantes anteriormente. Esto indica que el blanqueamiento severo puede tener impactos sustanciales a largo plazo en las comunidades de corales, incluso en áreas con corales termotolerantes como los del sur del Golfo Árabe (Burt et al. 2011).

Se necesita una mayor comprensión fisiológica y ecológica de la simbiosis coral-algal para la protección y conservación de los arrecifes de coral (Roth 2014). Además, es de suma importancia realizar monitoreos que determinen la pérdida de cobertura coralina. Enfatizando la medición e interpretación de los cambios en la diversidad coralina y las tasas de recuperación del arrecife. De esta manera, se podrá generar información acerca de los factores biológicos que propician el desempeño positivo de ciertas especies de coral y sus diferentes morfologías frente

a las perturbaciones ambientales y antropogénicas (Chou 2016; Sogin et al. 2016). De esta manera, la gestión de los arrecifes de coral debe considerar el incremento de las temperaturas oceánicas, los rangos de sedimentación, el substrato de arrecife desestabilizado y el cambio de la estructura biológica de la comunidad, incluso a niveles moleculares.

### 1.1.3. Comunidades coralinas del Pacífico central mexicano

En los últimos años se ha caracterizado un gran número de arrecifes o parches coralinos en el Pacífico mexicano, los cuales están distribuidos a lo largo de la costa y en las islas oceánicas adyacentes (Pérez-Vivar 2006) (Figura 2). Las 43 especies de corales reportadas en el Pacífico mexicano corresponden a los géneros *Pocilloporidae*, *Poritidae* y *Agaricidae* (Reyes-Bonilla et al. 2010). Los sistemas arrecifales más representativos en el Pacífico mexicano se encuentran en el Golfo de California, oeste del Pacífico mexicano, en el Archipiélago Revillagigedo, las Islas Marías y la Costa del Pacífico Sur. En esta última región, en el Estado de Colima, en la ciudad de Manzanillo se encuentran dos sistemas de arrecifes importantes: Carrizales y La Boquita.

Los arrecifes de Carrizales y La Boquita son los sistemas biológicos más importantes de la costa de Colima. El arrecife de Carrizales alberga 39% de las especies coralinas conocidas en el Pacífico mexicano (Reyes-Bonilla et al. 2013), sus condiciones son relativamente estables debido a que se encuentra en un área aislada con acceso exclusivamente marítimo y a su profundidad (0.5 a 12 m), siendo el menos afectado de los dos por presión antropogénica. La comunidad coralina de La Boquita presenta un deterioro grave asociado principalmente a la reubicación inadecuada de la conexión entre la Laguna de Juluapan y el mar. Debido a los valores de sedimentación altos provenientes de las descargas constantes de Juluapan, los incrementos anómalos de temperatura y otros factores como la fragmentación, erosión biológica y la alta presión turística, este ecosistema ha reducido su tamaño considerablemente en los últimos años (Liñán-Cabello et al. 2010).

Liñán-Cabello y colaboradores (2006) reportaron un blanqueamiento de 12% de la población de coral *P. verrucosa* superficial del arrecife de La Boquita en el verano de 2004 resultado de los altos niveles de radiación solar causados por un bajo porcentaje de nubosidad y altos promedios de luz solar durante el período de estudio. Para el año 2010, alrededor del 20% de estos corales, ubicados cerca de la desembocadura de Juluapan, fueron cubiertos por sedimentos provenientes de la Laguna (Liñán-Cabello et al. 2006; Liñán-Cabello et al. 2009; Liñán-Cabello et al. 2010a). Esto resultó en un deterioro ecológico acelerado del ecosistema, provocando un estrés agudo en los organismos sobrevivientes, debido a las interacciones competitivas con macroalgas, fluctuaciones en niveles de luz, nutrientes y temperatura que afectan a la capacidad fotosintética de los endosimbiontes (Liñán-Cabello et al. 2006; Flores-Ramírez et al. 2007; Liñán-Cabello 2010, 2011; Delgadillo-Nuño et al. 2014).

Actualmente existe una necesidad urgente de desarrollar indicadores de alerta temprana para la evaluación de la salud del coral (Mayfield et al. 2014). Tomando en cuenta la pérdida constante de cobertura coralina en diversas partes del mundo y la importancia ecológica intrínseca de los arrecifes. Es de suma importancia comprender los mecanismos celulares que le permiten al organismo sobrevivir durante el periodo de estrés antes de que el blanqueamiento sea irreversible (Carpizo-Ituarte et al. 2013), con la finalidad de generar información que nos ayude a desarrollar conocimientos de la biología y simbiosis de estos organismos.

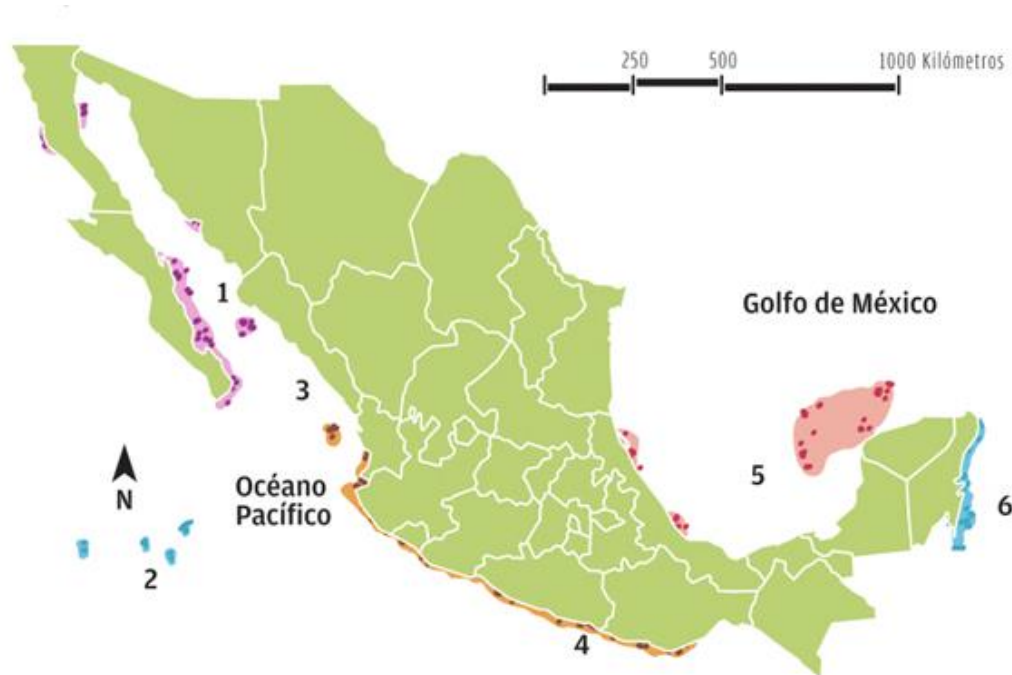


Figura 3. Distribución de los arrecifes coralinos en México. 1) Golfo de California y oeste del Pacífico mexicano. 2). Archipiélago Revillagigedo. 3). Islas Marías. 4). Costa del Pacífico Sur. 5). Golfo y banco de Campeche. 6). Caribe mexicano. Ilustración por Cederstav et al. (2015).

#### 1.1.4. Respuesta ante el estrés termo-oxidativo y foto-oxidativo

Estresores como niveles altos de radiación solar (UVR y PAR), altas temperaturas, variaciones de salinidad y sedimentación, por si solas o en combinación sinérgica, pueden inducir un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (EROS). No obstante, los parámetros de radiación solar y temperatura son los estresores más significativos para el coral, debido a que promueven la liberación de radicales como el superóxido ( $O_2^-$ ), singlete de oxígeno ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxil ( $HO^\cdot$ ) (Higuchi et al. 2012). Todos provocan la peroxidación lipídica de las membranas celulares, pérdida de la función de organelos, mutaciones, inactivación enzimática, reducción en la eficiencia del metabolismo, reducción de la fijación de carbono y decremento de la fotosíntesis (Flores-Ramírez et al. 2007; Roth et al. 2010). El estrés oxidativo es causado por estresores ambientales asociados al cambio climático global y en última instancia conduce a la ruptura de la simbiosis entre el coral y la microalga (Roth 2014).

Los corales poseen varias estrategias contra el daño oxidativo por la exposición a altas temperaturas y a la radiación UV. Por ejemplo, el sistema de profenoloxidasas (PPO), enzimas antioxidantes como la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa, glutatión reductasa (GR), enzimas de reparación del DNA, acumulación de pigmentos fotosintéticos como la clorofila *a* (Chl *a*) y lípidos. Además de la producción de antioxidantes de bajo peso molecular como  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -tocoferol, flavonoides, hidroxiquinonas, glutatión, las micosporinas y los aminoácidos de tipo micosporina (MAAs, por sus siglas en inglés) y proteínas como las CPs y FPs (Palmer et al. 2009; Liñán-Cabello et al. 2010; Strychar et al. 2011)

Anithajothi y colaboradores (2014) sostienen que los ensayos con enzimas antioxidantes como SOD y CAT pueden ser usadas como biomarcadores para la identificación de corales con susceptibilidad al blanqueamiento, al menos para las especies *Acropora formosa*, *Echinopora lamellosa*, *Faviafavus* sp., *Favites halicora*, *Porites* sp. y *Anacropora forbesi*. Los autores demostraron que, excepto en *A. formosa* y *F. favus* la actividad de CAT es más alta en el endosimbionte que en el tejido del coral. Por otra parte, sugieren que la actividad de SOD varía significativamente entre las especies.

Se ha reportado que la actividad de las enzimas SOD y CAT, así como la densidad de células de endosimbionte por cm<sup>2</sup> de *P.a verrucosa* y *Galaxas fascicularis* cambian cuando el coral es expuesto a incrementos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> junto con una elevación de la temperatura (Higuchi et al. 2008). La CAT aumenta su actividad cuando aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero las actividades de SOD se mantienen relativamente sin cambios. A su vez, el aumento de la temperatura del agua provoca un aumento de las actividades de SOD y CAT en ambos organismos. Se reporta que en la especie *G. fascicularis*, además del aumento de estas enzimas, la densidad de células de endosimbionte baja después del aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de la temperatura, pero éstas se mantienen más altas que en los corales expuestos sólo a temperaturas altas (Higuchi et al. 2012).

Liñán-Cabello y colaboradores (2010a), reportaron que en los corales *Pocillopora capitata* del arrecife de La Boquita, los marcadores de estrés oxidativo y los antioxidantes varían significativamente a través de las estaciones. Según las pruebas ANOVA y Tukey que los autores realizaron, los corales presentan niveles significativamente mayores de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (P=0.004), daño celular



inferido a partir de la concentración de malondialdehído (MDA) ( $P=0.001$ ), CAT ( $P=0.045$ ), GR ( $P=0.001$ ), MAAs ( $P=0.000$ ), y Chl *a* ( $P=0.000$ ) en el verano. Mientras que en invierno sólo Chl *a* y densidad de células de endosimbionte son diferentes únicamente en sitios de poca profundidad ( $P=0.004$  y  $P=0.00$ , respectivamente) y en los sitios profundos para el  $O_2^-$  ( $P=0.04$ ). Los resultados de este estudio indican que al menos para *P. capitata* el aumento de la temperatura y la radiación asociada a los cambios estacionales influye en la actividad y concentración de los marcadores analizados.

Carpizo-Ituarte y colaboradores (2013) reportaron resultados similares en comunidades de *P. verrucosa* de las costas del Pacífico central mexicano. Los autores encontraron que la actividad de enzima SOD [CuZn] incrementa después de someter corales durante 18 horas a un incremento de temperaturas desde 20°C a 31°C. Por su parte, Higuchi y colaboradores (2008) han reportado que en el coral *Galaxea fascicularis*, tanto en el cnidario como en el endosimbionte la actividad de la enzima CAT incrementa conforme aumentan la temperatura y  $H_2O_2$ . Sin embargo, los mismos autores señalan que la actividad de CAT no varía cuando se combinan las dos variables (Higuchi et al. 2012).

Los MAAs son moléculas solubles en agua de bajo peso molecular que absorben radiación UV en el rango de longitud de onda 310-365 nm. Estas moléculas están presentes en diversos organismos como hongos, cianobacterias, macroalgas y fitoplancton (Sinha et al. 2007; Hartmann et al. 2017). Los genes que sintetizan MAAs se transfirieron de cianobacterias a dinoflagelados y posiblemente *Synechococcus* sp. que actuó como donante durante el evento de transferencia lateral de genes (Singh et al. 2012).

Banaszak y colaboradores (2006) analizaron extractos metanólicos de 54 especies de cnidarios simbióticos del Caribe mexicano, incluyendo corales hidrozoicos, anémonas, gorgonias y corales escleractinios. Los autores reportan la presencia de entre uno y cuatro diferentes MAAs en todas las especies estudiadas bajo condiciones naturales. Los MAAs se identificaron como micosporina-glicina, shinorina, porphyra-334 y pallina. Los autores sugieren que *Symbiodinium* se limita a producir cinco MAAs y también parece haber un orden definido de aparición de estos. En general, la micosporina-glicina se encontró en las concentraciones más altas. Esta molécula a

diferencia de otras, absorbe dentro del rango de ultravioleta B (UVB, 280-320 nm) y también es conocida por sus propiedades antioxidantes (Banaszak et al. 2006).

Se ha reportado que *Stylophora pistillata* presenta cantidades mínimas de MAAs cuando no está expuesta a radiación UV. No obstante, las concentraciones aumentan rápidamente bajo exposición a UVR y estas moléculas tienden a estabilizarse tras varios días. Además, este coral responde ante la interrupción UVR disminuyendo rápidamente los niveles de MAA primarios, mientras que los MAA secundarios continuaron aumentando (Shick 2004).

Singh et al. (2008) sugieren que los MAAS en el coral *A. variabilis* pueden tener diversas funciones además de la fotoprotección, debido a que al someter cepas de dinoflagelados endosimbiontes a tratamientos de aumento térmico y radiación UV como factores de estrés, estas no presentaron efecto sobre la producción de MAAs. Sin embargo, el tratamiento con sales de amonio presentó efectos sinérgicos con el estrés UV. La síntesis de MAAs también fue inducida por la sal de amonio como único estresor y de una manera dependiente de la concentración para los organismos sin estrés UV.

Rosic y Dove (2011) reportan que además de la actividad fotoprotectora, los MAAs también actúan en la regulación osmótica, además de ser reservorios intracelulares de Nitrógeno y antioxidantes de especies reactivas de oxígeno (ROS) y precursores de daño inducido causado por el  $^1\text{O}_2$ . Esta diversidad de moléculas y su funcionalidad variada podría explicar las diferencias en la concentración de MAAS de las dos morfologías de *P. verrucosa*.

Carignan y colaboradores (2009) reportan que los corales *Pocillopora capitata* recolectados en la Bahía de Santiago, Manzanillo, México, contienen una gran diversidad MAAs primarios y secundarios típicos de algunas especies de corales hermatípicos: micosporina-glicina, shinorina, porphyra-334, micosporina-metilamina-serina, micosporina-metilamina-treonina, palinina-serina, pallina y un MAA predominante. La patinina-treonina, que también estuvo presente en altas concentraciones en los corales *Pocillopora eydouxi* y *Stylophora pistillata*.

Yakovleva y colaboradores (2004) sugieren que la micosporina-glicina (Myc-Gly) funciona como un antioxidante en el tejido del holobionte. Los autores discuten que este MAA presenta un papel de suma importancia en la supervivencia de los corales hermatípicos bajo estrés térmico. Para llegar a esta conclusión, los autores evaluaron la eficiencia fotoquímica de PSII (Fv/ Fm), actividad de enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Otras variables que se midieron fueron la composición y abundancia de MAAs en el tejido de los corales *Platygyra ryukyuensis* y *Stylophora pistillata* y en zooxantelas simbióticas, durante 12 horas de exposición a altas temperaturas (38 °C). La exposición al estrés térmico durante las primeras seis horas indujo una reducción pronunciada en la abundancia de Myc-Gly pero no en otros MAAs en el tejido coralino y las zooxantelas de ambas especies. Cuando la exposición se prolongó a 12 h, el grupo de Myc-Gly continuó disminuyendo en *P. ryukyuensis* y se agotó por completo en *S. pistillata*. El retraso en el inicio del estrés oxidativo en *P. ryukyuensis* y el aumento dramático en las actividades de las enzimas antioxidantes en *S. pistillata*, que contiene concentraciones bajas de Myc-Gly sugieren que este compuesto proporciona una protección rápida contra el estrés oxidativo antes de que la producción de enzimas antioxidantes sea activada.

Los MAAs son metabolitos secundarios “multipropósito” que funcionan como protectores ante niveles dañinos de radiación UV y tener funciones adicionales: pueden servir como moléculas antioxidantes y pueden acumularse como solutos compatibles después del estrés salino. Su formación es inducida por desecación o por estrés térmico, y se ha sugerido que funciona como un pigmento accesorio de recolección de luz en la fotosíntesis o como un reservorio de nitrógeno intracelular (Yakovleva et al. 2004; Oren and Gunde-Cimerman 2007; Rosic and Dove 2011).

Además de los MAAs del *Symbiodinium*, el holobionte presenta una gran variedad de pigmentos “multifuncionales”. Los cnidarios por su parte, ostentan una asombrosa diversidad de FPs. Las FPs tienen una renovación lenta en los antozoos ( $\approx 20$  días), lo que sugiere que el costo energético de mantener una concentración alta de esta proteína es comparativamente bajo (Leutenegger et al. 2007). La estabilidad excepcionalmente alta de las FPs *in vivo* e *in situ* las hace adecuadas para cumplir funciones que requieren una alta concentración de proteínas, por ejemplo, sistema inmune, respuesta ante estrés oxidativo, foto aclimatación y blanqueamiento

(Mazel et al. 2003; Bou-Abdallah et al. 2006; D'Angelo et al. 2008; Gruber et al. 2008; Roth et al. 2010; Roth et al. 2015). Estos pigmentos son fácilmente detectables (Treibitz et al. 2013) y extraíbles (Samarkina et al. 2009). Por estas razones, las FPs sirven como marcadores ópticos intrínsecos de la condición fisiológica, siempre que se entiendan bien los determinantes que controlan su expresión (D'Angelo et al. 2008).

Roth y colaboradores (2013) reportaron que la concentración de FPs y fluorescencia verde en corales están directamente relacionadas con procesos de adaptación al blanqueamiento y con comunidades sanas. Los autores han reportado que en variaciones de temperatura de  $\pm 5$  °C las concentraciones de GFP en *Acropora yongei* descienden al igual que su estado de salud. Esta condición continúa hasta el inicio del blanqueamiento tras nueve días. Posteriormente, los organismos con el decremento de temperatura logran la aclimatación y recuperan las concentraciones iniciales de GFP, mientras que los organismos que continúan bajo el incremento de temperatura mantienen bajos niveles de GFP hasta su muerte. Sin embargo, su fluorescencia aumenta significativamente a pesar de su reducción. Estos resultados fueron interpretados en términos más generales, sugiriendo que los corales con más proteínas fluorescentes tienen más resistencia al blanqueamiento (Gruber et al. 2008). Por esto, se propone que el uso de la fluorescencia de FPs como un indicador de la salud de los corales podría ser altamente confiable.

Bou-Abdallah y colaboradores (2006) señalan que aparentemente la GFP puede desactivar los radicales  $O_2\bullet^-$  sin cambios en la fluorescencia. Sin embargo, aún no son del todo claro los mecanismos asociados. En contraste, de acuerdo a Graham y colaboradores (2002), la GFP decrece su fluorescencia al exponerla a otras especies de ROS como peróxido de hidrógeno o anión de peroxinitrato en presencia de mercaptoetanol, descomponiendo el peroxinitrito, a nitrito o a NaOH a niveles de exposición sin efecto. También sugieren que las propiedades antioxidantes de la GFP podrían ser un suplemento importante para las defensas antioxidantes tanto del cnidario como del endosimbionte bajo las condiciones hiperóxicas constantes que estos organismos experimentan durante el día. Sin embargo, la contribución de dichas proteínas debe investigarse a mayor profundidad.

Palmer y colaboradores (2009) reportaron actividad de eliminación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en siete especies del Caribe con diferentes FPs: *M. annularis*, *M. faveolata*, *M. cavernosa*, *D. strigosa*, *P. astreoides*, *D. stokseii* y *S. siderea*. A pesar de las diferencias interespecíficas la actividad no presentó diferencias significativas. Por lo tanto, sugiere que las proteínas fluorescentes podrían complementar la actividad de la CAT, que es el mecanismo principal de eliminación de  $H_2O_2$ .

Se ha propuesto que los pigmentos similares a la proteína verde fluorescente (GFP) tienen efectos benéficos sobre la fotobiología del coral (Roth et al. 2015; Lyndby et al. 2016). D'Angelo y colaboradores (2008), analizaron el efecto de la luz sobre la regulación de las principales clases de FPs en corales de los taxa *Acroporidae*, *Merulinidae* y *Pocilloporidae*. Ellos reportaron que los niveles de FPs estaban estrechamente controlados por la luz en los tejidos de todas las especies. Los autores reportan dos grupos con base en su regulación claramente dependiente de la luz. El primer grupo, de umbral bajo contiene principalmente FPs color cian. Estas se expresan en cantidades considerables con muy bajas intensidades de luz y su contenido tisular aumenta con la luz. El segundo grupo, el de umbral alto incluye FPs verdes y rojas, así como cromoproteínas no fluorescentes. Estos pigmentos están esencialmente ausentes en corales cultivados con muy poca luz, pero su contenido de tejido aumenta en proporción a las densidades de flujo de fotones.

Las FPs presentan relaciones con el calentamiento de coral y la óptica de los tejidos (Lyndby et al. 2016). En tejidos del coral masivo *Dipsastraea* sp., la GFP se correlaciona positivamente con el calentamiento del coral y la mejora de la irradiancia en la superficie del tejido. El calentamiento es más intenso bajo irradiación roja (680 nm). Mientras que la mejora de la irradiación en el tejido coralino fue máxima cuando se iluminó con luz azul. Hasta 62% de esta mejora fotónica se debió a la reemisión de fluorescencia verde. Los autores sugieren que los pigmentos de tipo FPs dispersen la radiación incidente, lo que mejora la absorción de la luz y el calentamiento del coral. Ellos concluyen que los pigmentos fluorescentes pueden tener un papel central en la modulación de la absorción y el calentamiento de la luz coralina.

Se ha demostrado que la expresión de distintas FPs está relacionada con el crecimiento acelerado en las ramificaciones expuestas y en los márgenes de colonias de coral sanas, así como

en partes de colonias alteradas en respuesta a heridas e infestación con epibiontes o parásitos. D'Angelo y colaboradores (2012) sugieren que la expresión de diferentes homólogos de FPs es parte de la respuesta inmune innata y de los mecanismos de reparación en los corales del Mar Rojo, el Golfo Pérsico y las islas Fiji, tanto en su hábitat natural como en condiciones específicas de laboratorio.

Palmer y colaboradores (2009b) reportaron la presencia de una proteína fluorescente roja (RFP, por sus siglas en inglés) en tejidos asociados a trematodiasis (infección por larva parásita del tremátodo *Podocotyloides stenometre*) en el coral *Porites compressa*. Los autores determinaron mediante cortes histológicos que la fluorescencia verde está presente en el tejido de coral sano, mientras que la fluorescencia roja se manifiesta en el tejido comprometido. Esta RFP se limita a la epidermis, no está asociada con células y parece no estructurada. Estos datos sugieren que la FP roja se produce y localiza en tejido infectado por trematodos larvales y juega un papel en la respuesta inmune en los corales.

La fluorescencia roja en plánulas del coral *Acropora millepora* podría ser un indicador del potencial de dispersión ya que se correlaciona con la respuesta a una señal de asentamiento. La expresión génica de otro análogo RFP en *A. millepora* se correlaciona con características parecidas a la diapausa que muy probablemente se asocien con la dispersión extendida. Strader y colaboradores (2016) compararon la expresión génica en plánulas de tres morfologías fluorescentes bajo tres tratamientos de luz. Las plánulas con fluorescencia verde alta no difirieron en sus respuestas de expresión génica a las que presentaban fluorescencia verde baja. Por otro lado, las larvas rojas demostraron las firmas de expresión génica del arresto del ciclo celular y la transcripción disminuida acompañada por una producción elevada de ribosomas y defensas elevadas contra el estrés oxidativo, su perfil era muy similar a las firmas de tolerancia térmica elevada en la misma especie de coral, además se asemejaba funcionalmente a estados de pausa en insectos y nematodos.

Una RFP con características similares a la mencionada anteriormente se identificó en el coral *Euphyllia ancora*, la EaRFP. Mediante análisis inmunohistoquímico, Shikina y colaboradores (2016) revelaron que sólo los ovocitos expresan EaRFP, mientras que las células somáticas

ováricas no. La expresión de esta proteína comienza en la etapa temprana del ovocito y continúa hasta el período de maduración. Además, demuestran que la EaRFP recombinante posee una actividad de degradación de  $H_2O_2$ . Los autores sugieren que este tipo de RFPs juega un papel en la protección de los ovocitos contra el estrés oxidativo desde las primeras hasta las etapas finales de la ovogénesis.

La fluorescencia es común tanto en adultos como en larvas de coral. Se ha registrado que existen cambios en la fluorescencia de coral, la abundancia de dinoflagelados endosimbióticos y el tamaño de las plánulas en diferentes etapas de desarrollo del coral *Seriatopora hystrix*. La fluorescencia de este coral cambia durante el desarrollo, pasando del verde en larvas a cian en colonias adultas. Las larvas de coral mostraron una gran variación de proteínas verdes fluorescentes (GFP), abundancia de dinoflagelados y tamaño (Roth et al. 2013). Takabayashi y Hoegh-Guldberg (1995) reportaron que los corales *Pocillopora damicornis* de morfología rosa presentan concentraciones significativamente más altas de *pocilloporina*, una FP de color azul cian (CFP), en comparación a los corales de morfología café. Esto sugiere fuertemente que la capacidad de expresión de la producción de pigmento está controlada genéticamente.

Las FPs son consideradas desde hace años como indicadores del estado fisiológico en varias especies de corales. Actualmente sus niveles y espectros de luz son usados como indicadores en campos como patología, estrés oxidativo, fotoaclimatación y blanqueamiento (Mazel et al. 2003; Bou-Abdallah et al. 2006; D'Angelo et al. 2008; Gruber 2008; Roth et al. 2010). La fotoprotección (Salih et al. 2000) y la capacidad de aumentar la eficiencia de la fotosíntesis (Roth et al. 2015), son las hipótesis más destacadas y aunque en primera instancia parecen contradictorias, ambas pueden ser el resultado del mismo proceso, la modulación de la radiación fotosintéticamente activa (PAR) dentro del holobionte, mediante la transformación de la UVR dañina.

Debido a la "multifuncionalidad" aparente de las FPs, a su fácil extracción, a que son altamente estables y a se puede inferir su concentración mediante fotografías de fluorescencia, las FPs se consideran biomarcadores intrínsecos excelentes de los procesos fisiológicos, fotobiológicos y de salud general en los corales (Leutenegger et al. 2007; D'Angelo et al. 2008;

Samarkina et al. 2009; Treibitz et al. 2013). De manera particular, las herramientas de imágenes de fluorescencia tienen el potencial de mejorar las evaluaciones ecológicas y fisiológicas (Treibitz et al. 2013). Estas herramientas nos permitirían estimar rápidamente, de manera no invasiva, las condiciones fisiológicas de los corales, siempre y cuando se entiendan bien los determinantes que controlan su expresión a nivel transcripcional y los patrones de regulación específicos (D'Angelo et al. 2008).

Aun con la tendencia creciente del uso de estas proteínas como indicadores fisiológicos, el perfil de expresión, la funcionalidad y la relación entre las FPs y la biología del holobionte permanece aún incierto. Por ende, las imágenes de fluorescencia y los análisis ómicos de esta proteína se realizan regularmente en estudios de laboratorio y aún no se ha utilizado a gran escala (Treibitz et al. 2013). Por estas razones, el presente estudio se enfoca en el análisis de la respuesta fisiológica y molecular de corales *P. verrucosa* de morfologías verde y café ante diferentes estresores ambientales *in situ*. Con el fin de aportar información que nos permita acercarnos al entendimiento de los procesos biológicos que desempeñan las FPs.

## **1.2. Justificación**

Debido a la importancia ecológica de los arrecifes coralinos y a su estado actual de decaimiento global, es importante generar información que nos ayude a desarrollar conocimiento acerca de la biología y simbiosis de los corales, haciendo énfasis en la observación e interpretación de procesos de aclimatación específicos de diferentes especies y morfologías. De esta manera, podremos desarrollar en el corto y mediano plazo, conocimientos que sirvan de base o ayuden en la toma de decisiones orientadas a la restauración de las especies más vulnerables ante los cambios ambientales.

En el Pacífico mexicano, los corales están representados principalmente por el género *Pocillopora*, siendo *P. verrucosa* la especie más abundante. En las costas de Colima, los arrecifes de La Boquita y Carrizales albergan 39% de las especies coralinas conocidas en México (Reyes-



Bonilla et al. 2013), y ambos están constituidos casi enteramente por *Pocilloporidos*. A pesar de su importancia ecológica en la región, actualmente existen pocos estudios acerca de la biología de estos corales. Se ha reportado para algunos *Pocilloporidos*, que la expresión de las FPs difiere entre morfologías de una misma especie. Corales de coloración rosa o verde presentan concentraciones significativamente más altas que corales cafés (Takabayashi y Hoegh-Guldberg 1995). Tomando en cuenta que la GFP está relacionada directamente con la salud, procesos de aclimatación y estrés, es muy probable que las distintas morfologías de *P. verrucosa* presenten diferencias notables en su respuesta fisiológica y de expresión génica en función de su coloración.

Con base en lo anterior, se pretende evaluar la respuesta fisiológica del coral *P. verrucosa* de morfologías verde y café, los cuales fueron reubicados bajo diferentes profundidades en el mismo ambiente y en un arrecife severamente impactado, con el fin de identificar y valorar las posibles diferencias en la respuesta fisiológica y en la expresión de genes durante un periodo de 24 horas.

### 1.3. Hipótesis

1. Con base en lo observado en otras especies, la morfología verde del coral *P. verrucosa* presentará mayores concentraciones y niveles de expresión génica asociados a proteínas fluorescentes (FPs), respecto a la morfología café.
2. Debido a que la GFP está relacionada directamente con la salud y procesos de aclimatación en corales, la morfología verde de *P. verrucosa* presentará mayor capacidad de respuesta ante el estrés con respecto al del coral de morfología café.
3. Dado que ambas morfologías de *P. verrucosa* (verde y café) proceden del mismo ambiente (Carrizales), los perfiles fisiológicos y de expresión génica serán semejantes en su ambiente, pero diferentes cuando sean reubicados a un arrecife con menor calidad ambiental (La Boquita).

#### 1.4. Objetivo general

Evaluar la respuesta fisiológica y transcriptómica en corales *P. verrucosa* de morfologías verde y café, en una comunidad coralina relativamente sana, antes y después de ser reubicados bajo diferentes profundidades en el mismo ambiente y en un arrecife severamente impactado.

##### 1.4.1. Objetivos particulares

4. Caracterizar la respuesta fisiológica de dos morfologías de coral *P. verrucosa* durante un ciclo de 24 horas usando indicadores como la densidad de células de endosimbionte, concentración de Chl *a*, MAAs y FPs.
5. Evaluar la respuesta ante el estrés oxidativo de estos corales en diferentes ambientes durante 24 horas usando indicadores moleculares como la lipoperoxidación (MDA-TBARS) y capacidad antioxidante total.
6. Evaluar la expresión diferencial de genes de ambas morfologías en los dos ambientes.
7. Analizar estos indicadores en busca de patrones asociados a las posibles diferencias en la respuesta fisiológica de ambas morfologías.

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1. Sitio de estudio

Las localidades de estudio se ubican en la zona costera del Puerto de Manzanillo, Colima; en la región encontramos dos comunidades arrecifales con diferente historial ambiental. La primera se refiere al arrecife denominado Carrizales, el cual se localiza en la Bahía Cenicero donde permanece relativamente aislado de las actividades humanas. La segunda comunidad es la del arrecife denominado La Boquita y se encuentra en la Bahía de Santiago. Este arrecife presenta un estado de estrés agudo debido a la presión antropogénica causada por su cercanía a una de las playas más concurridas además de su proximidad a la desembocadura artificial de la laguna de Juluapan (Figura 3).

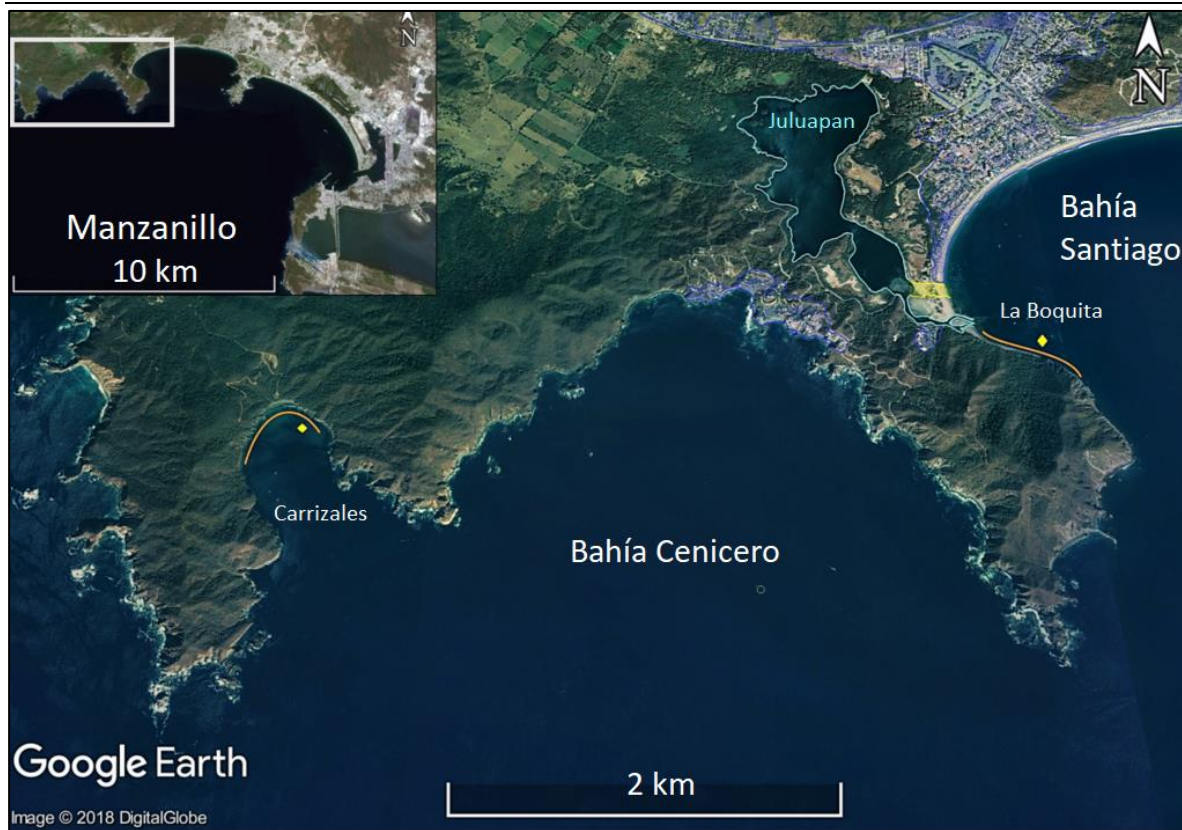


Figura 4. Sitio de estudio en Manzanillo, Colima. México. Arrecife de Carrizales ( $19.09^{\circ}$  N,  $104.44^{\circ}$  W) en la Bahía Cenicero. Arrecife de La Boquita ( $19^{\circ}12.25'N$ ,  $104^{\circ}28.52'W$ ) en la Bahía Santiago. En el mapa se delimita la cota de la Laguna de Juluapan con una línea azul y la antigua desembocadura en color amarillo. Las zonas urbanas se resaltan en color púrpura. Los puntos de muestreo están señalados por etiquetas amarillas.

## 2.2. Toma de Muestras

El día 17 de mayo de 2017 se localizaron en el arrecife de Carrizales a una profundidad de 7 m. dos colonias sanas de corales *P. verrucosa*, una de morfología verde fluorescente y otra de morfología café no fluorescente (Figura 3). Las colonias coralinas fueron seleccionadas tomando en cuenta su aspecto y saturación de color, excluyendo aquellas que presentaran blanqueamiento parcial y organismos con epibiontes asociados.

Inicialmente ( $T_0$ -control, 9:00 am), mediante buceo autónomo se tomó una muestra de 2 cm<sup>2</sup> de ambas morfologías y se almacenaron en 10 ml de RNA lather para realizar los análisis de transcriptómica (muestra A). Así mismo, se tomaron 4 cm<sup>2</sup> de ambos morfotipos para análisis fisiológicos (muestra B), las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para asegurar su preservación. Una vez realizada la toma de un total de ocho muestras (A+B), se fraccionaron cuidadosamente ambas colonias en cuatro partes para reubicar tres cuartas partes.

Una fracción de cada colonia fue reubicada a 2m de profundidad en Carrizales, mientras que los tres fragmentos restantes permanecieron en el sitio original a 7m de profundidad en el mismo arrecife de Carrizales. Una vez que se llevó a cabo la reubicación, se realizaron los siguientes muestreos ( $T_1$ -cenit; 2:00 pm,  $T_2$ -ocaso; 8:00 pm,  $T_3$ -medianoche; 12:00 am;  $T_4$ -amanecer; 8:00 am) entre los días 17 y 18 de mayo en ambos sitios de Carrizales (7m y 2m), obteniendo un total de 18 muestras de RNA y 18 para análisis fisiológicos.

Los fragmentos restantes de ambos morfotipos fueron reubicados el día 19 de mayo en el arrecife de La Boquita a profundidades de 2 y 7m y se replicó el sistema de obtención de muestras anteriormente descrito. Obteniendo 16 muestras de RNA y 16 para análisis fisiológicos. De esta manera, se tomaron 34 muestras de RNA y 34 para análisis fisiológicos pertenecientes a dos morfotipos de corales *P. verrucosa* ubicados a dos profundidades distintas en dos comunidades con presiones ambientales diferentes.

## 2.3. Análisis Fisiológicos Moleculares

### 2.3.1. Extracción y separación de los tejidos del holobionte

Para remover el tejido del esqueleto calcáreo del coral se empleó una adaptación del método de Palmer et al. (2009). El tejido del holobionte fue removido del esqueleto calcáreo dentro de una bolsa de plástico empleando aire comprimido y 4 ml de buffer de fosfatos (50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1mM EDTA, pH 8.1). Una vez extraído el tejido, se depositó la mayor cantidad posible en dos microtubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 5,000 RPM por 5 min a 4°C, en una centrifuga Eppendorf Modelo 5424R (USA), con el fin de separar el tejido del cnidario y del endosimbionte. El tejido del cnidario en la fracción superior se colocó en un nuevo tubo eppendorf y se sonicó durante 15 segundos a una amplitud de 80% con un sonicador para lograr la lisis celular. Las muestras con la solución de fosfatos y del tejido del pólipo fueron almacenadas a -80°C para análisis posteriores.

Siguiendo el protocolo de (Zamoum et al. 2012), el tejido del endosimbionte en el pellet fue sometido a un tratamiento de NaOH, 4M durante 24 horas a 4°C para eliminar restos del tejido del cnidario. Una vez concluido el periodo, las muestras se centrifugaron a 5,000 RPM por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante, posteriormente, el pellet se resuspendió en 1 ml de buffer de fosfatos (50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1mM EDTA, pH 8.1) y se centrifugaron a 5,000 RPM por 5 min a 4°C. Este proceso se repitió dos veces con el fin de retirar los residuos de NaOH. Después de lavar las muestras de tejido del endosimbionte, éstas se resuspendieron en 1 ml del buffer de fosfatos (50mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 50mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1mM EDTA, pH 8.1). En este punto se obtuvieron las células del endosimbionte sin restos del tejido del cnidario. Se separaron 500 µl de esta dilución en otro tubo eppendorf, se centrifugaron a 5,000 RPM por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se fijaron con formol al 1% para posteriormente realizar el conteo celular. Los 500 µl restantes de la dilución se sonicaron durante 15 segundos a una amplitud de 80% con un sonicador para provocar la lisis celular. Las muestras con la solución de fosfatos y del tejido del endosimbionte fueron almacenadas a -80°C para análisis posteriores.

### 2.3.2. Peso seco del tejido

Para este análisis se usaron las muestras que contienen el extracto homogenizado del tejido del cnidario y el endosimbionte. Para determinar el peso seco, se rotuló un microtubo para cada muestra, cada microtubo fue pesado tres veces previamente con una balanza analítica. Posteriormente, en cada microtubo se depositó 1ml de muestra y cada microtubo fue pesado tres veces. Los tubos fueron colocados en un horno a 65°C durante 24 horas. Una vez concluido este tiempo, los microtubos fueron pesados nuevamente en tres ocasiones se restó el peso del tubo rotulado para determinar el peso seco del tejido. Estos datos se usaron para normalizar los datos de proteína total.

### 2.3.3. Cuantificación de proteína total

Se tomaron 10 µl de todas las muestras del cnidario y del endosimbionte para la determinación de proteínas mediante el kit *Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Kit* (No. Cat. 23236) de *Thermo Scientific* (USA). Éste es una modificación del método Bradford para la cuantificación de las proteínas totales en una microplacas de 96 pocillos. Se utilizó albúmina diluida (BSA) para realizar una curva estándar y como diluyente buffer de homogenización (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, pH 8.1), adicionando a cada pozo 250 µl del “Comassie Reagent”, *Thermo Scientific* (USA). Posteriormente, se midió la absorbancia a 590 nm, restando el blanco a los demás puntos de la curva y a las muestras.

### 2.3.4. Chl *a*

La determinación de la Chl *a* de los organismos de *P. verrucosa* se realizó mediante una modificación de la metodología propuesta por Henriques y colaboradores (2007). Se midieron 2 cm<sup>2</sup> de coral para remover el tejido con aire comprimido y 10 ml de agua de mar filtrada y esterilizada (AMFE). La muestra obtenida se pasó por una malla de 300 µm y se aforó a 30 ml con

AMFE. Se tomaron duplicados de 10 ml por muestra para la determinación de Chl *a*. Los duplicados se sonicaron durante 2 segundos mediante 3 pulsos, para ayudar a la lisis celular. A continuación, fueron centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido en metanol grado HPLC al 100 % e incubado en oscuridad durante 24 horas. Henriques et al. (2011) reportaron que la extracción con metanol es más efectiva que la realizada con acetona. Pasado este periodo se realizó una centrifugación a 3000 RPM durante 10 minutos. El sobrenadante fue leído por triplicado a 300 – 750 nm mediante un lector de microplacas BioTek Modelo Epoch (USA). Se utilizó la fórmula propuesta por Lichtenthaler y Wellburn (1983) para la determinación de la concentración de Chl *a*.

#### 2.3.5. Densidad de células del endosimbionte

Para evaluar el posible cambio en la densidad de células de endosimbionte o densidad zooxantelar en ambas morfologías de los dos sitios durante el tiempo de muestreo. Se utilizaron 60  $\mu$ l de la solución de fosfatos que contenían el tejido del endosimbionte. Se cuantificó el contenido de células en la solución mediante un hematocitómetro o cámara Neubauer (n=8 duplicados). Después de hacer las correcciones del volumen y de estimar la superficie de área del coral, la densidad de los dinoflagelados simbióticos fue expresada como número de células por área.

#### 2.3.6. Aminoácidos tipo Micosporina (MAAs)

Se determinó la concentración de MAAs usando el protocolo de Shick et al. (1999) con pequeñas modificaciones. Se mezcló 1 ml de extracto coralino y 5 ml de metanol grado reactivo, y se dejó en reposo durante 24 horas a 4 °C. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 10000 RPM. Para inferir la concentración de MAAS, el sobrenadante se sometió a un barrido espectrofotométrico (200-700nm) en un lector de microplacas Multiskan GO 1.00.40 (USA). La

cuantificación de los MAAs se evaluó a partir del pico de mayor absorbancia (320nm), utilizando el coeficiente de extinción molar de 36,200 reportado por Carignan et al. (2009), el cual pertenece a la palitina (MAAS más abundante en *Pocillopora* sp) y se normalizó a la proteína soluble.

### 2.3.7. Proteínas Fluorescentes (FPs)

La purificación de la FPs se realizó mediante extracción etanólica desarrollada por Samarkina et al. (2009) con algunas modificaciones. Con esta técnica se obtuvo la separación de una fase soluble, una fase orgánica y finalmente las FPs. Se mezclaron 250 µl de la solución con el tejido coralino con 1 ml de buffer de sonicación (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH7.8). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13,000 RPM durante 15 minutos. De esta manera se obtuvo la fase soluble en la parte superior (súpernadante). Para obtener la fase orgánica, se utilizó 1 ml de la fase soluble y 1.2 ml etanol 96%, se agitó vigorosamente usando un vórtex durante 30 segundos. A continuación, se realizó una centrifugación a 3000 g durante 7 minutos. En esta etapa de la extracción, se extrajo cuidadosamente la fase superficial que contenía las FPs, se agregó 5 ml de n-Butanol y se agitó vigorosamente usando un vórtex durante 30 segundos. Se realizó una tercera centrifugación a 3000 g durante 7 minutos para decantar la fase orgánica que contiene las FPs y se descartó la fase superficial. Para inferir la concentración de FPs, la solución resultante se sometió a un barrido espectrofotométrico (300-500nm) en un lector de microplacas Multiskan GO 1.00.40 (USA). La cuantificación FPs se evaluó a partir del pico de mayor absorbancia (445nm), utilizando el coeficiente de extinción molar reportado para las GFPs.

## 2.4. Indicadores de estrés oxidativo

### 2.4.1. Daño celular MDA (TBARS)

Se determinó el grado de daño celular mediante el kit TBARS (No. Cat. 10009055, Cayman's Chemical Company, USA) diseñado para la estimación del malondialdehído (MDA), un producto



natural de la lipoperoxidación. El kit se basa en la estimación de las Sustancias Reactivas de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) mediante la cuantificación del aducto MDA-TBA formado por la reacción entre el MDA y el ácido tiobarbitúrico (TBA) a altas temperaturas (90-100 °C), con una relación de 1:2 entre las dos moléculas

Esta reacción fue medida colorimétricamente en condiciones ácidas, mediante la determinación de la absorbancia de la muestra a 540 nm en un lector de microplacas Multiskan GO 1.00.40 (USA). Se evaluaron las concentraciones en las muestras empleando la ecuación de la recta usando una curva estándar de MDA.

#### 2.4.2. Capacidad Antioxidante total (Aox)

La capacidad antioxidante total se estimó mediante el kit Antioxidant Assay de Cayman's Chemical Company No Cat. 709001 (USA). Este ensayo colorimétrico se fundamenta en la capacidad que exhiben los antioxidantes en una muestra de tejido para inhibir la oxidación de ABTS<sup>®</sup> (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) por acción de la metamioglobina. La capacidad de los antioxidantes en la muestra para prevenir la oxidación del ABTS<sup>®</sup> se compara con la del antioxidante Trolox, un análogo de tocoferol soluble en agua. La cantidad de ABTS<sup>®</sup> producido se determinó mediante la lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas Multiskan GO 1.00.40 (USA) y se cuantificó como antioxidantes equivalentes molares de Trolox (Miller et al. 1993; Rice-Evans y Miller 1994).

### 2.5. Análisis Genómicos

#### 2.5.1. Extracción de RNA

Se homogenizaron 100 mg de muestra de coral con 100 mg de perlas (SIGMA Glass beads, acid washed, 425-600 µm) y 1 ml de Tri-reagent (SIGMA) a 6 m/sec durante 40 segundos repitiendo la

acción tres veces. El contacto entre el Tri-reagent y el carbonato cálcico remanente del esqueleto coralino genera un pH básico, lo cual puede dificultar la extracción de los ácidos nucleicos. Para ajustar los valores de pH, se utilizó entre 1 y 5  $\mu\text{l}$  de HCl 6M para generar un medio con pH 4.5. Se utilizó el protocolo de Tri-reagent, en el cual la fase orgánica fue almacenada a 4 °C durante 12 horas para la extracción de DNA. La fase acuosa, fue purificada mediante una columna eliminadora de DNA genómico (RNeasy Plus Mini Kit, Quiagen) para evitar la presencia de DNA residual en pasos posteriores. La columna se centrifugó y al flujo continuo se le añadieron 350  $\mu\text{l}$  de etanol al 70 %.

A continuación, esta solución se limpió usando una columna de limpieza RNAeasy mediante la adición de los Buffer RW1 y Buffer RPE. Finalmente, a todas las muestras se les añadió 30  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNAasa esperando 1 min para la completa absorción del líquido y se centrifugaron a 10000 rpm durante 1 min. Para cuantificar la concentración de RNA de cada extracción se usó un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific®). La calidad del RNA se determinó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y el Bioanalyzer 2100 (USA) (Chomczynski 1987).

### 2.5.2. Análisis RNA Seq

Para registrar la expresión diferencial en ambas morfologías de *P. verrucosa* en los dos ambientes, las muestras de tejido en RNA later y 5  $\mu\text{g}$  de RNA total (200  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) de los organismos de 2 y 7 m del tiempo  $T_1$  (cenit) se enviaron a secuenciar usando el sistema HiSeq 2500 (300 millones de Reads) a la empresa The Center for Aquaculture Technologies en San Diego, CA, USA. Debido a que el objetivo fue determinar diferencias entre ambas morfologías, se agruparon las muestras de los corales verdes de 2 y 7 m en una sola librería para cada ambiente, al igual que en el caso del coral café. De esta manera que se obtuvieron 4 librerías Forward y 4 librerías Reverse, correspondientes a CV (Carrizales Verde), BV (Boquita Verde), CC (Carrizales Café) y BC (Boquita Café).

A pesar de que se trabajó con el transcriptoma completo, en este trabajo únicamente nos enfocamos en la búsqueda de la expresión de ciertos genes de interés. Posteriormente, se determinó la calidad de las lecturas obtenidas mediante el software FastQC. Las lecturas de baja calidad fueron descartadas con el software Trimmomatic (Bolger et al. 2014). Las lecturas restantes para ambas morfologías fueron incluidas en un sólo archivo para el ensamblaje de un transcriptoma común. Los transcriptomas fueron ensamblados usando el software Trinity (Grabherr et al. 2013). Una vez que se obtuvieron los tres ensamblajes, los transcriptomas se usaron para buscar homologías utilizando el software Blastx en las bases de datos de péptidos Uniprot-Swissprot (Altschul et al. 1990). Se aceptaron las homologías con valores de  $E < 10^{-15}$ , en el caso de *Symbiodinium*, y  $E < 10^{-10}$  para el pólipo. La ontología de los genes homólogos (OG) así como su anotación funcional fueron obtenidas utilizando el software Blast2GO (Götz et al. 2008). Lo anterior, para darle una anotación a las secuencias y encontrar homologías con los genes de interés: GFP-like protein (GFP), Photosystem II protein D1 (psbA), Calpain-9 (Capn9), Peroxidase-like protein (PXDNL), Catalase (CAT), Gamma-glutamyltranspeptidase 1 (GGT 1), Epididymal secretory glutathione peroxidase (GPX5), Glutathione S-transferase (GST) y Glutathione synthetase (GSH). El análisis de expresión diferencial entre los transcritos de ambas morfologías ( $P < 0.05$  y magnitud de cambio  $> 2$ ) y la generación de gráficas para comparar los patrones de expresión “heatmaps” se realizaron utilizando el paquete edgeR (Robinson et al. 2009) del software R (R Development Core Team, 2008), siguiendo el script diseñado para datos sin replica, incluido en la paquetería adicional del software Trinity. No se tomaron en cuenta los transcritos con magnitudes de cambio  $< 2$ .

## 2.6 Análisis estadístico

Los resultados de los análisis fisiológicos son presentados como medias  $\pm$  error estándar. Los datos fueron evaluados por medio de pruebas de normalidad, homocedasticidad mediante las pruebas C de Cochran, Hartley y Bartlett con un 95% de confianza. Las diferencias entre los valores medios fueron examinadas usando la prueba de Kruskal-Wallis, y U de Mann Whitney equivalente no paramétrico al análisis de varianza (ANOVA), y comparaciones simples/parejas

fueron empleadas para evaluar las diferencias entre los tratamientos. Las diferencias fueron reportadas como estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$ . En el caso de las correlaciones, se realizaron transformaciones logarítmicas a los datos, convirtiéndolos nuevamente para su presentación en caso de ser necesario. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software Statistics® 10 (StatSft, Inc. Tulsa, Oklahoma, USA).

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1. Indicadores fisiológicos

#### 3.1.1. Chl *a*

Las concentraciones promedio de Chl-*a* de las dos morfologías de *P. verrucosa* de Carrizales y el de La Boquita fueron  $1.04 \pm 0.14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y  $0.94 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente. Se registró un máximo de  $2.37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y un mínimo de  $0.236 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.5$ ) reveló que no existen diferencias significativas en las concentraciones promedio de Chl-*a* de ambas morfologías agrupadas por comunidad. Observando los datos agrupados en función de la morfología, encontramos que el valor máximo de clorofila fue de  $2.15 \text{ } 14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para el fenotipo verde y  $2.37$  para el café. Del mismo modo, el mínimo registrado fue de  $0.3 \text{ } 14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para el verde y  $0.2314 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  en el café. La prueba U de Mann Whitney reveló que no existen diferencias significativas ( $p=0.9$ ) en la concentración de Chl-*a* entre ambas morfologías sin tener en cuenta la localización después de ser reubicadas en los distintos puntos de las dos comunidades. De igual manera, al usar la prueba Kruskal Wallis no encontramos diferencias significativas ( $p=0.6$ ) en las concentraciones de Chl-*a* entre ambas morfologías. El cambio en la concentración de Chl *a* través del tiempo presentó tendencias diferentes entre las dos morfologías. El fenotipo verde (Figura 4-A) presentó un nivel más elevado de clorofila ( $1.39 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) en el tiempo inicial ( $T_0$ -control, 1: 00 pm) con respecto al fenotipo café ( $0.82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (Figura 4-B). La morfología verde que presentó una disminución en los niveles de clorofila de forma regular entre los cuatro puntos de muestreo, alcanzando un mínimo de  $0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  a medianoche ( $T_3$ - 1:00 am) seguido de un incremento para el amanecer ( $T_4$ -8:30 am) que se vio acentuado en los organismos de Carrizales de ambas profundidades y en coral de La Boquita de 2 m, mientras que el coral situado a 7 m permaneció con niveles similares al registrado en medianoche. El coral con morfología café presentó un patrón contrastante en comparación a la morfología verde. Registrando una concentración de  $0.82 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  en el tiempo inicial ( $T_0$ -control, 1:30 pm) y un máximo de  $2.36 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  al ocaso ( $T_2$ - 7:30 pm). Esta elevación de la concentración disminuyó a media noche en todos los corales cafés, salvo en el coral de 7m de La Boquita, el cual mantuvieron una concentración cercana al  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  hasta el amanecer ( $T_4$ - 8:30 am) donde se

registró el mínimo de  $0.22 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

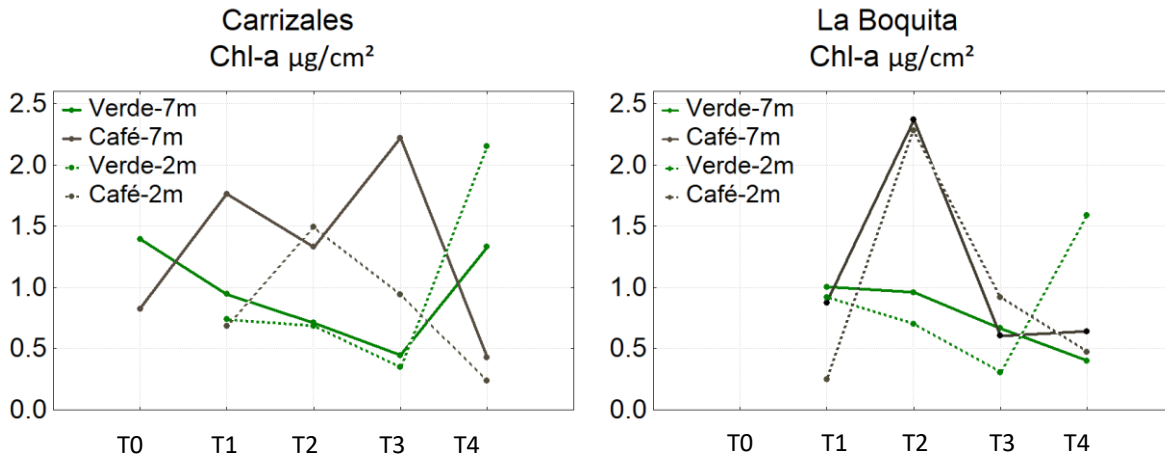


Figura 5. A) Concentraciones de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de *P. verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de *P. verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran las concentraciones de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

### 3.1.2. Densidad de endosimbionte

El contenido de células del endosimbionte en las dos morfologías de *P. verrucosa* del arrecife de Carrizales y el de La Boquita presentaron un promedio de  $20,038,905 \pm 2474575$  células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  y  $20,623,258 \pm 2463042$  células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$ , respectivamente. Se registró un máximo de  $47,427,619$  células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  y un mínimo de  $8,444,834$  células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$ . La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.9$ ) reveló que no existen diferencias significativas en la cantidad de células del simbiote de ambas morfologías agrupadas por comunidad. Observando los datos agrupados en función a la morfología encontramos que el valor máximo de células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  fue de  $395,813$  para el fenotipo café y  $229,890$  para el verde. Del mismo modo, el mínimo registrado fue  $12,732$  células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  de para el verde y  $24,385$  células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  en el café. La prueba U de Mann Whitney reveló que no existen diferencias significativas ( $p=0.054$ ) en la cantidad de células del simbiote por miligramo de proteína total entre ambas morfologías sin tener en cuenta la localización después de ser reubicadas en los distintos puntos de las dos comunidades. De igual manera, al usar la prueba Kruskal Wallis se encontraron

diferencias significativas ( $p=0.9$ ) en la cantidad de células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  entre ambas morfologías de cada ubicación. Los cambios en las cantidades de células del simbiote a través del tiempo presentaron tendencias diferentes entre las dos morfologías. La morfología café (Figura 5-B) presentó un nivel más elevado de células (474,276 células/mg proteína total) en el tiempo inicial ( $T_0$ -control, 9:00 am) con respecto al fenotipo verde (356,788 células/mg proteína total) (Figura 5-A). El coral de morfología café presentó un patrón diferente en las cantidades de células del simbiote con respecto al coral de morfología verde. Ambos corales registraron niveles máximos al inicio del muestreo, pero la morfología verde presentó una disminución para el tiempo final del muestreo. Por otro lado, la coloración café mantuvo sus niveles de células

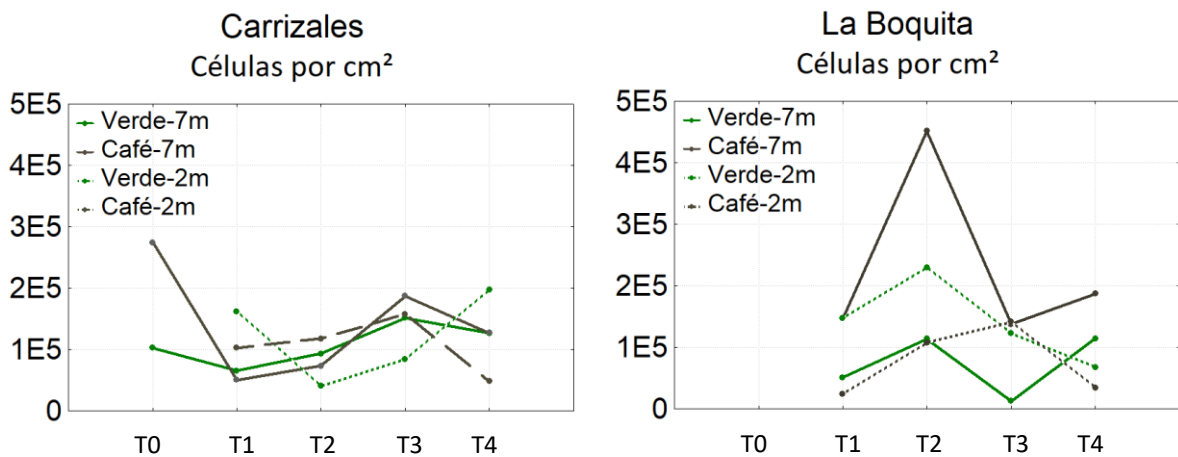


Figura 6. A) Densidad de células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  de *P. verrucosa* morfología verde. B) y *P. verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran la Densidad de células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$ .

simbióticas de manera regular durante todo el periodo.

### 3.1.3 Proteínas Fluorescentes

Las concentraciones promedio de FPs de las dos morfologías de *P. verrucosa* del arrecife de Carrizales y el de La Boquita fueron del  $1.2\% \pm 0.1$  y  $1.5\% \pm 0.3$  de la proteína total, respectivamente. Se registró un máximo de 4% y un mínimo de 0.3% de FPs respecto a la proteína total. La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.4$ ) reveló que no existen diferencias significativas en las concentraciones promedio de FPs de ambas morfologías agrupadas por comunidad. Observando

los datos agrupados en función de la morfología encontramos que el valor máximo de FPs fue de 3.07% para el fenotipo verde y 4.16% para el café. Del mismo modo, el mínimo registrado fue de 0.07% para el verde y 0.30% en el café. La prueba U de Mann Whitney reveló que si existen diferencias significativas ( $p=0.04$ ) en la concentración de FPs entre ambas morfologías sin tener en cuenta la localización después de ser reubicadas en los distintos puntos de las dos comunidades. (Figura 6). Por otro lado, al usar la prueba Kruskal Wallis no encontramos diferencias significativas ( $p=0.2$ ) en las concentraciones de FPs entre ambas morfologías.

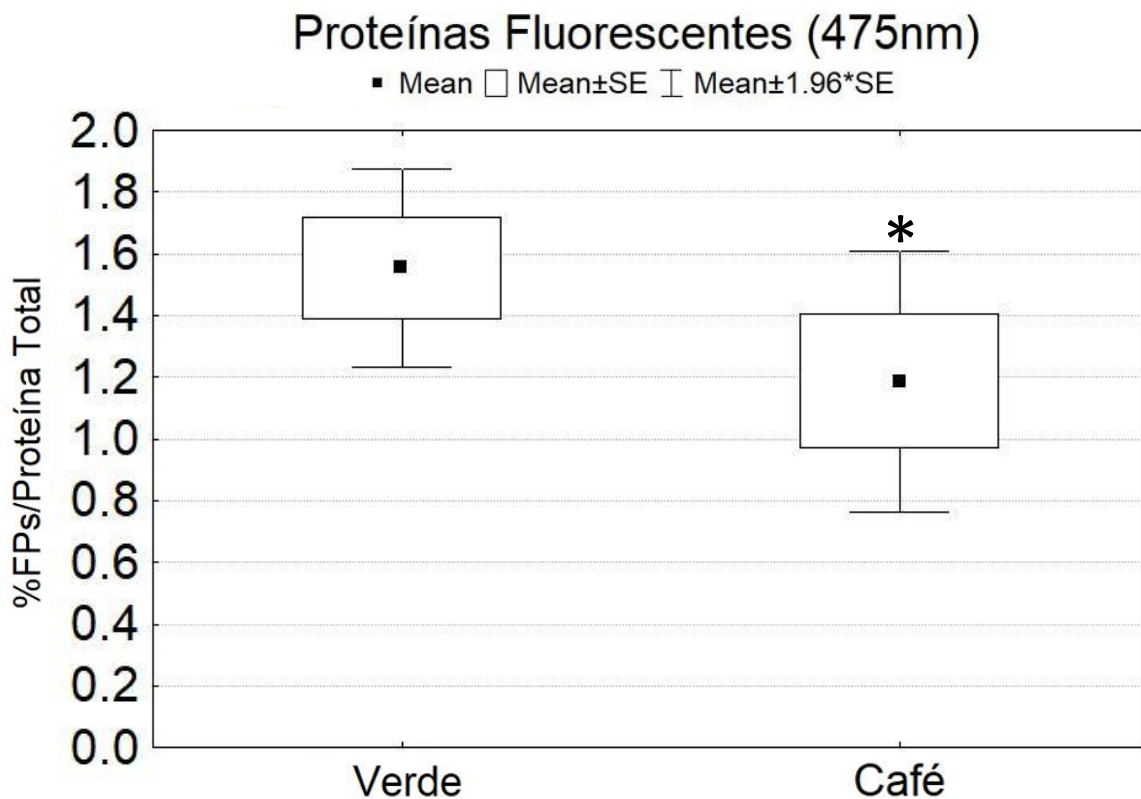


Figura 7. Concentraciones promedio de FPs (mg/mg de proteína total) de ambas morfologías de *P. verrucosa* expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos ( $n=16$ ). Las concentraciones son estadísticamente diferentes ( $p=0.04$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney.



El cambio en la concentración de las FPs a través del tiempo presentó tendencias diferentes entre las dos morfologías. La morfología verde (Figura 7-A) mantiene relativamente altos los niveles de FPs de forma regular entre los cuatro puntos de muestreo a lo largo del día, con respecto al café. Además, estos corales presentaron una elevación considerable a medianoche. En el caso de la morfología café (Figura 7-B), el cambio en la concentración de las FPs a través del periodo de muestreo presentó un patrón similar al coral de morfología verde, pero más atenuado, registrando una mínima de 0.30% al amanecer (T<sub>4</sub>- 8:30 am) en el organismo de La Boquita a 7m de profundidad. Por otro lado, en esta misma morfología, pero situada a 2 m de la misma colonia coralina, al mismo tiempo que se registró la mínima concentración de MDA (T<sub>4</sub>- 8:30 am), se registró el nivel máximo concentración de FPs con 4.16% de la proteína total.

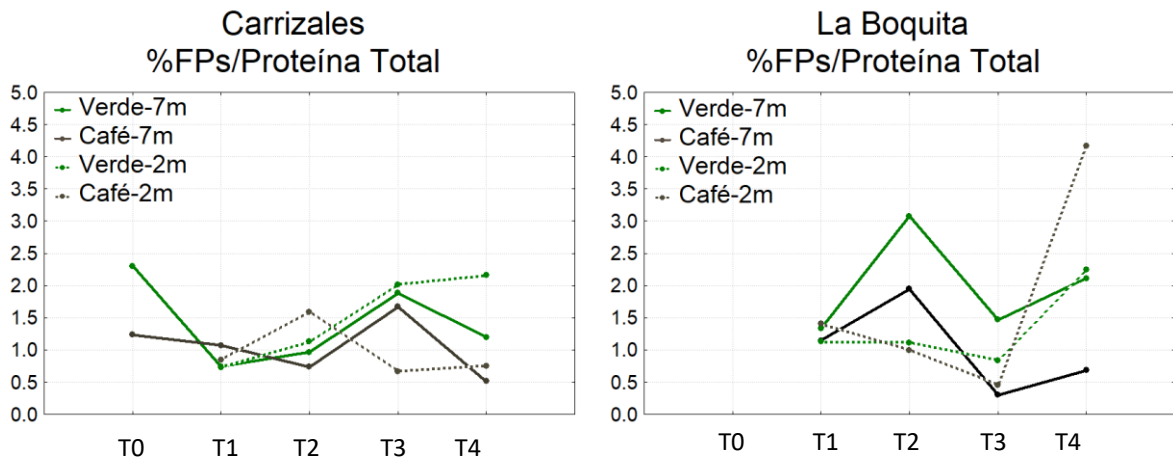


Figura 8. A) Concentraciones promedio de FPs (mg/mg de proteína total) de *P. verrucosa* morfología verde. B) y de *P. verrucosa* con morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran el porcentaje de FPs del total de proteína.

#### 3.1.4. Aminoácidos tipo Micosporina (MAAs)

Las concentraciones promedio de MAAs de *P. verrucosa* del arrecife de Carrizales fue de  $1182.64 \pm 138$  pmol/mg de proteína y en La Boquita de  $1000.47 \pm 113$  pmol/mg de proteína. La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.1$ ) reveló que no existen diferencias significativas en las concentraciones promedio de MAAs entre estas comunidades. El nivel máximo de MAAs fue de

2289.41  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína y el mínimo de 335.425  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína. La prueba Kruskal Wallis ( $p=0.5$ ) reveló que no existen diferencias significativas en las concentraciones de MAAs de ambas morfologías agrupadas por comunidad. La prueba U de Mann Whitney reveló que no existen diferencias significativas ( $p=0.2$ ) en la concentración de MAAs entre ambas morfologías. El valor máximo de MAAs para el fenotipo verde fue de 2166.08  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína, mientras que el café presentó una concentración máxima de 2289.41  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína. Los valores mínimos fueron de 426.898  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína para el verde y 335.425  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína para el café. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de MAAs al comparar las dos comunidades ( $p=0.3$ ).

El cambio en la concentración de MAAs a través del tiempo presentó tendencias diferentes entre las dos morfologías. La morfología verde presentó un nivel más elevado de MAAs en (1773.85  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) en el tiempo inicial (To-control, 9:00 am) con respecto al fenotipo café (763.40  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína). La morfología verde (Figura 8-A) mantiene los niveles de MAAs de forma regular entre los cuatro puntos de muestreo a lo largo del día. Se registraron dos veces valores por debajo de 500  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína para el coral verde a diferentes horas, uno para el coral Carrizales a 7m (426.89  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) en el cenit (T1- 3:00 pm) y otro para el coral de La Boquita a 7m (466.69  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) a la medianoche (T3- 1:30 am). El coral de morfología café (Figura 8-B) presentó un patrón diferente al coral de morfología verde. Registrando una concentración de (763.40  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) en el tiempo inicial (To-control,

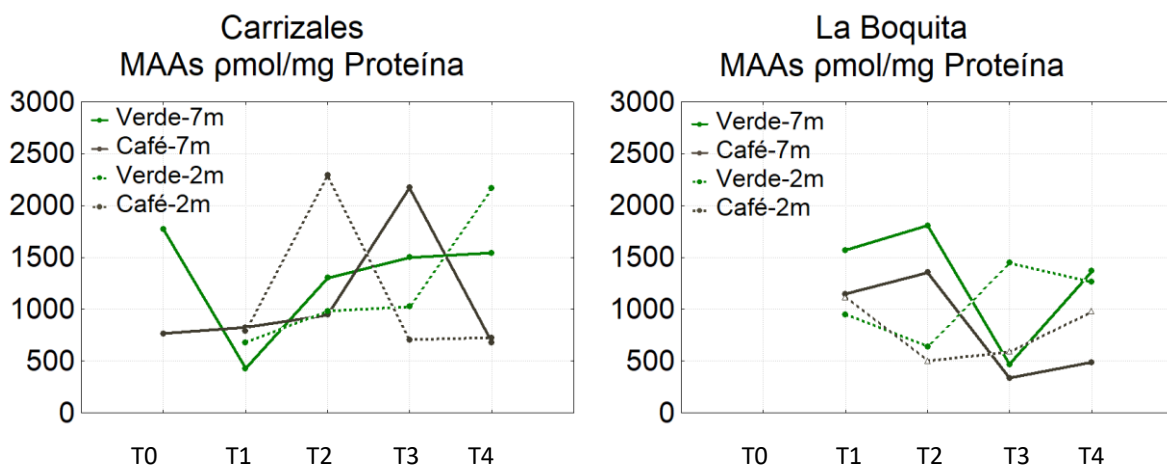


Figura 9. A) Concentraciones de MAAs ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) de *P. verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MAAs ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) de *P. verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran las concentraciones de MAAs ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína).

1.30 pm) y un máximo de 2289.41 pmol/mg de proteína al ocaso (T2- 7:30 pm) en el coral ubicado en Carrizales a 2m. Esta elevación de la concentración disminuye al amanecer para los corales cafés salvo el coral de 2m de La Boquita, el cual elevó su concentración.

### 3.2. Indicadores de estrés oxidativo

#### 3.2.1. Capacidad antioxidante total en endosimbionte

La capacidad antioxidante total del endosimbionte de *P. verrucosa* del arrecife de Carrizales y el de La Boquita fueron de  $3351.30 \pm 347.3$  mM / mg de proteína total y  $4726.08 \pm 888.99$  mM / mg de proteína total, respectivamente. La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.1$ ) reveló que no existen diferencias significativas en la capacidad antioxidante total entre ambas comunidades. Por otro lado, la prueba Kruskal Wallis reveló que no existen diferencias significativas en la capacidad antioxidante total ( $p=0.5$ ) entre ambas morfologías cuando son reubicadas en las dos comunidades. De igual manera, no encontramos diferencias significativas en capacidad antioxidante total al agrupar los datos de ambas morfologías de dos profundidades de cada comunidad coralina ( $p=0.3$ ). El nivel máximo de la capacidad antioxidante total del endosimbionte fue de 15752.05 mM / mg de proteína total y el mínimo de 1229.23 mM / mg de proteína total.

El cambio en el nivel de la capacidad antioxidante en el tejido del endosimbionte a través del periodo de muestreo se mantuvo estable en todos los casos para el coral de morfología verde (Figura 9-A). El fragmento de coral colocado a 7m en La Boquita presentó un máximo en la capacidad antioxidante de 8965.87 mM / mg de proteína total a medianoche (T3- 1:00 am). El valor mínimo de la capacidad antioxidante que presentó esta morfología fue de 1267.55 mM / mg de proteína total en el organismo situado a 7m de profundidad en Carrizales en el cenit (T1- 3:30 pm). En el caso de la morfología café (Figura 9-B), el cambio en el nivel de la capacidad antioxidante a través del periodo de muestreo presentó un patrón similar al verde, registrando una mínima de 1246.04 mM / mg de proteína total al amanecer (T4- 8:30 am) en el organismo de La Boquita a 7m de profundidad.

Por otro lado, en esta misma morfología, pero situada a 2 m de la misma colonia coralina, al mismo tiempo que se registró la mínima concentración de antioxidantes (T4- 8:30 am), se registró el nivel máximo de antioxidantes con 15752.05 mM / mg de proteína total.

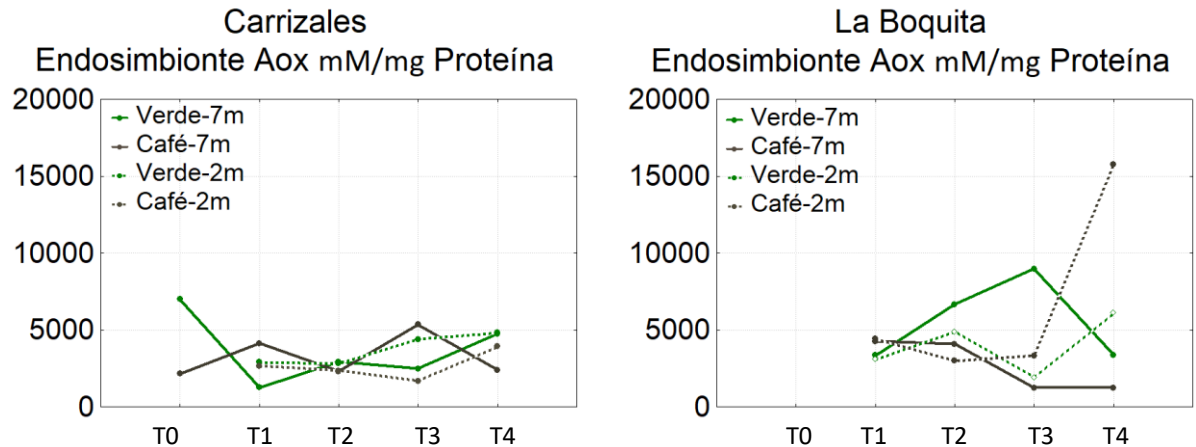


Figura 10. A) Capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del endosimbionte de *P. verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de antioxidantes totales (mM por mg de proteína) del endosimbionte de *P. verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran las concentraciones de antioxidantes totales del endosimbionte.

### 3.2.2. Lipoperoxidación (MDA) en el Endosimbionte

El daño celular que fue inferido a partir de la concentración de MDA en el endosimbionte de *P. verrucosa*, presentó un promedio de  $0.20 \pm 0.02 \mu\text{M}$  por mg de proteína total para los organismos de Carrizales ( $n=16$ ) y  $0.28 \pm 0.05 \mu\text{M}$  por mg de proteína total para los de La Boquita ( $n=16$ ). La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.2$ ) reveló que no existen diferencias significativas en concentración promedio de MDA en el endosimbionte entre ambas comunidades. Así mismo, no se encontraron diferencias significativas en concentración promedio de MDA en el endosimbionte al agrupar los datos respecto a ambas morfologías sin importar la comunidad coralina ( $p=0.1$ ). De igual manera, no encontramos diferencias significativas en la concentración promedio de MDA en el endosimbionte al agrupar ambas morfologías respecto a las dos comunidades coralinas ( $p=0.1$ ). La concentración de MDA en el endosimbionte a través del tiempo de muestreo se mantuvo relativamente estable en todos los casos para el coral de morfología verde (Figura 10-A). El fragmento de coral colocado a 7m de profundidad en La Boquita presentó su nivel máximo de MDA, con  $0.51 \mu\text{M}$  por mg de proteína total durante la medianoche (T3- 1:00 am).

El valor mínimo de MD que presentó esta morfología fue de  $0.08 \mu\text{M}$  por mg de proteína total, registrado en el organismo situado a 7m de profundidad en Carrizales en el cenit (T1- 3:30 pm). En el caso de la morfología café (Figura 10-B), el cambio en la concentración de MDA a través del periodo de muestreo presentó un patrón similar al coral de morfología verde, registrando una mínima de  $0.07 \mu\text{M}$  por mg de proteína total al amanecer (T4- 8:30 am) en el organismo de La Boquita a 7m de profundidad. Por otro lado, en esta misma morfología, pero situada a 2 m de la misma colonia coralina, al mismo tiempo que se registró la mínima concentración de MDA (T4- 8:30 am), se registró el nivel máximo de MDA de  $0.91 \mu\text{M}$  por mg de proteína total-3.2.3 Capacidad Antioxidante Total del Cnidario.

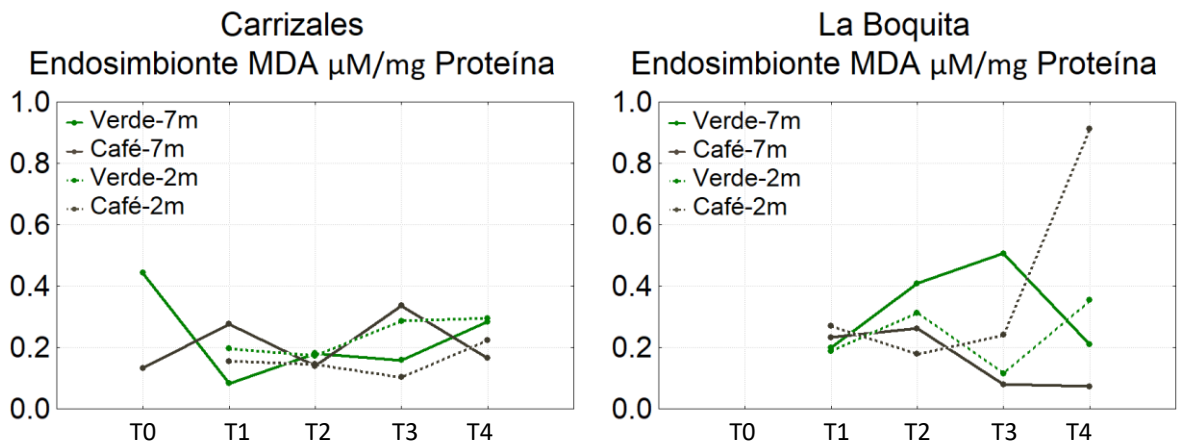


Figura 11. A) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *P. verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *P. verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran los puntos de muestreo. En el eje Z se muestran las concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo.

### 3.2.3. Capacidad Antioxidante Total del Cnidario

La capacidad antioxidante total del cnidario de *P. verrucosa* del arrecife de Carrizales y el de La Boquita fueron de  $8223.88 \pm 740.40 \text{ mM} / \text{mg}$  de proteína total y  $7879.55 \pm 626.03 \text{ mM} / \text{mg}$  de proteína total, respectivamente. La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.8$ ) reveló que no existen diferencias significativas en la capacidad antioxidante total entre ambas comunidades. Por otro lado, La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.1$ ) reveló que no existen diferencias significativas en la capacidad antioxidante total entre ambas morfologías cuando son reubicadas

en las dos comunidades. De igual manera, no encontramos diferencias significativas en capacidad antioxidante total al agrupar los datos de ambas morfologías de dos profundidades de cada comunidad coralina ( $p=0.1$ ). El nivel máximo de la capacidad antioxidante total del pólipos coralino fue de 16447.76 mM / mg de proteína total y el mínimo de 2732.850 mM / mg de proteína total. El cambio en el nivel de la capacidad antioxidante en el tejido del cnidario a través del periodo de muestreo presentó patrones diferentes entre ambas morfologías (Figura 11-A). El fragmento de coral colocado a 2m de profundidad en La Boquita presentó un máximo en la capacidad antioxidante de 10579.81 mM / mg de proteína total al amanecer (T4- 8:30 am). El valor mínimo de la capacidad antioxidante que presentó esta morfología fue de 2732.85 mM / mg de proteína total en el organismo situado a 2m de profundidad en Carrizales durante la medianoche (T<sub>3</sub>- 1:00 am). En el caso de la morfología café (Figura 11-B), el cambio en el nivel de

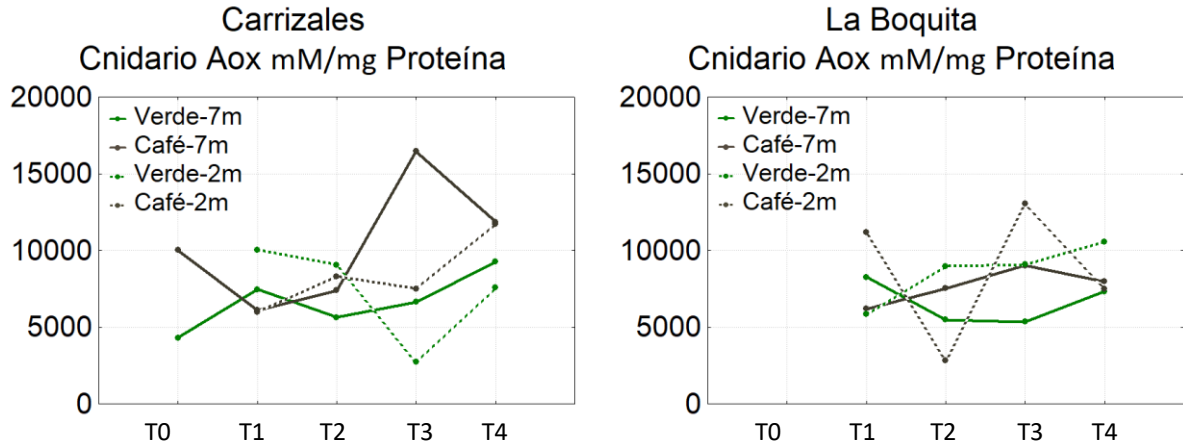


Figura 12. Grafica de malla 3D. A) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *P. verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *P. verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran los puntos de muestreo. En el eje Z se muestran las concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo.

la capacidad antioxidante a través del periodo de muestreo presentó un patrón similar al verde, registrando una mínima de 2823.66 mM / mg de proteína total al atardecer (T<sub>2</sub>- 7:30 pm) en el organismo de La Boquita a 2m de profundidad. En el organismo de La Boquita a 2m de profundidad, se registró el nivel máximo de antioxidantes con 13027.20 mM / mg de proteína total durante la medianoche.

### 3.2.4. Lipoperoxidación (MDA) en Cnidario

El daño celular que fue inferido a partir de la concentración de MDA en el tejido del pólipo coralino de *P. verrucosa*, presentó un promedio de  $0.20 \pm 0.02 \mu\text{M}$  por mg de proteína total para los organismos de Carrizales ( $n=16$ ) y  $0.30 \pm 0.04 \mu\text{M}$  por mg de proteína total para los de La Boquita ( $n=16$ ). La prueba U de Mann Whitney ( $p=0.1$ ) reveló que no existen diferencias significativas en concentración promedio de MDA en el tejido del pólipo de ambas comunidades. Así mismo, no se encontraron diferencias significativas en concentración promedio de MDA del pólipo al agrupar los datos respecto a ambas morfologías sin importar la comunidad coralina ( $p=0.5$ ). De igual manera, no encontramos diferencias significativas en la concentración promedio de MDA en el tejido del pólipo al agrupar ambas morfologías respecto a las dos comunidades coralinas ( $p=0.3$ ). La concentración de MDA en cnidario a través del tiempo de muestreo se mantuvo relativamente estable en todos los casos para el coral de morfología verde (Figura 12-A). El fragmento de coral colocado a 7m de profundidad en La Boquita presentó su nivel máximo de MDA, con  $0.51 \mu\text{M}$  por mg de proteína total durante la medianoche (T3- 1:00 am). El valor mínimo de MD que presentó esta morfología fue de  $0.08 \mu\text{M}$  por mg de proteína total, registrado en el organismo situado a 7m de profundidad en Carrizales en el cenit (T<sub>1</sub>- 3:30 pm). En el caso de la morfología café (Figura 12-B), el cambio en la concentración de MDA a través del periodo de muestreo presentó un patrón similar al coral de morfología verde, registrando una mínima de  $0.07 \mu\text{M}$  por mg de proteína total al amanecer (T<sub>4</sub>- 8:30 am) en el organismo de La Boquita a 7m

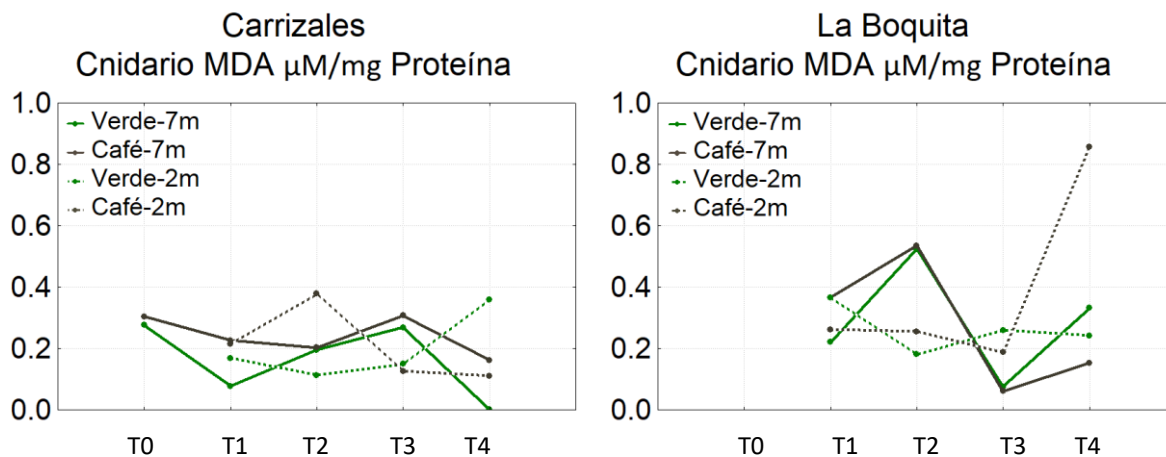


Figura 13. Grafica de malla 3D. A) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *P. verrucosa* morfología verde. B) Concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo de *P. verrucosa* morfología café. En el eje X se muestra la hora de muestreo. En el eje Y se muestran los puntos de muestreo. En el eje Z se muestran las concentraciones de MDA ( $\mu\text{M}$  por mg de proteína) en el pólipo.

de profundidad. Por otro lado, en esta misma morfología, pero situada a 2 m de la misma colonia coralina, al mismo tiempo que se registró la mínima concentración de MDA ( $T_4$ - 8:30 am), se registró el nivel máximo de MDA de  $0.91 \mu\text{M}$  por mg de proteína total.

### 3.3. Correlaciones

Se encontraron diversas correlaciones estadísticamente significativas entre los diferentes indicadores fisiológicos (Tabla 1). La concentración de Proteínas fluorescentes presentó correlaciones altas con 5 de los indicadores, siendo la más significativa la de proteínas fluorescentes contra el nivel de antioxidantes totales en el endosimbionte ( $r=0.75$ ), al nivel de MDA también del endosimbionte ( $r=0.74$ ) y al nivel de proteína total del endosimbionte ( $r=0.70$ ). Las FPs también presentaron una correlación considerable entre los MAAs ( $r=0.55$ ) y también en el nivel de MDA del cnidario ( $r=0.38$ ). Los indicadores de densidad de células de endosimbionte y Chl  $a$  no presentaron correlaciones significativas. Por otro lado, los MAAS si presentaron correlaciones al comparar sus niveles con los antioxidantes ( $r=0.39$ ) totales del endosimbionte, el daño celular (MDA) del endosimbionte ( $r=0.38$ ), y una correlación inversa contra la proteína total del endosimbionte ( $r=-0.38$ ).

Los antioxidantes del cnidario presentaron una fuerte correlación inversa con el nivel de proteína total del cnidario ( $r=-1.0$ ). Así mismo, los antioxidantes del endosimbionte presentaron una correlación directamente proporcional de las mismas magnitudes para el daño celular ( $r=1.0$ ), y para el nivel de proteína total del endosimbionte ( $r=-1.0$ ). En el endosimbionte de *P. verrucosa*, se encontró una alta correlación directamente proporcional ( $R=0.99$ ) entre la capacidad antioxidante total y el nivel de MDA. Esta correlación se obtuvo a usando todos los datos del tejido del endosimbionte de ambas morfologías ( $n=32$ ). Por otro lado, el nivel de MDA presentó una correlación inversa con el nivel de proteína total de  $R=-0.995$ . Esta correlación se obtuvo a partir de los datos del tejido de los endosimbiontes provenientes de Carrizales y La Boquita ( $n=32$ ).



En el caso de cnidario, solo se encontró una correlación inversa ( $R=-0.99$ ) entre el nivel de proteína total y la capacidad antioxidante total. Esta correlación se obtuvo a partir de los datos del tejido de todos los corales muestreados en Carrizales y La Boquita ( $n=32$ ). Se encontraron diversas correlaciones positivas y negativas entre la concentración de MDA, antioxidantes totales y proteína total en el tejido del endosimbionte y el holobionte completo. Se registró una correlación positiva entre el nivel de proteína total del endosimbionte y el nivel de proteína total de todo el holobionte ( $n=32$ ). De la misma manera, encontramos una correlación positiva entre el nivel de proteína total del cnidario y el nivel de proteína total de todo el holobionte ( $n=32$ ).

Por otra parte, la concentración de MDA en el tejido del endosimbionte tuvo una correlación positiva contra el nivel de MDA del holobionte de  $R=0.84$  ( $n=32$ ). De igual manera, el nivel en los antioxidantes totales del endosimbionte presentó una correlación positiva contra el nivel de MDA del holobionte de  $R=0.84$  ( $n=32$ ). También encontramos una correlación positiva de  $R=0.57$  entre la concentración de MDA en el endosimbionte y la capacidad antioxidante total del holobionte ( $n=32$ ). Además, se registró una correlación de  $R=0.56$  entre la capacidad antioxidante total del endosimbionte y la capacidad antioxidante total del holobionte ( $n=32$ ). La concentración de MDA en el tejido del endosimbionte presentó una correlación negativa contra el nivel proteína total del holobionte de  $R=0.61$  ( $n=32$ ). De igual manera, el nivel de los antioxidantes totales del endosimbionte presentó una correlación negativa ( $R=0.60$ ) contra el nivel proteína total del holobionte ( $n=32$ ). También encontramos una correlación negativa de  $R=0.84$  entre la concentración de proteína total del holobionte y la concentración de MDA en el endosimbionte ( $n=32$ ). Así mismo, se registró una correlación de  $R=0.56$  entre el nivel de proteína total del holobionte y la capacidad antioxidante total del endosimbionte ( $n=32$ ).

La concentración de MDA en el del endosimbionte presentó una correlación positiva contra la concentración de MDA del holobionte de  $R=0.547$  ( $n=32$ ). por otro lado, el nivel en los antioxidantes totales del endosimbionte y del holobionte presentaron una correlación positiva de  $R=0.719$  ( $n=32$ ). También encontramos una correlación negativa de  $R=-0.681$  entre la concentración de antioxidantes totales en el endosimbionte y la cantidad de proteína total del holobionte ( $n=32$ ). Así mismo, se registró una correlación negativa de  $R=-0.724$  entre el nivel de proteína total del cnidario y la capacidad antioxidante total del holobionte completo ( $n=32$ ).

Tabla 3. Correlaciones entre FPs, densidad celular, Chl-a, MAAs, antioxidantes totales (Aox), lipoperoxidación (MDA) y proteína total en el cnidario (Cn), endosimbionte (En) y en el holobionte (Ho). Los Valores en rojo muestran las correlaciones significantes a  $p < 0.05$  (N=34).

	FPs	Densidad Celular	Chl-a	MAAs	Aox Cn	Aox En	Aox Ho	MDA Cn	MDA En	MDA Ho	Proteína Total Cn	Proteína Total En
Densidad Celular	0.00 p=0.9											
Chl-a	0.09 p=0.6	0.23 p=0.1										
MAAs	<b>0.55</b> p=0.0	0.03 p=0.8	0.25 p=0.1									
Aox Cn	-0.23 p=0.1	-0.23 p=0.1	-0.11 p=0.5	0.04 p=0.8								
Aox En	<b>0.75</b> p=0.0	-0.01 p=0.9	0.11 p=0.5	<b>0.39</b> p=0.0	-0.13 p=0.4							
Aox Ho	<b>0.35</b> p=0.0	-0.23 p=0.1	-0.08 p=0.6	0.20 p=0.2	<b>0.72</b> p=0.0	<b>0.56</b> p=0.0						
MDA Cn	<b>0.38</b> p=0.0	0.25 p=0.1	0.02 p=0.9	0.20 p=0.2	-0.12 p=0.5	0.15 p=0.39	0.01 p=0.9					
MDA En	<b>0.74</b> p=0.0	-0.01 p=0.9	0.12 p=0.5	<b>0.38</b> p=0.0	-0.11 p=0.5	<b>0.99</b> p=0.0	<b>0.57</b> p=0.0	0.16 p=0.3				
MDA Ho	<b>0.83</b> p=0.0	0.17 p=0.3	0.18 p=0.3	<b>0.55</b> p=0.0	-0.15 p=0.4	<b>0.85</b> p=0.0	<b>0.43</b> p=0.0	<b>0.55</b> p=0.0	<b>0.84</b> p=0.0			
Proteína Total Cn	0.22 p=0.2	0.21 p=0.2	0.11 p=0.5	-0.05 p=0.7	<b>-1.00</b> p=0.0	0.12 p=0.5	<b>-0.72</b> p=0.0	0.10 p=0.5	0.10 p=0.56	0.13 p=0.4		
Proteína Total En	<b>-0.75</b> p=0.0	0.01 p=0.9	-0.11 p=0.5	<b>-0.38</b> p=0.0	0.13 p=0.4	<b>-1.00</b> p=0.0	<b>-0.56</b> p=0.0	-0.15 p=0.4	<b>-1.00</b> p=0.0	<b>-0.84</b> p=0.0	-0.12 p=0.5	
Proteína Total Ho	<b>-0.32</b> p=0.0	0.14 p=0.4	-0.04 p=0.8	<b>-0.39</b> p=0.0	-0.68 p=0.0	<b>-0.61</b> p=0.0	<b>-0.9</b> p=0.0	-0.03 p=0.8	<b>-0.62</b> p=0.0	<b>-0.51</b> p=0.0	<b>0.69</b> p=0.0	<b>0.61</b> p=0.0

### 3.4. Indicadores Genómicos

#### 3.4.1 Ensamble de Novo

Tras el ensamble *in silico* mediante el uso del software Trinity, se obtuvieron tres transcriptomas de *P. verrucosa*, uno para la morfología verde, otro para la morfología café y uno más que unifica ambos transcriptomas. En el caso del transcriptoma de *P. verrucosa* verde, el ensamble de 160,990,023 bases, determinó un porcentaje de GC de 48.45% con 168,473 transcritos correspondientes a 116,365 genes putativos. Por otro lado, para *P. verrucosa* café, el ensamble de 169,085,411 bases, registró un porcentaje de GC de 47.80% con 183,837 transcritos asociados a 122,589 genes putativos.

El transcriptoma unificado consistió de 221,657,268 nucleótidos. Se reportó un porcentaje de GC de 47.33% con 226,049 transcritos reconstruidos incluyendo isoformas. El 50% de los transcritos del transcriptoma unificado fueron mayores a 1,583 nucleótidos (N50), siendo la longitud promedio de 980.57 nucleótidos. En el caso del transcriptoma de las morfologías verde y café, los valores de N50 fueron 1,511 y 1,444, respectivamente. Mientras que la longitud promedio de los transcritos fue de 955.58 nucleótidos para la morfología verde, para la morfología café fue de 919.76 nucleótidos.

Comparando los transcritos en la base de datos de proteínas Uniprot, la morfología verde obtuvo 79,653 hits, mientras que la café tuvo 81,872 hits. De éstos, 1,138 hits del fenotipo verde y 1,308 hits del fenotipo café obtuvieron homología con *Acropora millepora*, cinco hits de ambas morfologías con *Acropora formos* y dos hits con *Acropora tenuis* para ambas morfologías. Todas, especies de coral hermatípico del Phylum: *Cnidaria*; Clase: *Anzotoa*; Orden: *Scleractinia*; Familia: *Acroporidae*.

Por otro lado, la morfología verde obtuvo 127 hits con *Symbiodinium sp.* (Phylum: *Dinoflagellate*; Clase: *Dinophyceae*; Orden: *Suessiales*; Familia: *Symbiodiniaceae*.) mientras que la café presentó 172 hits con el mismo organismo. Además, la morfología verde obtuvo 455 hits con *Arabidopsis thaliana* (Clado: *Angiosperms*; Orden: *Brassicales*; Familia: *Brassicaceae*), mientras que la café presentó 473 hits con la misma especie.

El número de genes putativos con ontología genética fue de 20,271 en la morfología verde y 20,565 en la morfología café. El 66.4% de genes putativos (16,295) fueron compartidos entre ambas morfologías (Figura 13). El número de genes putativos exclusivos de la morfología verde fue de: 3,976 (16.2%), mientras que la morfología café presentó 4,270 genes putativos exclusivos (17.4%).

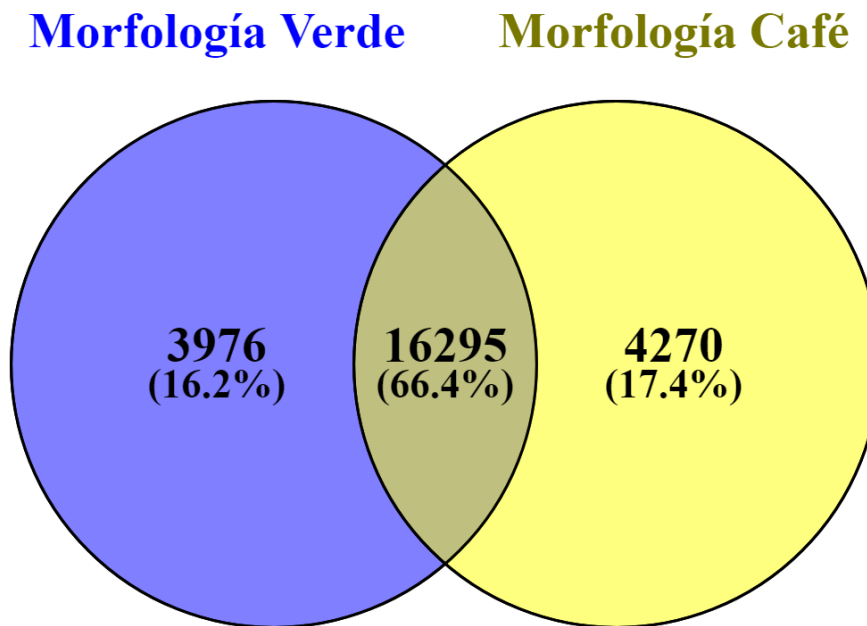


Figura 14. Diagrama Venny que muestra el número de genes putativos exclusivos de la morfología verde (en azul) y de la morfología café (en amarillo) y los porcentajes que comparten entre si. Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams.

### 3.4.2 Expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial de genes, reveló que existen 1068 genes con expresión diferencial significativa ( $P < 0.05$ ,  $FC > 2$ ). FC (Fold-change) indica la magnitud de cambio para un gen específico entre condiciones experimentales. De los genes expresados diferencialmente, el 79.7% (819 genes) registró homología en la base de datos Uniprot/Swissprot. Por otro lado, se puede observar que las submuestras CV y CC pertenecientes a Carrizales son similares en su perfil de expresión, mientras que las submuestras BV y BC de La Boquita se agrupan y se diferencian de

las anteriores (Figura 15). Además, se observa un patrón de expresión diferencial entre CV y CC, y entre BV y BC, es decir, entre los morfotipos verde y café.

Para inferir el estado de estrés en ambas morfologías, se seleccionaron varios genes relacionados a procesos de aclimatación y estrés: Dos isoformas de GFP-like protein (*GFP*), una isoforma de Photosystem II protein D1 (*psbA*), dos isoformas de Calpain-9 (*Capn9*), tres isoformas de Peroxidasin-like protein (*PXDNL*), una isoforma de Catalase (*CAT*), una isoforma de Gamma-glutamyltranspeptidase 1 (*GGT 1*), una isoforma de Epididymal secretory glutathione peroxidase (*GPX5*), tres isoformas de Glutathione S-transferase (*GST*) y una isoforma de Glutathione synthetase (*GSH*), dichos genes presentaron ontologías génicas (Tabla 2). La ontología génica asocia el proceso biológico, función molecular o componente celular en el que está involucrado un gen o un transcrito.

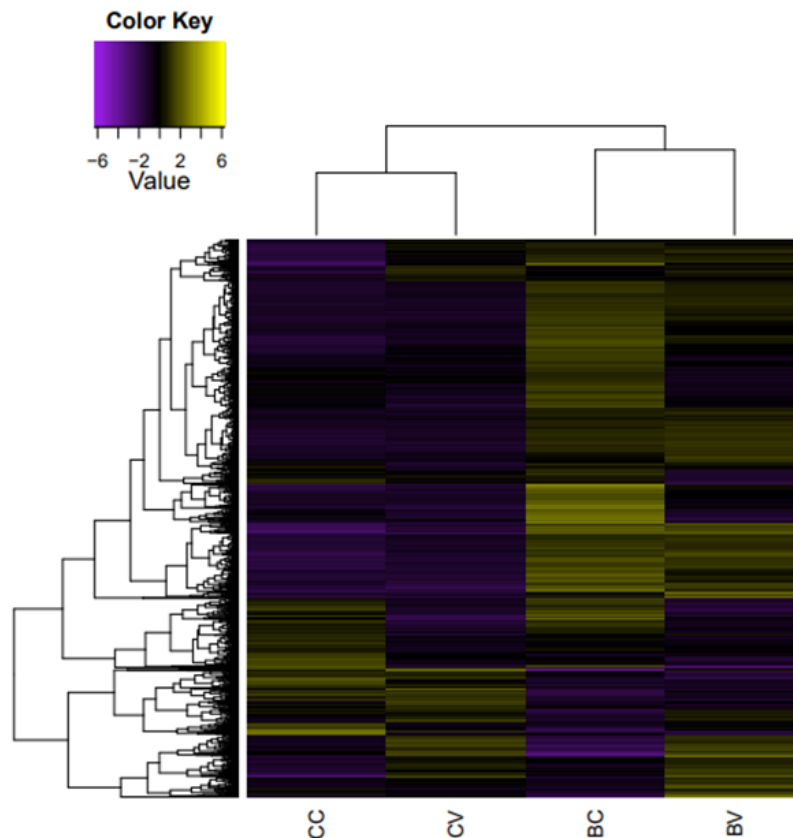
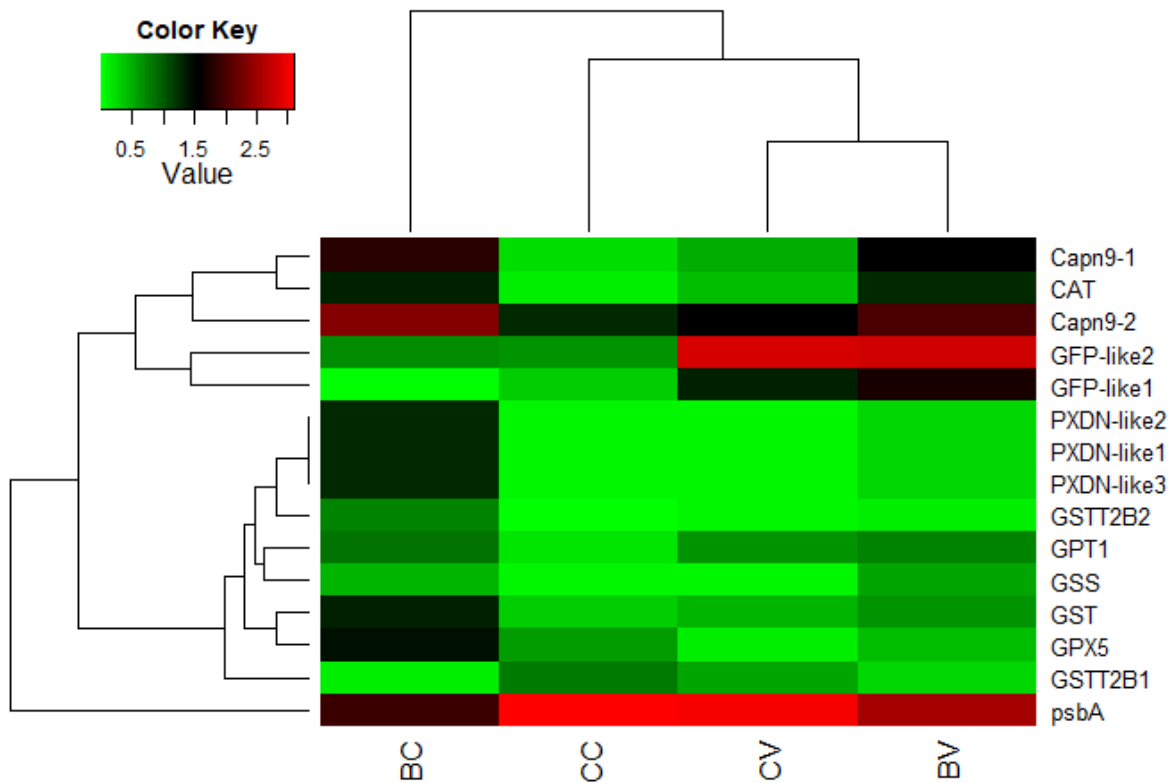


Figura 15 Transcritos de *P. verrucosa*, con expresión diferencial significativa, el color purpura denota subexpresión, amarillo sobreexpresión. Morfología verde de Carrizales (CV), morfología verde de La Boquita (BV), morfología café de Carrizales (CC) y Morfología café de La Boquita (BC). Amarillo = transcritos con regulación positiva, Morado = transcritos con regulación negativa. Valores en log2.

Tabla 4. Lista de genes de interés con ontología genica. GFP-like (*GFP*), Photosystem II protein D1 (*psbA*), Calpain-9 (*Capn9*), Peroxidasin-like (*PXDNL*), Catalase (*CAT*), Gamma-glutamyltranspeptidase 1 (*GGT 1*), Epididymal secretory glutathione peroxidase (*GPX5*), Glutathione S-transferase (*GST*) y Glutathione synthetase (*GSH*).

Proteína	Gen	Especies con Hits	Proceso biológico
GFP-like protein (1)	<b>amFP486</b>		Bioluminescence [GO:0008218]
		<i>Anemonia manjano</i>	Generation of precursor metabolites and energy [GO:0006091]
GFP-like protein (2)	<b>amFP486</b>		Protein-chromophore linkage [GO:0018298]
Calpain-9(1)	<b>Capn9</b>	<i>Rattus</i>	Digestión [GO:0007586]
Calpain-9 (2)	<b>Capn9</b>	<i>norvegicus</i>	
Peroxidasin-like protein (1)	<b>PXDNL</b>		Hydrogen peroxide catabolic process [GO:0042744]
Peroxidasin-like protein (3)	<b>PXDNL</b>	<i>Homo sapiens</i>	
Peroxidasin-like protein (4)	<b>PXDNL</b>		
Catalase	<b>CAT</b>	<i>Cavia porcellus</i>	[GO:0006979]
Gamma-glutamyltranspeptidase	<b>Ggt</b>	<i>Rattus</i>	Aging [GO:0007568]
		<i>norvegicus</i>	Cellular response to oxidative stress [GO:0034599]
Epididymal secretory glutathione peroxidase	<b>GPX5</b>	<i>Sus scrofa</i>	Cellular response to oxidative stress [GO:0034599]
Glutathione S-transferase theta-2B (1)	<b>GSTT2B</b>		Glutathione derivative biosynthetic process [GO:1901687]
Glutathione S-transferase theta-2B (2)	<b>GSTT2B</b>	<i>Homo sapiens</i>	
Glutathione S-transferase	<b>GST</b>	<i>Blattella germanica</i>	
Glutathione synthetase	<b>gss</b>	<i>Xenopus laevis</i>	
Photosystem II protein D1	<b>psbA</b>	<i>Heterocapsa niei</i>	Photosynthetic electron transport in photosystem II [GO:0009772]

La comparación entre CV y BV muestra un perfil bastante similar en la mayoría de los genes enlistados anteriormente, excluyendo los genes de *Capn9* y *CAT* que presentan un incremento en sus valores en BV ( $FC > 2$ ). Si observamos estos mismos genes en CC y CV podemos resaltar que solo los genes de *GFP* son diferentes, siendo menores en CC, mientras que los genes de *Capn9* y *CAT* de CC son más parecidos a los de CV. A su vez, si analizamos la expresión de genes en BC obtenemos que esta morfología presenta un patrón de expresión totalmente diferente a los anteriores, con niveles de expresión elevados para las isoformas de los genes *Capn9*, de *PXDNL*, *CAT*, *GGT 1*, *GST* y *GSH*, mientras que los genes de *GFP*, *psbA* y de *GPX5* se ven disminuidos significativamente ( $P < 0.05$ ) (Figura 16).



## Capítulo 4. Discusión

---

Los resultados obtenidos con los indicadores fisiológicos indican que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) en la respuesta fisiológica de ambas morfologías de *P. verrucosa* en los diferentes ambientes. Los datos analizados demuestran que la respuesta de ambos corales es prácticamente igual durante 24 horas, sin importar el ambiente o localización en el mismo. En este contexto, podríamos sugerir que ambos corales presentaron estado fisiológico similar. Sin embargo, a pesar de que no encontramos diferencias significativas, sí observamos patrones diferentes entre ambas morfologías, cuando los corales son reubicados en un ambiente estresante, como la Boquita.

Por otro lado, cumpliendo con la hipótesis planteada, la morfología verde presentó mayores concentraciones de FPs en contraste con la morfología café, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la prueba de U de Mann Whitney con  $p = 0.04$ ; Takabayashi y Hoegh-Guldberg (1995) reportaron resultados parecidos en los corales *Pocillopora damicornis* de morfologías rosa y café. Estos autores reportan que *P. damicornis* rosa

Figura 16 Transcritos de *P. verrucosa*, con expresión diferencial significativa. Morfología verde de Carrizales (CV), morfología verde de La Boquita (BV), morfología café de Carrizales (CC) y Morfología café de La Boquita (BC). Genes: GFP-like protein (*GFP*), Photosystem II protein D1 (*psbA*), Calpain-9 (*Capn9*), Peroxidase-like protein (*PXDNL*), Catalase (*CAT*), Gamma-glutamyltranspeptidase 1 (*GGT 1*), Epididymal secretory glutathione peroxidase (*GPX5*), Glutathione S-transferase (*GST*) y Glutathione synthetase (*GSH*). Rojo = transcritos con regulación positiva, verde = transcritos con regulación negativa. Valores en log10.

presentan concentraciones significativamente más altas de *pocilloporina*, una FP de color cian (560 nm CFP), en comparación a *P. damicornis* café, el cual tiene una capacidad genética reducida para expresar la proteína. Ambas morfologías también difieren fisiológicamente, ya que *P. damicornis* café tiende a tener una mayor tasa de calcificación que *P. damicornis* rosa, lo que indica un cierto grado de plasticidad fisiológica de las dos morfologías.

Tomando en cuenta que las proteínas presentan una vida media de al menos 20 días en condiciones naturales (Leutenegger et al. 2007), la diferencia en la concentración de las FPs en las morfologías del coral estudiado podría deberse a diversos factores ambientales



anteriores al muestreo o características genéticas de cada morfología (Takabayashi y Hoegh-Guldberg 1995). Roth y colaboradores (2013) proponen que la fluorescencia verde por GFP está directamente relacionada con corales sanos y con procesos de aclimatación, confiriéndoles mayor poder antioxidante (Roth et al. 2015). Se ha propuesto que los pigmentos similares a la proteína verde fluorescente (GFP) tienen efectos beneficiosos sobre la fotobiología del coral (Roth et al. 2015; Lyndby et al. 2016).

Tomando en cuenta que ambos corales presentaron las mismas condiciones fisiológicas durante las 24 horas posteriores a su reubicación. Podemos decir que las dos morfologías presentan el mismo estado de salud ante el estrés por su reubicación en condiciones estresantes, durante las primeras 24 horas. Cabe mencionar que las muestras fueron tomadas de sólo dos organismos monoclonales, ambos aparentemente sanos ubicados a la misma profundidad (7m). Es probable que, por estas razones, no se encontraron diferencias significativas. No obstante, la respuesta podría diferir entre las morfologías con el paso del tiempo. Algunos autores sugieren que el blanqueamiento del coral probablemente no se produzca a corto plazo, cinco días, al menos para el caso de exposición al aumento de las concentraciones de  $H_2O_2$  en el agua de mar (Higuchi et al. 2012).

Sin embargo, al observar la variación de estos indicadores de manera individual a través del tiempo para cada morfología, encontramos ciertos patrones diferenciados entre la morfología verde y la morfología café, especialmente con los organismos de La Boquita. Por ejemplo, se registró un patrón específico para el organismo café de 2 m de profundidad en La Boquita, la condición más estresante. Este coral, a diferencia de los demás, presentó un incremento en la concentración de las FPs, Aox del endosimbionte, MDA en endosimbionte y el pólipo. Por otro lado, en el fenotipo verde de 2 m en La Boquita, no se encontraron estos incrementos, salvo en las concentraciones de FPs.

Si bien no encontramos diferencias significativas entre los indicadores moleculares y fisiológicos, si se registraron varias correlaciones importantes entre algunos indicadores, principalmente el MDA y Aox. Por ejemplo, en el tejido del endosimbionte, el nivel de daño

a las membranas celulares (MDA) fue equiparable con el nivel de antioxidantes, con una correlación directamente proporcional de  $r=0.994$ . Estos datos sugieren que el simbionte responde de manera inmediata ante el daño celular, liberando antioxidantes para contrarrestar el estrés oxidativo, en ambas morfologías de las dos comunidades. Además, se registró una correlación de  $r= 0.847$  entre el nivel de Aox del endosimbionte y el nivel de MDA del holobionte (Figura 40-B). Por otro lado, no existió correlación alguna entre el nivel de daño celular del pólipos y los antioxidantes totales del mismo (Tabla 1). Posiblemente porque el endosimbionte fue capaz de responder ante el estrés de forma prácticamente inmediata, para prevenir el daño al holobionte completo, mientras que el cnidario depende de los antioxidantes liberados por el endosimbionte.

La inferencia del daño celular del endosimbionte con respecto al holobionte completo presentó una correlación directa. Los niveles de MDA del endosimbionte respecto al holobionte presentan una correlación de  $r=0.844$  (Figura 40-A). Mientras que los niveles de MDA del cnidario con respecto al holobionte completo tuvieron una correlación de  $r=0.547$  (Tabla 1). Estos datos sugieren que el daño celular por estrés oxidativo es más significativo en las células del endosimbionte. Estudios recientes respaldan la idea de que la sensibilidad al estrés del holobionte está determinada principalmente por el endosimbionte. Los corales asociados con simbiontes sensibles a temperaturas elevadas, pueden morir por blanqueamiento bajo estrés térmico, mientras que los asociados con simbiontes tolerantes al estrés pueden sobrevivir, dando como resultado cambios aparentes en la composición simbiótica de una población de coral (Sampayo et al. 2008).

Podemos sugerir que el coral de morfología café comienza a sufrir daños celulares debido al estrés oxidativo después de 24 horas de ser reubicado en el ambiente marginal de La Boquita a 2 m de profundidad, donde se presentan los mayores estresores. Mientras que el coral con fluorescencia verde permanece con los mismos niveles de MDA y Aox en este mismo punto de muestreo. En este contexto, podemos suponer que el coral verde, el cual presenta mayor cantidad de FPs comparado con el café (Figura 13), podría poseer una

estrategia de aclimatación diferente al coral café, posiblemente por la acción antioxidante de la GFP (Palmer et al. 2009a; Lin y Scott 2012).

También se encontró una correlación directamente proporcional entre FPs con la concentración de MDA en el endosimbionte ( $r=0.74$ , Tabla 1) y los antioxidantes totales en el endosimbionte ( $r=0.75$ , Tabla 1). Además, al considerar los niveles de Aox y MDA del Holobionte en conjunto, encontramos que la relación persiste en el caso de la Aox ( $r=0.35$ ) y se hace más evidente en la concentración de MDA ( $r=0.83$ ), sin embargo, los niveles de FPs y Aox en el cnidario, no presentaron correlaciones significativas (Tabla 1).

En el caso de la Chl  $a$  y la densidad del endosimbionte, no se encontraron diferencias significativas ni correlaciones con ninguno de los demás indicadores (Tabla 1). Si bien los niveles promedio de estos dos indicadores fisiológicos son estadísticamente semejantes en todas sus agrupaciones, hay que remarcar que todos los fragmentos del fenotipo café presentaron un perfil inverso al del fenotipo verde, llegando a su nivel máximo de clorofila y la densidad del endosimbionte durante la noche y una disminución considerable al amanecer, a diferencia del verde que presentó sus mayores valores en condiciones de luz con máximos niveles en los dos fenotipos a 2 m de profundidad en La Boquita. Todos los resultados fisiológicos, salvo la diferencia en la concentración de FPs, indican que ambas morfologías presentaron las mismas respuestas fisiológicas durante las 24 horas posteriores a su reubicación. No obstante, ciertos patrones como la concentración de FPs y la densidad de células del endosimbionte, sugieren que el coral *P. verrucosa* de morfología verde presenta una ventaja ante el estrés provocado por la reubicación, a diferencia del coral de morfología café.

Por otra parte, los resultados tras el análisis de expresión diferencial de genes revelaron que existen 1,068 genes con expresión diferencial significativa ( $P < 0.05$ ) y FC ó magnitudes de cambio  $> 2$ . Los resultados indican que la expresión de genes en ambas morfologías es similar cuando estos corales se encuentran en Carrizales, mientras que estos corales

presentan un patrón diferente cuando se localizan en La Boquita. Siendo el coral de morfología café el que presentó un cambio más marcado (Figura 16).

Al igual que los resultados de concentración de FPs, al comparar la expresión diferencial de las dos isoformas encontradas de los genes de FPs, encontramos que la morfología verde presenta una expresión más elevada sin importar la localidad en la que se encuentra. Mientras que el coral de morfología café presenta niveles inferiores en ambas isoformas. Takabayashi y Hoegh-Guldberg (1995) sugieren que en *Pocillopora damicornis* la capacidad de expresión de la *pocilloporina* (CFP) está genéticamente controlada. De manera que la producción de esta proteína puede ser inducida fenotípicamente por luz visible en aquellas colonias genéticamente capaces de expresar cantidades significativas. Los autores reportaron que, en su estudio, sólo las colonias de coral *P. damicornis* de morfología rosadas son capaces de producir esta FP, mientras que las de morfología café no presentaron niveles significativos después de dos meses de incrementos de radiación UV y luz visible.

Sugerimos que el coral *P. verrucosa* de morfología verde es genéticamente capaz de sintetizar mayores cantidades de FPs, en contraste con la morfología café, como lo indican nuestros resultados de expresión diferencial. Esta característica podría influir de manera significativa en la respuesta de adaptación del coral ante el estrés de la reubicación, mediante la incorporación de un antioxidante multifuncional potente.

Lo anterior, empata con los resultados de la expresión de los genes relacionados con estrés oxidativo. Si analizamos la expresión de ciertos genes (*PXDNL*, *CAT*, *Capn9*, *GSTT2B2*, *GPT1*, *GSS*, *GPX5* y *GST*) podemos resaltar que la morfología café ubicada en La Boquita, presenta un incremento significativo en todos estos genes. Mientras que el fenotipo verde sólo presentó incrementos en los genes de *Capn9* y *CAT* (Figura 16), manteniendo la expresión de los genes *PXDNL*, *GSTT2B2*, *GPT1*, *GSS*, *GPX5* y *GST*. Esto sugiere que en ambos corales existe una elevación en la digestión por parte del pólipo y mayor actividad antioxidante, sin embargo, esta es mayor en el coral café.

Además del incremento en los genes relacionados con la digestión, también podemos observar una disminución de la actividad del gen *psbA* implicado en el fotosistema II. Hill y Takahashi (2014) señalan que los estresores como el aumento de la temperatura del agua de mar causa fotoinhibición en las algas simbióticas de los corales; *Pocillopora damicornis*, *Montipora digitata*, *Pavona decussata*, y *Acropora millepora*, debido al daño acumulativo del fotosistema II (PSII). Los corales de todas las especies que estuvieron expuestos a luz intensa ( $600 \mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a temperatura elevada ( $32^\circ \text{C}$ ) durante 8 horas, presentaron blanqueo significativo, con una reducción del fotosistema II. De manera similar, algunos experimentos de laboratorio en las especies sensibles a la temperatura como *Monastrea annularis*, confirman la pérdida de la actividad de PSII en simbiontes de corales blanqueados recolectados en el arrecife de Carysfort. Además, se detectó una variación en la reparación de PSII, lo que indica que la perturbación de las velocidades de renovación de la proteína PSII durante la fotoinhibición a temperaturas elevadas subyace al colapso fisiológico de simbiontes en corales susceptibles al blanqueamiento inducido por calor (Warner et al. 1999). Si bien, en el presente estudio no se encontraron diferencias en la cantidad de células endosimbióticas, sí se encontró una disminución en la expresión de genes de *psbA* en los corales de La Boquita. Por lo anterior, podemos sugerir que el estrés de este ambiente podría estar provocando una reducción similar del fotosistema II.

Haciendo una interpretación global de los resultados, podemos sugerir que las dos morfologías presentan la misma respuesta fisiológica y de estrés, cuando son reubicadas del arrecife de Carrizales al ambiente marginal de La Boquita. No obstante, el contenido de FPs podría proveer a los corales verde que presenta mayor expresión y concentración de estas moléculas, una estrategia de adaptación extra. Ya que el coral de morfología verde utiliza con estas proteínas como antioxidantes. En este contexto, los corales verde pose una mayor capacidad de adaptación al ambiente de La Boquita en comparación al coral de morfología café. Los datos apuntan que este último, al no presentar concentraciones notables de FPs, es propenso a sufrir estrés oxidativo más rápido que el coral de morfología verde.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Los resultados de los análisis fisiológicos en el coral *P. verrucosa* y su endosimbionte indican que los holobiontes de ambas morfologías presentaron el mismo nivel de respuestas antioxidante y de salud durante las 24 horas posteriores a su reubicación. Además, la capacidad antioxidante presentó una correlación directa con las concentraciones de MDA, lo que indica una respuesta inmediata por parte del endosimbionte ante el estrés oxidativo del holobionte completo. Así mismo, la correlación entre las FPs y la capacidad antioxidante total del cnidario indica que estas proteínas funcionan como potentes antioxidantes que son sintetizados por el pólipo coralino.

La expresión diferencial de genes reveló que los corales *P. verrucosa* verde y café presentaron un perfil de expresión similar cuando estas morfologías se encuentran en Carrizales. Sin embargo, los corales reubicados en La Boquita reportaron un perfil totalmente opuesto. Ambos corales tuvieron un descenso en la expresión del gen *psbA* del fotosistema II, la morfología café, presentó un incremento significativo del nivel de expresión de los genes con función antioxidante (*PXDNL*, *CAT*, *GSTT2B2*, *GPT1*, *GSS*, *GPX5* y *GST*) y de digestión (*Capn9*). Mientras que el fenotipo verde sólo presentó incrementos en la expresión de los genes de *Capn9* y *CAT*. Estas características nos indican que ambos corales reubicados en La Boquita presentaron estrés oxidativo, sin embargo, la morfología café es la más afectada tras la reubicación en el ambiente marginal.

Los resultados que se muestran en este trabajo indican que las FPs, especialmente la GFP, están relacionada directamente con procesos de aclimatación en corto tiempo y de estrés oxidativo en corales *P. verrucosa*. Por esto, es probablemente que estas proteínas sean las principales responsables de las diferentes coloraciones y morfologías además de verde y café.

## Capítulo 6. Recomendaciones

---

Ya que los corales *P. verrucosa* con fluorescencia verde derivada de la expresión de la GFP, presentan una menor expresión de genes relacionados con el estrés en comparación con *P. verrucosa* café (no fluorescente), se recomienda el uso de esta proteína como indicador no invasivo.

Debido a que la presencia de GFP parece proveer una ventaja adaptativa ante el estrés ambiental, se recomienda considerar las morfologías con alta saturación de color verde para la reubicación y el traslado de corales *P. verrucosa*.

Se recomienda realizar análisis metatranscriptómicos para identificar los diferentes microorganismos presentes en el holobionte. Evaluar la expresión diferencial de genes relacionados con fotosíntesis, sistema inmune, estrés y otros procesos biológicos. Seleccionar un grupo de genes control y genes diana para validar los resultados transcriptómicos usando qPCR.

Dado que se cuenta con muestras en diferentes tiempos a lo largo del día, se recomienda analizar el mismo grupo de genes que se observó en este trabajo, para analizar el patrón de expresión.

## Literatura citada

---

- Alieva, N., Konzen, K., Field, S., Meleshkevitch, E., Marguerite, E., Hunt, E., Beltran-Ramirez, V., Miller, D., Wiedenmann, J., Salih, and A., Mikhail V. (2008). Diversity and evolution of coral fluorescent proteins. *PLoS One*, 3(7), 1-7.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. and Lipman, D.(1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(90), 403–410.
- Anithajothi, R., Duraikannu, K., Umagowsalya, G. and Ramakritinan, C. (2014). The presence of biomarker enzymes of selected scleractinian corals of Palk Bay, southeast coast of India. *BioMed Research International*, 2014(1), 1-6.
- Baird, A., Bhagooli, R., Ralph P. and Takahashi, S. (2009). Coral bleaching: the role of the host. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(1), 16–20.
- Baker, A., Glynn, P., and Riegl, B. (2008). Climate change and coral reef bleaching: an ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80(4), 435–471.
- Banaszak, A., Barba-Santos, M., LaJeunesse, T. and Lesser, M. (2006). The distribution of mycosporine-like amino acids (MAAs) and the phylogenetic identity of symbiotic dinoflagellates in cnidarian hosts from the Mexican Caribbean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 337(2006), 131–146.
- Bolger, A., Lohse, M. and Usadel, B., (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Borell, E., Yuliantri, A., Bischof, K. and Richter, C. (2008). The effect of heterotrophy on photosynthesis and tissue composition of two scleractinian corals under elevated temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 364(2008), 116–123.
- Bou-Abdallah, F., Chasteen, N. and Lesser, M. (2006). Quenching of superoxide radicals by green fluorescent protein. *Biochim Biophys Acta*, 1760(11), 1690-1695.
- Brodersen, K., Lichtenberg, M., Ralph, P., Kühl M. and Wangpraseurt, D. (2014). Radiative energy budget reveals high photosynthetic efficiency in symbiont-bearing corals. *Journal of the Royal Society*, 2014(11), 1–11.



- Burt, J., Al-Harhi, S. and Al-Cibahy, A. (2011). Long-term impacts of coral bleaching events on the world's warmest reefs. *Marine Environmental Research*, 72(2011), 225-229.
- Carignan, M., Cardozo, K., Oliveira-Silva, D., Colepicolo, P. and Carreto, J.(2009). Palythine-threonine, a major novel mycosporine-like amino acid (MAA) isolated from the hermatypic coral *Pocillopora capitata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 94(2009), 191–200 .
- Carpizo-Ituarte, E., Rodriguez-Troncoso, A. and Cupul-Magaña, A. (2013). Oxidative damage associated with thermal stress in *Pocillopora verrucosa* from the Mexican Pacific. *Ciencias Marinas*, 39(1), 113–118.
- Cederstav, A., Lawrence, J. and Quintanilla, V. (2015). La Protección de los Arrecifes de Coral en México: Rescatando la biodiversidad marina y sus beneficios para la humanidad. *Asociación interamericana para la defensa del ambiente, AIDA*, ISBN 13- 978-0-9823143-5-7.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of rna isolation by acid guanidinium extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1987), 156–159.
- Chou, L. (2016). Rehabilitation of coral reefs exposed to urbanization and climate change impacts. *Journal of Civil Engineering and Architecture*, 10(2016), 932-936.
- D'Angelo, C., Denzel, A., Vogt, A., Matz, M., Oswald, F., Salih, A., Nienhaus, G.,6 and Wiedenmann, J. (2008). Blue light regulation of host pigment in reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 364(2008), 97–106.
- D'Angelo, C., Smith, E., Oswald, F., Burt, J., Tchernov, J. and Wiedenmann, J. (2012). Locally accelerated growth is part of the innate immune response and repair mechanisms in reef-building corals as detected by green fluorescent protein ( GFP )-like pigments. *Coral Reefs*, 31(2012), 1-12.
- Delgadillo-Nuño, M., Liñán-Cabello, M., Reyes-Gómez, J. and Soriano-Santiago, O. (2014). Response to pH stress in the reef-building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(3), 449-459.
- Field, S., Bulina, M., Kelmanson, I., Bielawski, J. and Matz1, M. (2006). Adaptive evolution of multicolored fluorescent proteins in reef-building corals. *Jurnal of Molecular Evolution*, 62(2006), 332-339.
- Field, S. and Matz, M. (2010). Retracing evolution of red fluorescence in GFP-like proteins from faviina corals. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 225–233.

- Flores-Ramírez, L. and Liñán-Cabello, M. (2007). Relationships among thermal stress, bleaching and oxidative damage in the hermatypic coral, *Pocillopora capitata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 146(2007), 194–202.
- Gittins, J., D'Angelo, C., Oswald, F., Edwards, R. and Wiedenmann, J. (2015) Fluorescent protein-mediated colour polymorphism in reef corals: Multicopy genes extend the adaptation/acclimatization potential to variable light environments. *Molecular Ecology*, 24(2015), 453–465.
- Glynn, P. (1999). *Pocillopora inflata*, a new species of scleractinian coral (Cnidaria: Anthozoa) from the tropical eastern Pacific. *Pacific Science*, 53(2), 168–180.
- Götz, S., García-Gómez, J., Terol, J., Williams, T., Nagaraj, S., Nueda, M., Robles, M., Taón, M., Dopazo J. and Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Reserch*, 36(10), 3420–3435.
- Grabherr, M., Haas, B., Moran-Yassour, Levin, J., Thompson, D., Ido-Amit, Xian-Adiconis, Lin-Fan, Raktima-Raychowdhury, Qiandong-Zeng, Zehua-Chen, Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Palma, F., Birren, B., Chand-Nusbaum, Lindblad-Toh, K., Friedman, N. and Regev, A. (2013). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652.
- Gruber, D., Kao, H., Janoschka, S., Tsai, J. and Pieribone, V. (2008). Patterns of Fluorescent Protein Expression in Scleractinian Corals. *Marine Biological Laboratory*, 215(2), 143-154.
- Haas, A., Smith, J., Thompson, M. and Deheyn, D. (2014). Effects of reduced dissolved oxygen concentrations on physiology and fluorescence of hermatypic corals and benthic algae. *PeerJ*, 2014(1), 1-19.
- Hartmann, A., Murauer, A. and Ganzera, M. (2017). Quantitative analysis of mycosporine-like amino acids in marine algae by capillary electrophoresis with diode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 138(2017), 153–157 .
- Henriques, M., Silva, A. and Rocha, J. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga : a simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 2007(1), 586–593.
- Hidaka, M. (2016). Life History and Stress Response of Scleractinian Corals. *Coral Reef Science*, 5(1), 1–24.

- Higuchi, T., Fujimura, H., Arakaki, T. and Oomori, T. (2008). Activities of antioxidant enzymes ( SOD and CAT ) in the coral *Galaxea fascicularis* against increased hydrogen peroxide concentrations in seawater. *Biochemistry*, 208(1), 923-930.
- Higuchi T, Suzuki Y, Fujimura H (2012) Multiple effects of hydrogen peroxide and temperature on antioxidants and bleaching. I *Biochemistry*, 2012(1), 9–13.
- Hill, R. and Takahashi, S. (2014). Photosystem II recovery in the presence and absence of chloroplast protein repair in the symbionts of corals exposed to bleaching conditions. *Coral Reefs*, 33(2014), 1101–1111.
- Hoogenboom, M., Campbell, D., Beraud, E., DeZeeuw, K. and Ferrier-Pagés, C. (2012). Effects of light, food availability and temperature stress on the function of photosystem II and photosystem I of coral symbionts. *PLoS One*, 7(1) 1-14.
- Labas, Y., Gurskaya, G., Yanushevich, Y., Fradkov, A., Lukyanov, K., Lukyanov, S. and Matz, M. (2002). Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 99(7) 4256–4261.
- Lapshin, G., Salih, A., Kolosov, P., Golovkina, M., Zavorotnyi, Y., Ivashina, T., Vinokurov, L., Bagratashvili V. and Savitsky, A. (2015). Fluorescence color diversity of great barrier reef corals. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, (4) 1-11.
- Leutenegger, A., D'Angelo<sup>1</sup>, C., Matz, M., Denzel, A., Oswald, F., Salih A., Nienhaus, G. and Wiedenmann, J. (2007). It's cheap to be colorful: Anthozoans show a slow turnover of GFP-like proteins. *The FEBS Journal*, 274(2007), 2496–2505.
- Levy, O., Achituv, Y., Yacobi, Y., Stambler, N. and Dubuinsky, Z. (2006). The impact of spectral composition and light periodicity on the activity of two antioxidant enzymes (SOD and CAT) in the coral *Favia fava*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 328(2006), 35-46.
- Lichtenthaler, H. and Wellburn, A. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(1), 591–592.
- Bou-Abdallah, F., Chasteen, N. and Lesser, P. (2012). Quenching of Superoxide Radicals by Green Fluorescent Protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(11), 130–134.
- Liñán-Cabello, M., Flores-Ramírez, L., Laurel-Sandoval, M., García-Mendoza E., Soriano-Santiago O. and Delgadillo-Nunño, M. (2011). Acclimation in *Pocillopora* spp. during a coral restoration program in Carrizales Bay, Colima, Mexico. *Marine and*

*Freshwater Behaviour Physiology*, 2010(1), 1-12

- Liñán-Cabelloa, M., Flores-Ramírez, L., Zenteno-Savin, T., Olguín-Monroy, N., Sosa-Avalos, R., Patiño-Barragan, M. and Olivos-Ortiz, A. (2010). Seasonal changes of antioxidant and oxidative parameters in the coral *Pocillopora capitata* on the Pacific coast of Mexico. *Marine Ecology*, 31(2010), 407–417.
- Liñán-Cabelloa, M., Flores-Ramírez L., Zacarías-Salinas J., Hernández-Rovelo, O. and Lezama-Cervantes, C. (2006). Correlation of chlorophyll a and total carotenoid concentrations with coral bleaching from locations on the Pacific coast of Mexico. *Freshwater Behaviour Physiology*, 39(4), 279–291 .
- Lukyanov, K., Fradkov F., Gurskaya N., Matz, M., Labas, Y., Savitskyi, A., Markelov, M., Zraisky, A., Xiaoning-Zhao, Yu-Fang, Wenyan-Tan, and Lukyanov, S. (2000). Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 25879–25882.
- Lyndby N., Kühl, M. and Wangpraseurt, D. (2016). Heat generation and light scattering of green fluorescent protein-like pigments in coral tissue. *Nature Scientific Reports*, 6(14), 1–14.
- Mayfield, A., Liu, P., Wang, Y. and Chen, C. (2014). Decreased green fluorescent protein-like chromoprotein gene expression in specimens of the model reef-building coral *Pocillopora damicornis* undergoing high temperature-induced bleaching. *PLoS ONE*, 9(1), 1-23.
- Mazel C., Lesser M., Gorbunov M., Barry, T., Farrell, J., Wyman, K., and Falkowski, P. (2003). Green-fluorescent proteins in Caribbean corals. *American Society of Limnology and Oceanography*, 48(2), 402–411.
- Miyawaki, A. (2002). Green fluorescent protein-like proteins in reef Anthozoa animals. *Cell Structure and Function*, 27(2002), 343–347.
- Mora C., Andrefouet, S., Costello, M., Kranenburg, C., Rollo, A., Veron, J., Gaston, K. and Myers, R. (2006). Coral Reefs and the Global Network of Marine Protected Areas. *Science Policy Forum*, 312(2006), 1750-1751.
- Mumby, P. (2017). Embracing a world of subtlety and nuance on coral reefs. *Coral Reefs*, 36(2017), 1003–1011.
- Murali, M., Raja, S. and Devaraj, S. (2010). Neutralization of radical toxicity by temperature-dependent modulation of extracellular SOD activity in coral bleaching pathogen *Vibrio*

- shiloi* and its role as a virulence factor. *Archives of Microbiology*, 192(2010), 619–623.
- Oren, A. and Gunde-Cimerman, N. (2007). Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?. *Federation of European Microbiological Societies*, 269(2007), 1–10.
- Palmer, C., Modi, C. and Mydlarz, L. (2009a). Coral fluorescent proteins as antioxidants. *PLoS One*, 4(10), 1–9.
- Palmer, C., Roth, M. and Gates, R. (2009b). Red fluorescent protein responsible for pigmentation in trematode-infected *Pontes compressa* tissues. *The Biological Bulletin*, 216(2009), 68–74.
- Perry, C., Murphy, G., Kench, P., Smithers, S., Edinger, E., Steneck, R. and Mumby, P. (2013). Caribbean-wide decline in carbonate production threatens coral reef growth. *Nature Communications*, 4(1402), 1-7.
- Reyes-Bonilla, H., Calderón-Aguilera, L., Cruz-Piñón, G., López-Pérez, R., and Medina-Rosas, P. (2010). Evaluación de la diversidad gama de corales arrecifales (Scleractinia) en el Pacífico de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(2010), 113–121.
- Reyes-Bonilla, H., Escobosa-González, L., Cupul-Magaña, A., Medina-Rosas, P. and Calderón-Aguilera, L. (2013). Estructura comunitaria de corales zooxantelados (Anthozoa: Scleractinia) en el arrecife coralino de Carrizales, Pacífico mexicano. *Revista de Biología Tropical*, 61(2), 583–594.
- Robinson, M., McCarthy, D. and Smyth, G. (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140.
- Roopnarine, P. and Dineen, A. (2016). Coral reefs in crisis: The reliability of deep-time food web reconstructions as analogs for the present. *bioRxiv*, 2017(1), 1–33.
- Rosic, N. and Dove, S. (2011). Mycosporine-like amino acids from coral dinoflagellates. *Applied Environmental Microbiology*, 77(24), 8478–8486.
- Roth, M. (2014). The engine of the reef: photobiology of the coral-algal symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 422(5), 1-22.
- Roth, M. and Deheyn, D. (2013). Effects of cold stress and heat stress on coral fluorescence in reef-building corals. *Scientific Reports*, 3(1421), 1-8.

- Roth, M., Fan, T. and Deheyn, D. (2013). Life History Changes in Coral Fluorescence and the Effects of Light Intensity on Larval Physiology and Settlement in *Seriatopora hystrix*. *PLoS One*, 8(3) 1-9.
- Roth, M., Latz, M., Goericke, R. and Deheyn, D. (2010). Green fluorescent protein regulation in the coral *Acropora yongei* during photoacclimation. *The Journal of Experimental Biology*, 213(1), 3644–3655.
- Roth, M., Padilla-Gamiño, J., Pochon, X., Bidigare, R., Gates, R., Smith, C. and Spalding, H. (2015). Fluorescent proteins in dominant mesophotic reef-building corals. *Marine Ecology Progress Series*, 521(2015), 63–79.
- Salih, A., Larkum, A., Cox, G., Èhl, M. and Hoegh-Guldberg, O. (2000). Fluorescent pigments in corals are photoprotective . *Nature*, 408(2000), 850-853.
- Samarkina, O., Popova, A., Gvozdik, E., Chkalina, A., Zvyagin, I., Ryloba, Y., Redenko, N., Konstantin, L., Kelmanson, I., Gorokhocastsky, A. and Vinokorov, L. (2009). Universal and rapid method for purification of GFP-like proteins by the ethanol extraction. *Protein Expression and Purification*, 65(2008), 108–113.
- Sampayo, E., Ridgway, T., Bongaerts, P. and Hoegh-Guldberg, O. (2008). Bleaching susceptibility and mortality of corals are determined by fine-scale differences in symbiont type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 105(30), 10444–10449.
- Shagin, D., Barsova, E., Yanushevich, Y., Fradkov, A., Lukyanov, K., Labas, Y., Semenova, T., Ugalde, J., Meyers, K., Nuñez, J., Widder, E., Lukyanov, S. and Matz, M. (2004). GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily: Evolution of Functional Features and Structural Complexity. *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 841–850.
- Shick, J. (2004). The continuity and intensity of ultraviolet irradiation affect the kinetics of biosynthesis, accumulation, and conversion of mycosporine-like amino acids (MAAs) in the coral *Stylophora pistillata*. *American Society of Limnology and Oceanography* 49(2), 442–458.
- Shick, J., Romaine-Lioud, S., Ferrier-Pagés, C. and Gattuso, J. (1999). Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *American Society of Limnology and Oceanography* 44(7), 1667-1682.
- Shikina, S., Chiu, Y., Chung, Y., Chieh-Jhen, C.,4, Yan-Horn, L. and Ching-Fong, C. (2016). Oocytes express an endogenous red fluorescent protein in a stony coral, *Euphyllia*

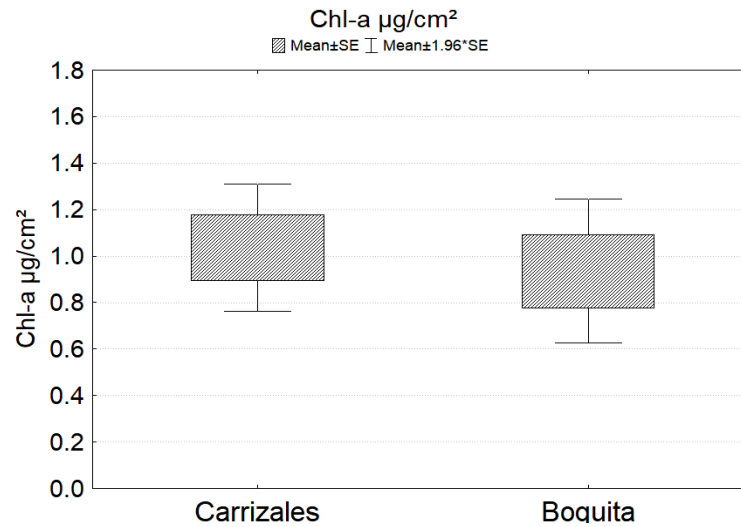
*ancora*: a potential involvement in coral oogenesis. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.

- Singh, S., Häder, D. and Sinha, R. (2012). Bioinformatics evidence for the transfer of mycosporine-like amino acid core (4-deoxygadusol) synthesizing gene from cyanobacteria to dinoflagellates and an attempt to mutate the same gene (YP\_324358) in *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Gene*, 500(2012), 155–163.
- Singh, S., Klisch, M., Sinha, R. and Häder, D. (2008). Effects of Abiotic Stressors on Synthesis of the Mycosporine-like Amino Acid Shinorine in the Cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84 (2008), 1500–1505.
- Sinha, R., Singh, S. and Häder, D. (2007). Database on mycosporines and mycosporine-like amino acids (MAAs) in fungi, cyanobacteria, macroalgae, phytoplankton and animals. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 89(2007), 29–35.
- Sogin, E., Putnam, H., Anderson, P. and Gates, R. (2016). Metabolomic signatures of increases in temperature and ocean acidification from the reef-building coral, *Pocillopora damicornis*. *Metabolomics*, 12(71), 1-12.
- Strader, M., Aglyamova, G. and Matz, M. (2016). Red fluorescence in coral larvae is associated with a diapause-like state. *Molecular Ecology*, 25(2016), 559–569.
- Strychar, K. and Sammarco, P. (2011). Effects of Heat Stress on Phytopigments of Zooxanthellae (*Symbiodinium* spp.) Symbiotic with the Corals *Acropora hyacinthus*, *Porites solida*, and *Favites complanata*. *International Journal of Biology* 4(1), 3–19.
- Takabayashi, M. and Hoegh-Guldberg, O. (1995). Ecological and physiological differences between two colour morphs of the coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*, 123(1995), 705–714.
- Takahashi-Kariyazono, S., Satta, Y. and Terai, Y. (2015). Genetic diversity of fluorescent protein genes generated by gene duplication and alternative splicing in reef-building corals. *Zoological Letters*, 1(2015), 23.
- Treibitz, T., Neal B., Kline, D., Beijbom, O., Roberts, P., Mitchell, B. and Kriegman, D. (2013). Wide Field-of-View Daytime Fluorescence Imaging of Coral Reefs. *Scientific Reports*, 5(7694), 1-95.
- Warner, M., Fitt, W. and Schmidt, G. (1999). Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates: A determinant of coral bleaching. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 96(1999), 8007–8012.

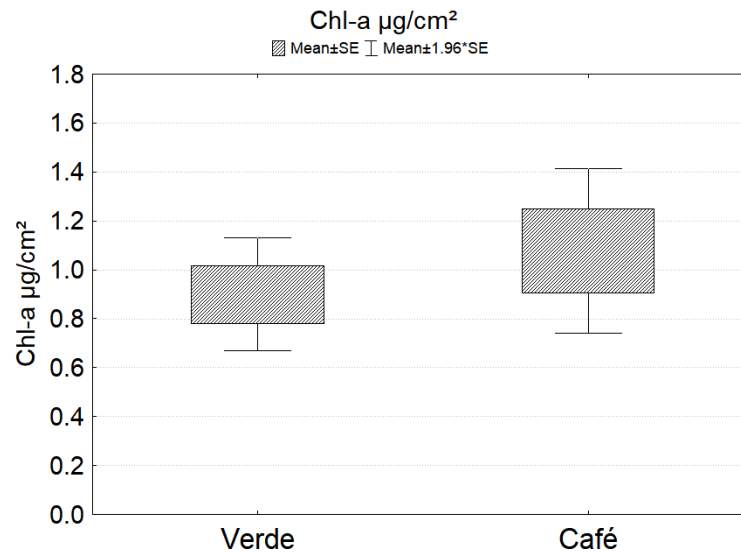
- Wijgerde, T., Melis, A., Silva, C., Leal, M., Vogels, L., Mutter, C. and Osinga, R. (2014). Red Light Represses the Photophysiology of the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata*. *PLoS One*, 9(3), 1–10.
- Yakovleva, I., Bhagooli, R., Takemura, A. and Hidaka, M. (2004). Differential susceptibility to oxidative stress of two scleractinian corals: Antioxidant functioning of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 139(2004), 721–730.
- Yakovleva, I., Baird, A., Yamamoto, H., Bhagool, R., Nonaka, M. and Hidaka, M. (2009). Algal symbionts increase oxidative damage and death in coral larvae at high temperatures. *Marine Ecology Progress Series*, 378(2009), 105–112.
- Zamoum, T. and Furla, P. (2012). *Symbiodinium* isolation by NaOH treatment. *The Journal of Experimental Biology*, 215(2012), 3875–3880.



## Anexos

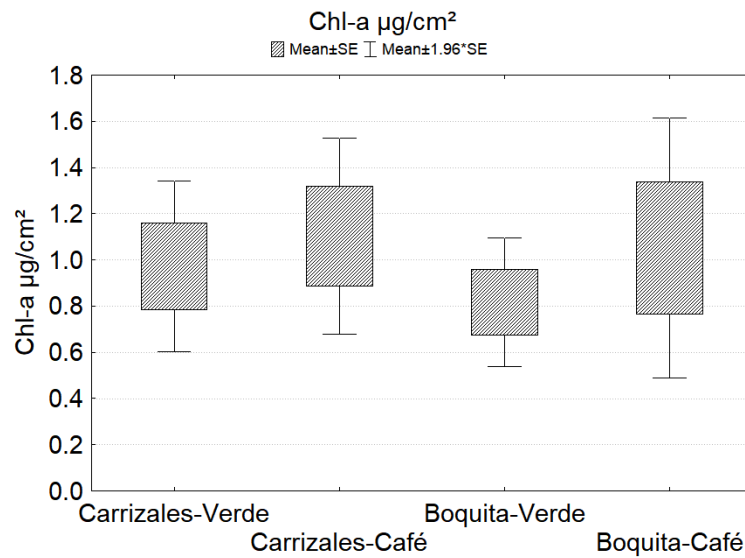


Anexo 1. Concentraciones promedio de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales (n=16) y La Boquita (n=16). Las concentraciones promedio de ambos arrecifes no son estadísticamente significativas (p=0.5) según la Prueba U de Mann Whitney.

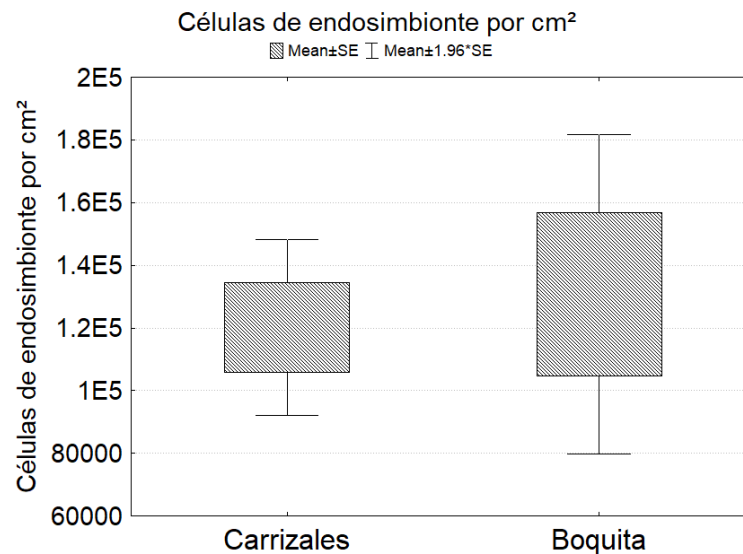


Anexo 2. Concentraciones promedio de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de ambas morfologías de *P. verrucosa* expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos (n=16). Las

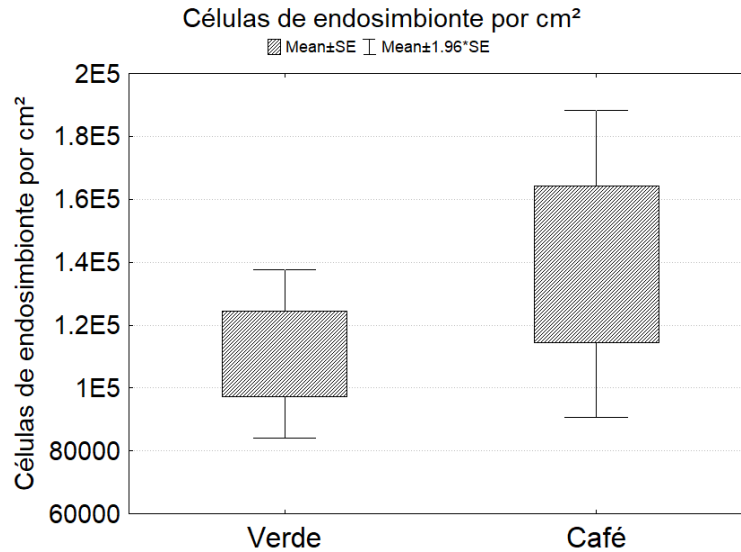
concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.9$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney.



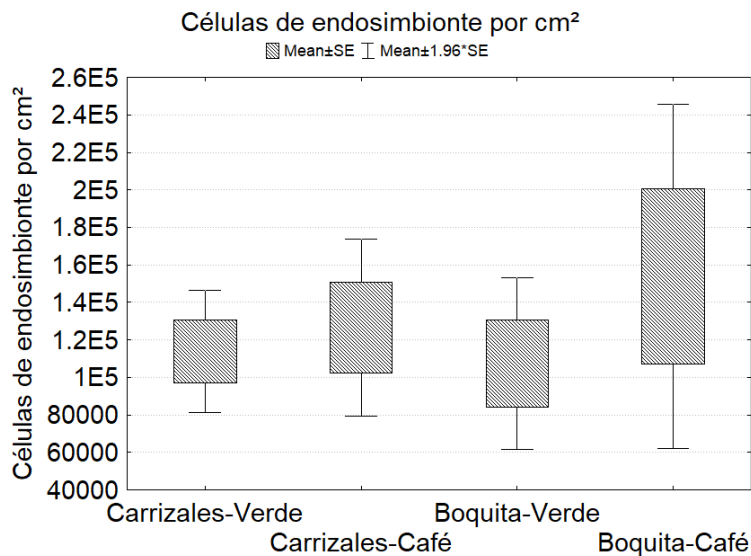
Anexo 3. Concentraciones promedio de Chl-a ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias expuestas a dos profundidades. Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.9$ ) según la Prueba Kruskal Wallis.



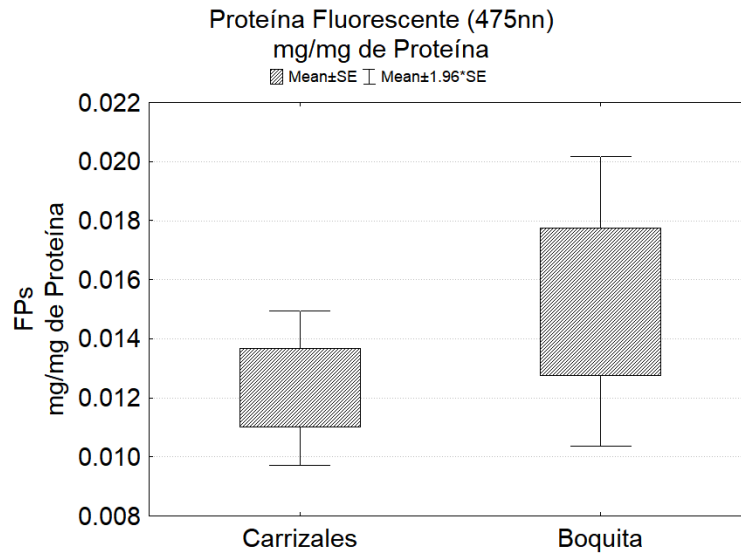
Anexo 4. Densidad de células de endosimbionte por  $\text{cm}^2$  en *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales ( $n=16$ ) y La Boquita ( $n=16$ )..



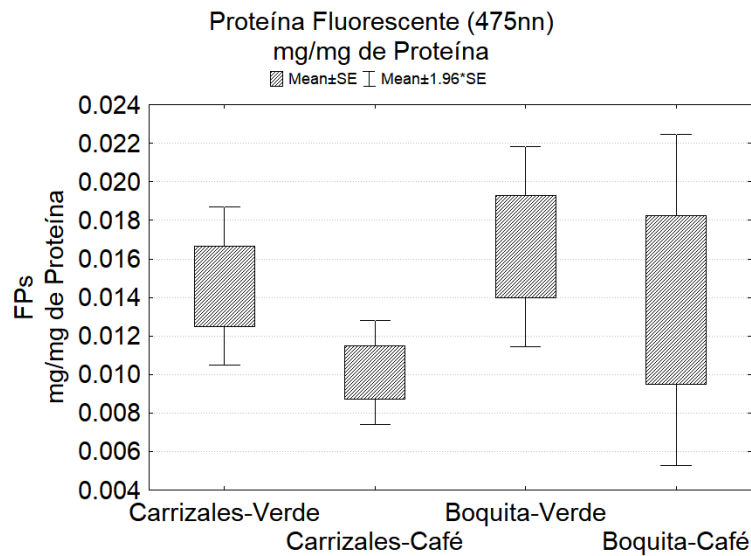
Anexo 5. Densidad de células de endosimbionte por cm<sup>2</sup> de ambas morfologías de *P. verrucosa* expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos (n=16). Las concentraciones son estadísticamente similares (p=0.54) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney.



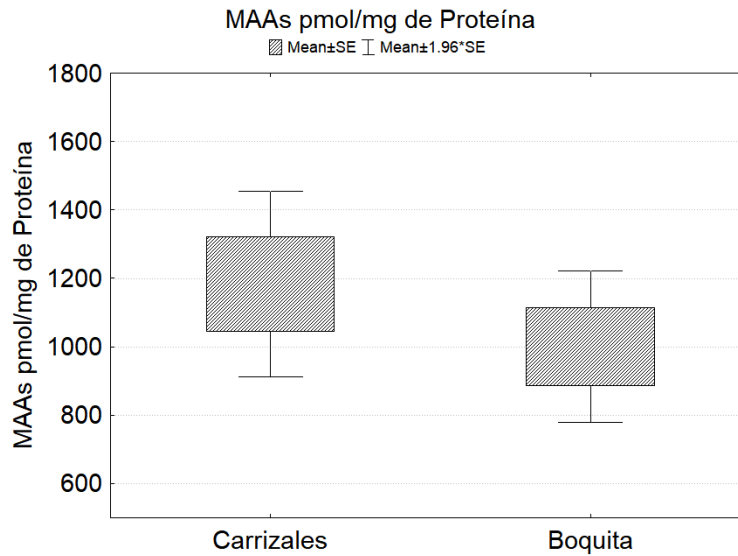
Anexo 6. Densidad de células de endosimbionte por cm<sup>2</sup> de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias expuestas a dos profundidades. Las concentraciones no mostraron diferencias significativas (p=0.9) según la Prueba Kruskal Wallis



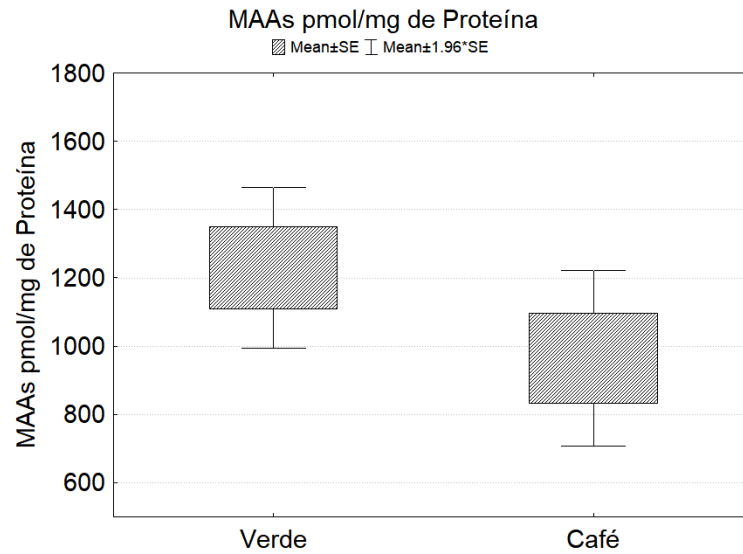
Anexo 7. Concentraciones promedio de FPs (mg/mg de proteína total) de *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales (n=16) y La Boquita (n=16). Las concentraciones promedio de ambos arrecifes son estadísticamente similares (p=0.5) según la Prueba U de Mann Whitney



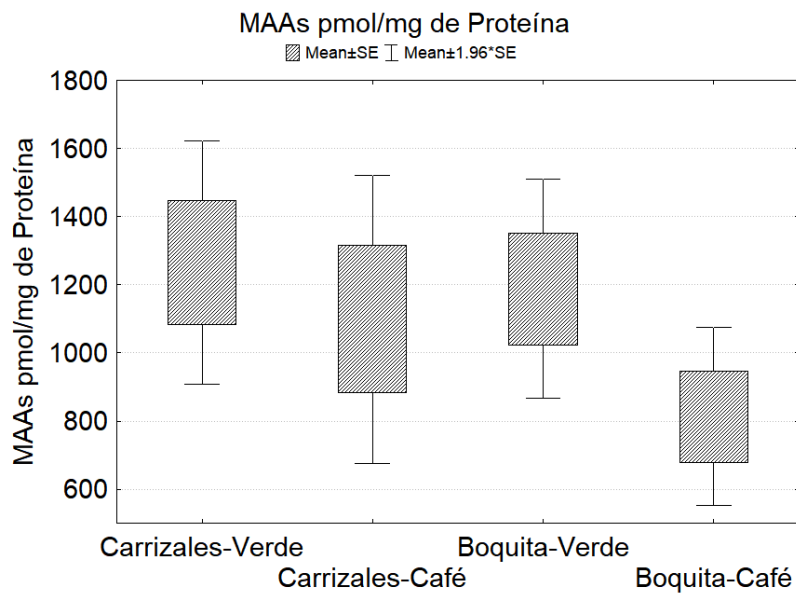
Anexo 8. Concentraciones promedio de FPs (mg/mg de proteína total) de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias expuestas a dos profundidades. Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.9$ ) según la Prueba Kruskal Wallis.



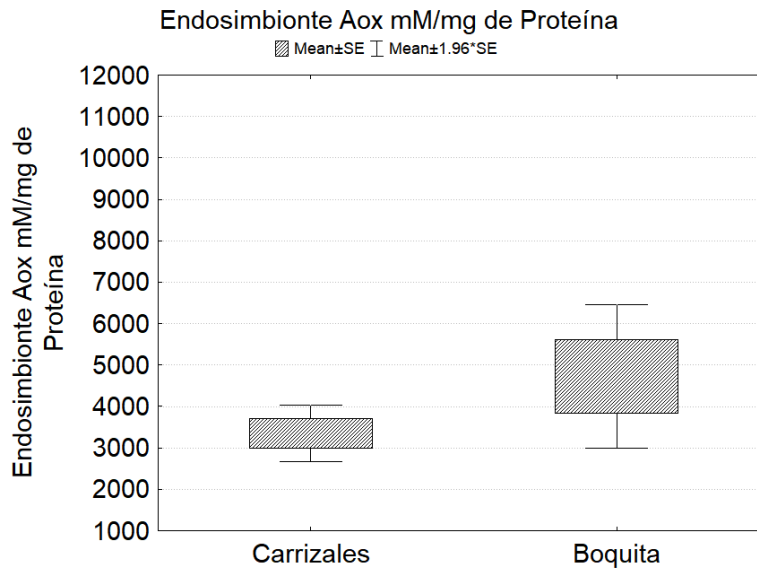
Anexo 9. Concentraciones promedio de MAAs (pmol/mg de proteína) de *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales ( $n=16$ ) y La Boquita ( $n=16$ ). Las concentraciones promedio de ambos arrecifes son estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) según la Prueba U de Mann Whitney



Anexo 10. Concentraciones promedio de MAAs ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  de proteína) de ambas morfologías de *P. verrucosa* expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos ( $n=16$ ). Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.2$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney

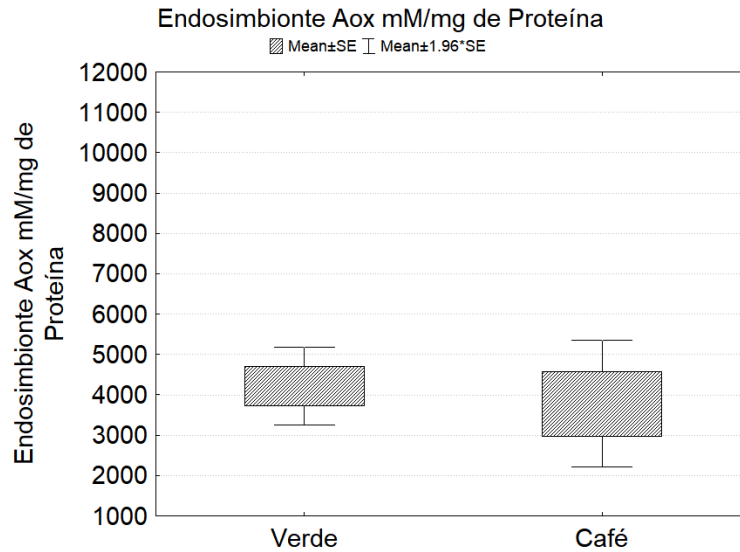


Anexo 11. Concentraciones promedio de MAAs (pmol/mg de proteína) de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias expuestas a dos profundidades. Las

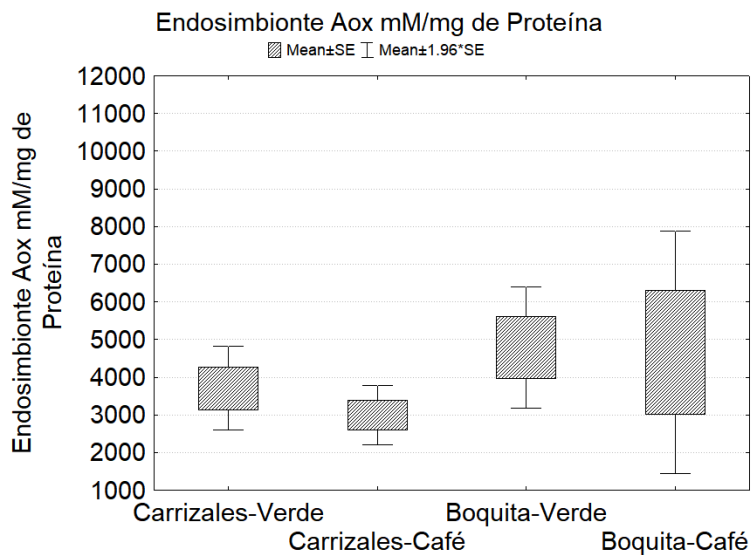


concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.3$ ) según la Prueba Kruskal Wallis.

Anexo 12. Concentraciones promedio de la capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del endosimbionte de *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales ( $n=16$ ) y La Boquita ( $n=16$ ). Las concentraciones promedio de ambos arrecifes no son estadísticamente diferentes ( $p=0.1$ ) según la Prueba U de Mann Whitney



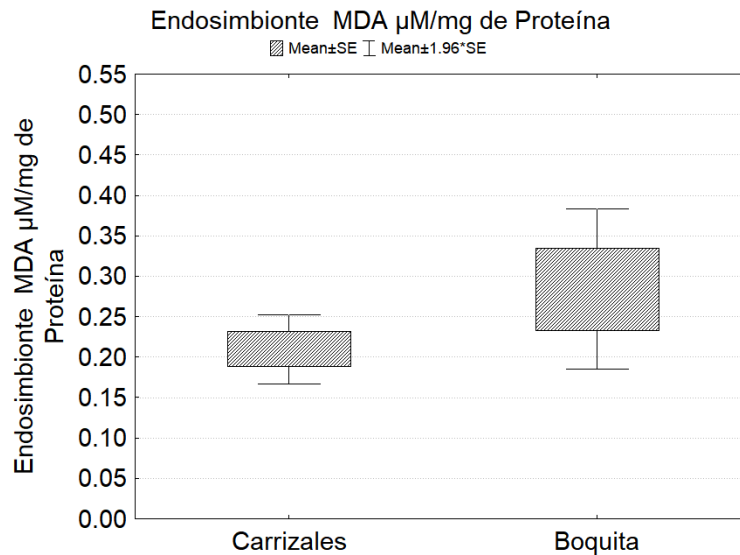
Anexo 13. Concentraciones promedio de la capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del endosimbionte de *P. verrucosa* de ambas morfologías expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos (n=16). Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney



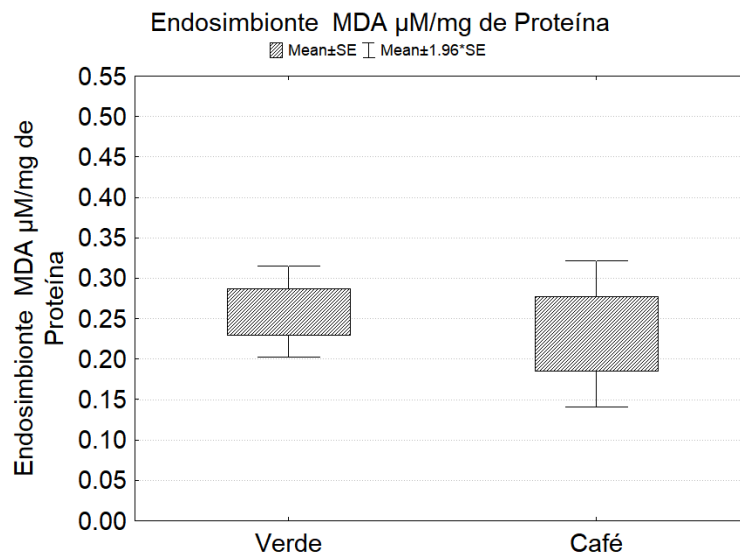
Anexo 14. Concentraciones promedio de la capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del endosimbionte de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias



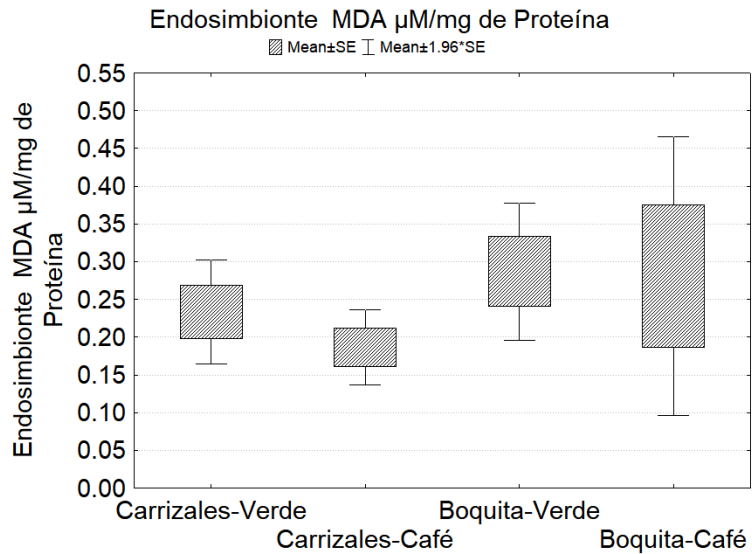
expuestas a dos profundidades. Las concentraciones fueron estadísticamente similares ( $p=0.2$ ) según la Prueba Kruskal Wallis.



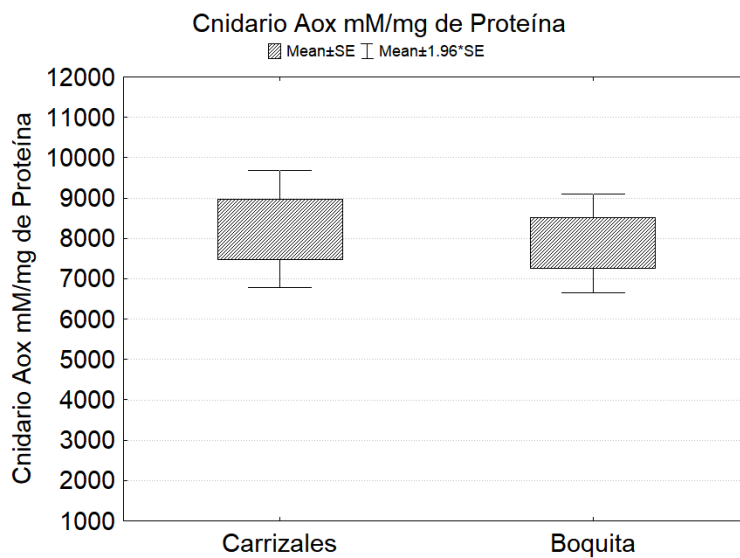
Anexo 15. Concentraciones promedio de MDA en endosimbionte de *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales ( $n=16$ ) y La Boquita ( $n=16$ ). Las concentraciones promedio de ambos arrecifes son estadísticamente similares ( $p=0.2$ ) según la Prueba U de Mann Whitney



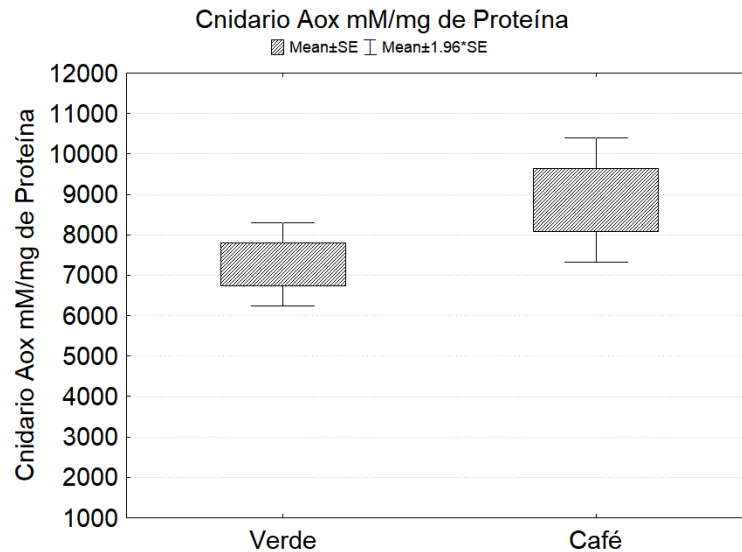
Anexo 16. Concentraciones promedio de MDA en el endosimbionte de *P. verrucosa* de ambas morfologías expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos (n=16). Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney



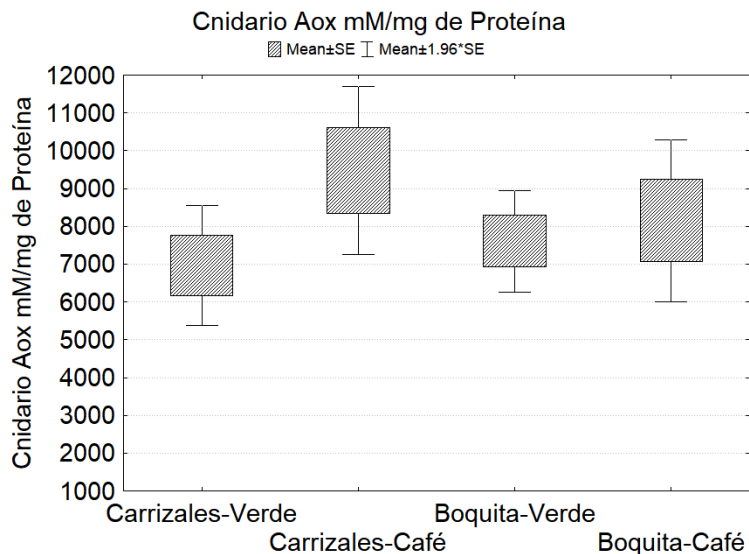
Anexo 17. Concentraciones promedio de MDA en el endosimbionte de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias expuestas a dos profundidades. Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) según la Prueba Kruskal Wallis.



Anexo 18. Concentraciones promedio de la capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del pólipo de *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales (n=16) y La Boquita (n=16). Las concentraciones promedio de ambos arrecifes son estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) según la Prueba U de Mann Whitney

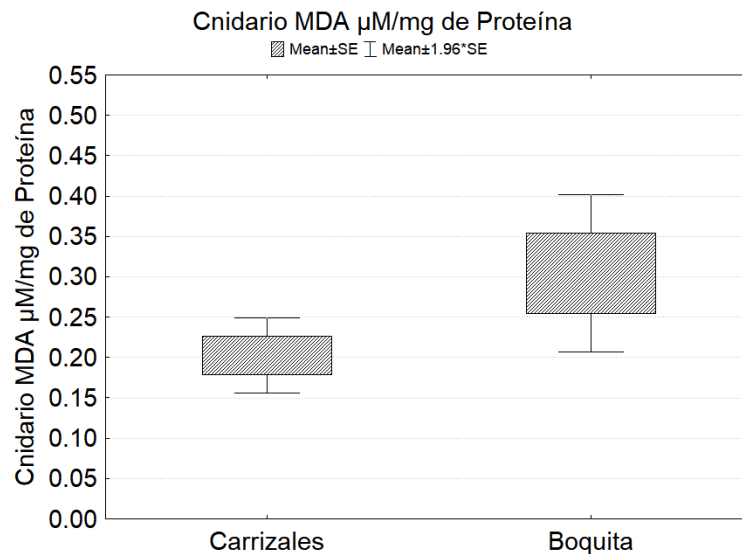


Anexo 19. Concentraciones promedio de la capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del pólipo de del endosimbionte de *P. verrucosa* de ambas morfologías expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos (n=16). Las concentraciones son

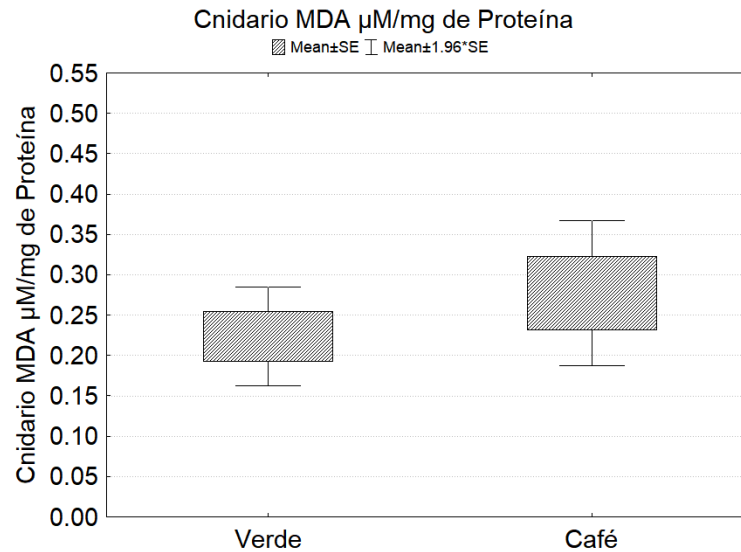


estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney

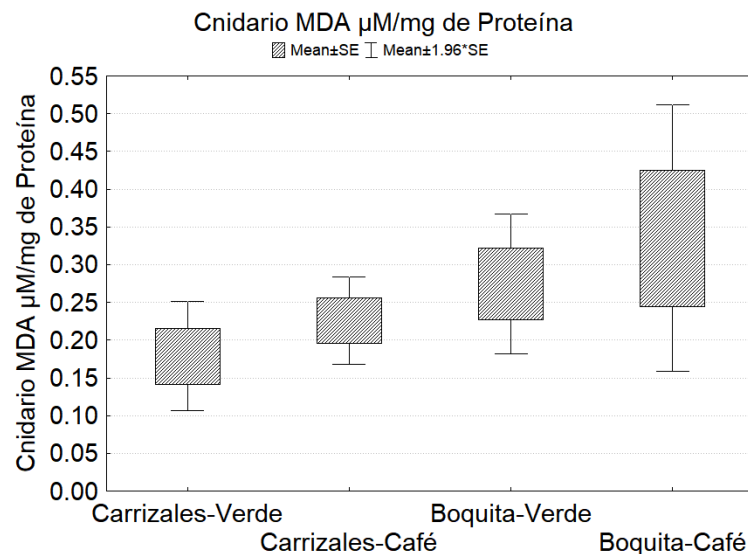
Anexo 20. Concentraciones promedio de la capacidad antioxidante total (mM por mg de proteína) del pólipo de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias expuestas a dos profundidades. Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.2$ ) según la Prueba Kruskal Wallis.



Anexo 21. Concentraciones promedio de MDA en el pólipo de *P. verrucosa* de dos arrecifes coralinos. Las agrupaciones están compuestas por muestras de coral de dos morfologías bajo dos profundidades en los arrecifes de Carrizales ( $n=16$ ) y La Boquita ( $n=16$ ). Las concentraciones promedio de ambos arrecifes son estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) según la Prueba U de Mann Whitney



Anexo 22. Concentraciones promedio de MDA en el pólipo de *P. verrucosa* de ambas morfologías expuestas a dos profundidades de los dos arrecifes coralinos (n=16). Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.1$ ) entre las dos morfologías según la Prueba U de Mann Whitney



Anexo 23. Concentraciones promedio de MDA en el pólipo de *P. verrucosa* de dos morfologías (Verde y Café) en dos arrecifes distintos. Las agrupaciones están conformadas por corales de las dos colonias expuestas a dos profundidades. Las concentraciones son estadísticamente similares ( $p=0.2$ ) según la Prueba Kruskal Wallis