



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE GENES EN
Cladocopium sp. DE DOS ESPECIES DE CORAL EN EL
GOLFO DE CALIFORNIA.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

Sofía Marivel Méndez Mendez

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2020.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:22 horas del día 6 del Mes de febrero del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" Expresión diferencial de genes en *Cladocopium sp.* de dos especies de coral en el Golfo de California"

Presentada por el alumno:

Sofía Marivel Méndez Mendez

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MARINA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Eduardo Francisco Balart Paéz
Co-Director de Tesis



Dr. Michael E. Hallberg
Co-Director de Tesis



Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Co-Tutor



Dr. David Arturo Paz García
Co-Tutor



Dra. Gracia Micia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

Conformación de comité

Comité tutorial

Dr. Eduardo Francisco Balart Paéz.
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director

Dr. Michael E. Hellberg
Louisiana State University
Co-Director

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Programa Cátedras CIBNOR-CONACyT
Co-Tutor

Dr. David Arturo Paz García
Programa Cátedras CIBNOR-CONACyT
Co-Tutor

Comité revisor de la tesis

Dr. Eduardo Francisco Balart Paéz

Dr. Michael E. Hellberg

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Dr. David Arturo Paz García

Jurado del examen

Dr. Eduardo Francisco Balart Paéz

Dr. Michael E. Hellberg

Dr. David Arturo Paz García

Suplente

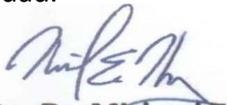
Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Resumen

La simbiosis entre corales y los dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae, depende de la disponibilidad de luz solar que se atenúa con la profundidad y latitud. Los corales *Porites panamensis* y *P. sverdrupi* difieren en morfología, preferencias de sustrato y zonación vertical, pero coexisten en El Requeson, Bahía Concepción, Golfo de California. En este sitio, *P. panamensis* ocurre en rocas en aguas someras mientras que *P. sverdrupi* se distribuye más profundamente como colonias de vida libre asociadas a camas de rodolitos. El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la profundidad y el hospedero (*P. panamensis* y *P. sverdrupi*) sobre la funcionalidad metabólica de los simbiontes *Cladocopium* mediante un análisis de expresión diferencial de los genes sobre expresados de los simbiontes. Para ello fueron recolectados seis fragmentos de cada hospedero y se generaron librerías pareadas de ARN-seq con lecturas de longitud de 150 pares de bases. Se encontraron 11,749 y 15,877 genes expresados por *Cladocopium sp.* en *P. panamensis* y *P. sverdrupi*, respectivamente. De estos, 107 se expresaron diferencialmente ($p < 0.01$): 74 sobre-expresados en *P. panamensis* y 33 sobre-expresados en *P. sverdrupi*. Las funciones en los genes sobre-expresados en *Cladocopium sp.* proveniente del coral de aguas someras, se relacionan con la respuesta a estrés y la reparación del daño al ADN inducido por rayos UV. Los genes sobre-expresados en *Cladocopium sp.* proveniente del coral de aguas profundas presentan funciones asociadas a la degradación de las proteínas y modificaciones postraduccionales, que podrían estar relacionadas con estrés por baja penetración de luz y altos niveles de nutrientes disueltos. Las funciones de estos genes expresados diferencialmente sugieren que la respuesta a estrés de *Cladocopium sp.* puede desempeñar un papel en la adaptación fisiológica a diferentes profundidades y hábitats.

Palabras clave: *Cladocopium*, *Porites*, luz, respuesta a estrés, profundidad.


Bo. Dr. Eduardo F. Balart
Co-director de tesis


Vo. Bo. Dr. Michael B.
Co-director de tesis

Summary

The symbiosis between corals and their algal symbionts hinges on the availability of sunlight, which attenuates with depth and with latitude. Holobionts living near the extremes of where this symbiosis can flourish may reveal critical physiological links in the coral: zooxanthellae relationship. The high-latitude corals *Porites panamensis* and *P. sverdrupi* differ in morphology, substrate preferences, and vertical zonation but co-occur at El Requeson, Concepcion Bay, Gulf of California. *P. panamensis* occurs on rocks in shallow waters at this site, while *P. sverdrupi* occurs deeper as free-living colonies associated with rhodolith beds. The aim of this study was to evaluate the influence of the host (*P. panamensis* and *P. sverdrupi*) and depth in the metabolic functions of *Cladocopium* through differential gene expression analysis. We report differentially expressed genes from *Cladocopium sp.* zooxanthellae from these two hosts. We collected six fragments from each coral host and made RNA-seq paired end libraries of 150 bp read length. We found 11,749 and 15,877 genes expressed by *Cladocopium sp.* in *P. panamensis* and *P. sverdrupi*, respectively. 107 of these were differentially expressed (p -value 0.01): 74 up-regulated in *P. panamensis* and 33 up-regulated in *P. sverdrupi*. Genes over-expressed in the *Cladocopium* of the shallow water *P. panamensis* had molecular functions related to stress response (both general and specifically to temperature) and the repair of UV-induced DNA damage, while over-expressed genes in the *Cladocopium* of the deeper water *P. sverdrupi* were involved in protein degradation and post-translational modifications, which could be related to low light penetration stress and high levels of dissolved nutrients. The functions of these differentially expressed genes suggest that the stress response of *Cladocopium sp.* may play a role in physiological adaptation to different depth and habitats.

Keywords: *Cladocopium*, *Porites*, light, stress response, depth.


Bo. Dr. Eduardo F. Balart
Co-director de tesis


Vo. Bo. Dr. Michael B.
Co-director de tesis

Dedicatoria

A mi amado papi (David) y a mi adorada mami (Marivel). Su amor es la fuerza de mi vida.

A mis hermanitos hermosos, David y Esteban.

A mi Astro Boy el valor de su compañía es indescriptible.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No.636620) y la beca de movilidad en el extranjero para realizar mis estudios de posgrado y estancia de investigación.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) por ser mi casa de estudios durante mi formación académica. Al personal de posgrado, a la Dra. Gracia Gómez Anduro (Directora de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos) quién también fue mi profesora, gracias por su ejemplo, apoyo y dedicación. A la Dra. Norma Hernández Saavedra. A Tania Verónica Núñez Valdez y Lic. Osvelia Ibarra (Departamento de Control Escolar), a la Lic. Leticia González Rubio (Departamento de Becas y Apoyo Estudiantil) y a Horacio Sandoval Gómez, (responsable de Laboratorio de Cómputo), por su apoyo y seguimiento dado en mis actividades académicas, aprecio mucho su disposición y amabilidad para atender a los estudiantes, gracias.

Al proyecto 10023 (PEP) del CIBNOR por su apoyo parcial para el desarrollo de esta investigación.

A la Universidad Estatal de Louisiana (LSU) institución receptora de la estancia de investigación. En específico al laboratorio de Especiación Marina y Evolución Molecular, gracias al Dr. Michael Hellberg, mi codirector, por permitirme ser parte de este proyecto de investigación, por sus brillantes consejos, guía y calidez. Al Departamento 'High Performance Computing' de LSU y su personal de apoyo, por las capacitaciones y la asesoría personalizada. A mis compañeros de laboratorio en LSU Mark Duhon y Alicia Reigel por su apoyo durante la estancia de investigación.

A mi comité tutorial, Dr. Eduardo F. Balart, Dr. David Paz y Dr. Fausto Valenzuela, por su confianza, consejos, amistad, su apoyo incondicional y paciencia, por ser un gran ejemplo como investigadores y personas. Por acompañarme en esta etapa de crecimiento académico.

Al personal del Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes de CIBNOR, en especial a la Dra. Noemi Bocanegra Castillo (Mimí) por su apoyo incondicional, por su cariño en todos los momentos alegres y difíciles.

A la Dra. Cristina Escobedo Fregoso, al M. Sc. Roberto Arredondo y al Dr. Oscar Juárez por su ayuda y asesoría en los análisis bioinformáticos.

A mis amigos de laboratorio del CIBNOR, en especial a Erick Treviño, Francisco Gutiérrez y Andrea Puga, cada momento compartido fue de gran aprendizaje, es una experiencia única contar con su amistad en diferentes facetas desde la academia hasta los jueves culturales.

A mi familia paceña, Marlene y Juan quienes fueron testigos y cómplices de todo mi crecimiento y aprendizaje desde que llegue a La Paz, su presencia y apoyo son muy importantes, gracias. A Violeta, Ernesto, Lupita, Luchis, Ceci, María, Gregorio, Chiringuito, Gara y Dano, su amistad hizo mis días más alegres siempre.

A mi familia en Guatemala por siempre estar al pendiente y ser un gran apoyo, mis padres David y Marivel y mis hermanitos David y Esteban. En especial a Sophia Arrazola, Mynor, Chiva y Barbi. Siempre están en mí corazón.

¡A mis amigos de la maestría, no se puede sobrevivir a un posgrado sin personas tan chileras como ustedes! ¡Muchas gracias!

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
Glosario de Términos	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Condiciones ambientales óptimas para el desarrollo coralino	5
2.2 Corales hospederos: <i>Porites panamensis</i> y <i>Porites sverdrupi</i>	6
2.3 Dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae	7
2.4 Genoma y transcriptoma de Symbiodiniaceae	8
2.5 Estudios de expresión de genes en Symbiodiniaceae	10
2.6 Estudios de Symbiodiniaceae en diferentes rangos de profundidad.....	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
5.1 General	15
5.2 Específicos	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Golfo de California y características de la localidad el Requesón	16
6.2 Recolecta de corales e identificación	18
6.3 Extracción de ARN y generación de librerías.....	18
6.4 Análisis bioinformáticos	19
6.5 Cortar los adaptadores y bases de baja calidad	20

6.6	Ensamble “ <i>De Novo</i> ”	21
6.7	Verificación de calidad del ensamble	22
6.8	Separación de transcritos de coral y simbionte	23
6.9	Análisis de expresión diferencial	24
6.10	Anotación de genes	25
7.	RESULTADOS	27
7.1	Librerías de ARNseq y control de calidad	27
7.2	Ensamble de los holobiontes	27
7.3	Verificación de calidad del ensamble	27
7.4	Separación de transcritos de coral y simbiontes.....	28
7.5	Ensamble global de <i>Cladocopium sp.</i>	31
7.6	Genes expresados diferencialmente	32
7.7	Anotación de genes	33
7.8	Categorías de ontología de genes (GO terms)	36
8.	DISCUSIÓN	42
8.1	Implicaciones ecológicas de los genes expresados diferencialmente: procesos biológicos y función molecular.....	43
8.2	Genes relacionados con la fotosíntesis	47
8.3	Genes relacionados a procesos celulares esenciales	48
9.	CONCLUSIONES	51
10.	LITERATURA CITADA	52
11.	ANEXOS	64

Lista de figuras

Figura 1. a) Sustrato rocoso parte somera. b) Camas de rodolitos a mayor profundidad > 5 metros. C) <i>Porites panamensis</i> unido al sustrato rocoso d) <i>Porites sverdrupi</i> coral de vida libre, sobre rodolitos. Fotografías tomadas en salida de campo 2018.	16
Figura 2. Sitio de recolecta de especímenes El Requesón.....	17
Figura 3. Procedimientos para los análisis bioinformáticos	20
Figura 4. Lecturas de la muestra 134_R1. En el eje y: valores de calidad de Phred, rango entre 40-20 mayor calidad. Eje x: posición de la base en la lectura va de 1 a 149. Barra amarilla: 75% rango intercuartílico. Línea azul: valor medio de calidad.	21
Figura 5. TBLASX hits del ensamblaje <i>P. panamensis</i> contra cuatro bases de datos. El color azul representa el primer filtro que corresponde al e-value, el anaranjado al segundo filtro y el gris la cantidad total de contigs únicos.	29
Figura 6. TBLASTX hits del ensamblaje <i>P. panamensis</i> y las bases de datos exclusivas de simbioses. En gris el total de contigs no ambiguos, exclusivos del simbiote.	29
Figura 7. TBLASX hits del ensamblaje <i>P. sverdrupi</i> contra cuatro bases de datos. El color azul representa el primer filtro que corresponde al e-value, el anaranjado al segundo filtro, y el gris oscuro a la cantidad total de contigs únicos.	30
Figura 8. TBLASTX hits del ensamblaje <i>P. sverdrupi</i> y las bases de datos exclusivas de simbiote. En gris el total de contigs no ambiguos, exclusivos del simbiote.....	31
Figura 9. Agrupamiento jerárquico de DEGs. El mapa muestra los genes (filas) con expresión diferencial (Trinity/DESeq2 > fold 2, FDR 0.001) entre las réplicas (columnas) de <i>Cladocopium sp.</i> de diferentes hospederos.....	33
Figura 10. Genes de <i>Cladocopium</i> únicos para cada especie. A) <i>Cladocopium sp.</i> (holobionte <i>P. panamensis</i>) B) <i>Cladocopium sp.</i> (holobionte <i>P. sverdrupi</i>).	34
Figura 11. Procesos biológicos representados en los genes sobre-expresados en <i>Cladocopium</i> de <i>P. panamensis</i> y <i>P. sverdrupi</i> . Frecuencia de expresión de genes calculada para cada GO a partir del p-value adj. de la expresión diferencial de genes utilizando el Software REVIGO.	39
Figura 12. Funciones moleculares representadas en los genes sobre-expresados en <i>Cladocopium</i> de <i>P. panamensis</i> y <i>P. sverdrupi</i> . Frecuencia de expresión de genes calculada para cada GO a partir del p-value adj. de la expresión diferencial de genes. Utilizando el software REVIGO.....	40
Figura 13. Componentes celulares representados en los genes sobre-expresados en <i>Cladocopium</i> de <i>P. panamensis</i> y <i>P. sverdrupi</i> . Frecuencia de expresión de genes calculada para cada GO a partir del p-value adj. de la expresión diferencial de genes, utilizando el software REVIGO.....	41

Lista de tablas

Tabla I. Transcriptomas de <i>Cladocopium</i> (Clado C)	10
Tabla II. Ensamblados de genomas y/o transcriptomas utilizados para separar los contigs de <i>Porites panamensis</i> y <i>P. sverdrupi</i> de Symbiodiniaceae	23
Tabla III. Estadísticos de los ensamblados “de novo” obtenidos. TTT: total transcritos de trinity, %CG: porcentaje citocina-guanina. Pb: pares de bases. HPp: holobionte <i>P. panamensis</i> . HPs: holobionte <i>P. sverdrupi</i>	32
Tabla IV. Genes sobre-expresados para <i>Cladocopium sp.</i> del hospedero <i>P. panamensis</i> ..	34
Tabla V. Genes sobre-expresados en <i>Cladocopium sp.</i> del hospedero <i>P. sverdrupi</i>	36

Glosario de Términos

Holobionte: se refiere al coral como hospedero y a sus microorganismos asociados, que incluyen a dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae, bacteria, virus, archea, fungi, algas endolíticas y protistas (Peixoto *et al.*, 2017). En el presente estudio se hace referencia a holobionte cuando se habla del coral hospedero y los simbiontes de la familia Symbiodiniaceae.

Genoma: conjunto completo de información genética de un organismo, almacenado en moléculas de ADN, llamadas genes (NIH,2020).

Transcriptoma: conjunto completo de moléculas de ARN codificadas por un genoma (Nature,2014).

Contig: de la palabra continuo, es una serie de secuencias de ADN superpuestas utilizadas para hacer un mapa físico que reconstruye la secuencia original de ADN de un cromosoma o de una región cromosómica (NHGRI, 2020).

Transcrito: fragmento de ARN o ADN que ha sido transcrito respectivamente de un templado ADN o ARN (Nature, 2014). En el presente estudio un transcrito hace referencia a los archivos de salida del software Trinity utilizado para ensamblar el transcriptoma de los holobiontes *P. panamensis* y *P. sverdrupi*.

Porcentaje de GC: representa la cantidad de pares Guanina-Citosina en la molécula de ADN, genoma o transcriptoma que se está investigando. Algunas veces es expresado como razón GC. El contenido de GC es una característica del genoma de un organismo o de cualquier fragmento de ADN o ARN. El contenido GC en porcentaje se calcula: $\frac{G+T}{A+T+G+T} \times 100$ (Madigan & Martinko, 2003).

Lecturas de extremos pareados: se refiere a dos extremos de la misma molécula de ADN, se puede secuenciar un extremo, darle la vuelta y secuenciar desde el otro extremo. Las dos

secuencias que se obtienen son lecturas emparejadas o pareadas, esto permite generar secuencias de alta calidad (Wang *et al.*, 2009).

FDR: tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate, por sus siglas en inglés), es un método para conceptualizar la tasa de errores de tipo I en pruebas de hipótesis nulas cuando se realizan comparaciones múltiples. Es el complemento del valor positivo predictivo (PPV) que es la probabilidad de que, cuando se obtenga un resultado 'significativo' haya un efecto real (Colquhoun, 2014).

N50: (indica que la mitad de las secuencias del transcriptoma está en contigs mayores o iguales a este tamaño), que es un estadístico reportado para ensamblajes de genomas y transcriptomas que describe la calidad del ensamblaje que está fragmentado en contigs de diferentes longitudes en pares de bases (bp) (Tritt *et al.*, 2012; Henson *et al.*, 2012).

GO: Ontología de Genes (Gene Ontology, por sus siglas en inglés) es una iniciativa bioinformática que busca unificar la representación de un gen y los atributos de los productos de un gen de todas las especies. GO es parte de un gran esfuerzo de clasificación como nomenclatura de genes que se enfoca en la función de los genes y sus productos. Posee tres categorías: Componente Celular, Función Molecular y Proceso Biológico. Cada término tiene un nombre y un identificador alfanumérico único (The Gene Ontology Consortium, 2019; Ashburmer *et al.*, 2000).

E-value: el valor esperado que representa el número de alineaciones diferentes con puntajes equivalentes o mejores que S (puntaje calculado en cada alineamiento) que se espera que ocurran en una base de datos por casualidad. Mientras más bajo es el valor más significativo es la alineación (Fassler & Cooper, 2011).

1. INTRODUCCIÓN

Las comunidades coralinas del Golfo de California son ecosistemas productivos de gran diversidad e importancia biológica, ya que albergan especies tropicales cerca de su límite norte de distribución (Iglesias-Prieto *et al.*, 2003). Prestan servicios ambientales que van desde protección de la costa contra huracanes hasta servicios recreacionales (Brander *et al.*, 2007). En el Golfo de California se encuentran 20 especies de corales escleractinios, predominando especies de los géneros *Pocillopora*, *Porites* y *Pavona* (Iglesias-Prieto *et al.*, 2004; Saavedra-Sotelo *et al.*, 2013; Glynn *et al.*, 2017). Los corales del género *Porites* cumplen un rol funcional y estructural importante en los arrecifes del Caribe y del Pacífico y se consideran resistentes a cambios ambientales (Potts *et al.*, 1984; Edmunds, 2011). En el Golfo de California *Porites panamensis* es una especie importante por su amplia distribución y abundancia, mientras que *Porites sverdrupi* es la única especie endémica de la región y con reducida distribución actual (Paz-García *et al.*, 2012; Paz-García y Balart, 2016; Martínez-Castillo *et al.*, 2018).

Las colonias de *Porites panamensis* se distribuyen en las áreas costeras desde el Golfo de California hasta Panamá, desde la orilla hasta los 36 metros de profundidad (Guzmán & Cortés, 2008). Sus poblaciones son abundantes y se encuentran como colonias aisladas o parches con una alta tasa de producción de sedimento carbonatado en el Golfo de California (Halfar *et al.*, 2005; Glynn *et al.*, 2017). Su morfología puede ser masiva o ramificada y alberga simbiosis fotosintéticas del género *Cladocopium* (antes designado como *Symbiodinium*, Clado C) (Walther-Mendoza *et al.*, 2016; Paz-García *et al.*, 2008; LaJeunesse *et al.*, 2008).

Porites sverdrupi es considerada especie endémica del Golfo de California y sus poblaciones han pasado por eventos de extinción local y expansión de su distribución; se encuentran generalmente a más de 20 metros de profundidad (López-Pérez *et al.*, 2003; Paz-García & Balart, 2016). Su morfología es ramificada, lo que le permite ser un coral de vida libre y asociado a camas de rodolitos (Steller & Foster, 1995; Foster *et al.*, 1997).

Porites panamensis y *Porites sverdrupi* se diferencian principalmente por su morfología y distribución vertical en la columna de agua, y también se distinguen por su fijación al sustrato. El primero se fija a sustratos rocosos, conchas de bivalvos, rodolitos vivos o muertos mientras que el segundo permanece libre dado su morfología ramificada (López-Pérez *et al.*, 2013; Paz-García *et al.*, 2016). *P. panamensis* tiene amplia distribución y sus poblaciones son abundantes dentro del Golfo de California mientras que *P. sverdrupi* se reporta solo en tres áreas: Canal de San Lorenzo en la Bahía de La Paz, Isla de Santa Catalina en la Bahía Loreto, y en la playa El Requesón en Bahía Concepción (Glynn *et al.*, 2017; Martínez-Castillo *et al.*, 2018).

En la playa El Requesón en Bahía Concepción del Golfo de California se encuentra *Porites panamensis* en la parte rocosa y somera que va de los 0 a 5 metros de profundidad y *P. sverdrupi* asociada a camas de rodolitos desde 9 metros en adelante. En esta localidad se cuenta con un intervalo de temperatura de 18 °C a 35 °C con alta productividad primaria y bajas concentraciones de aragonita, lo cual es limitante para el crecimiento coralino y puede generar estrés (Halfar *et al.*, 2005; Rodríguez-Meza *et al.*, 2009). La capacidad de los corales de tolerar condiciones ambientales adversas está relacionada con la simbiosis que mantienen con dinoflagelados fotosintéticos de la familia Symbiodiniaceae (Guendulain, 2010; Peixoto *et al.*, 2017; Lewis *et al.*, 2018).

Symbiodiniaceae provee a su hospedero nutrientes orgánicos, oxígeno y energía derivada de su actividad fotosintética mientras que los corales proveen a sus simbiontes de nutrientes inorgánicos, dióxido de carbono y protección (Stat *et al.*, 2006). Existen 7 géneros, *Symbiodinium* (Clado A), *Breviolum* (Clado B), *Cladocopium* (Clado C), *Durusdinium* (Clado D), *Effrenium* (Clado E), *Fugacium* (Clado F), *Gerakladium* (Clado G), dentro de la familia y muchas especies que pueden influenciar las tasas de crecimiento, reproducción y sobrevivencia de sus hospederos ante el estrés ambiental (Helmkamp *et al.*, 2018; LaJeunesse *et al.*, 2010; LaJeunesse *et al.*, 2018). Esta interacción compleja entre coral-dinoflagelado permite a los corales adaptarse localmente a distintos regímenes de luz y

profundidad e influencia los patrones evolutivos tanto del hospedero como del simbiote (Iglesias-Prieto *et al.*, 2004; Prada *et al.*, 2014).

Symbiodiniaceae es un grupo muy complejo y de importancia ecológica y económica. Ha sido estudiado desde distintas disciplinas para comprender su diversidad y función, y como pueden responder frente a cambios climáticos rápidos (Shoguchi *et al.*, 2013; LaJeunesse *et al.*, 2018). En la actualidad, se estudian los genomas los cuales son los sets completos de genes de una célula y el transcriptoma o grupo de genes transcritos de ARN codificados por el genoma en circunstancias específicas (National Human Genome Research Institute, 2015). Estos estudios incluyen interacciones específicas simbiote-hospedero en su hábitat natural o cultivos aislados de simbioses bajo diferentes condiciones controladas de laboratorio (Genikhovich & Technau, 2009; Liew *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017).

Estudios genómicos y transcriptómicos recientes describen las funciones clave en Symbiodiniaceae que les permiten estar adaptados evolutivamente al estilo de vida como endosimbioses (Shinzato *et al.*, 2014; Aranda *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017). En el coral *Porites panamensis* se ha reportado alta diversidad de simbioses a lo largo de su distribución (Golfo de California hasta Costa Rica) del género *Cladocopium sp.*; los simbioses del coral *P. sverdrupi* pertenecen a este mismo género (Méndez, 2016). Por lo que *Cladocopium sp.* presente en estos corales es un buen modelo de estudio para comprender las adaptaciones que se puedan encontrar en el sistema de estudio (coral – profundidad). Existen genomas preliminares publicados que comparan *Cladocopium* con genomas de otros géneros de Symbiodiniaceae brindando información descriptiva del genoma y su adaptación a la simbiosis (Liu *et al.*, 2018; Shoguchi *et al.*, 2018). Sin embargo, no se han realizado estudios comparativos *in situ* a nivel de transcriptoma entre especies de corales de diferentes profundidades que alberguen a *Cladocopium*.

El presente estudio se realizó con la finalidad de comprender la influencia de los simbioses *Cladocopium* sobre la adaptación funcional de dos especies coralinas

congenéricas (*P. panamensis* y *P. sverdrupi*) que habitan las costas del Golfo California a diferentes profundidades, una somera y otra que se distribuye a mayores profundidades, empleando un análisis de expresión diferencial de los genes sobre expresados de los simbioses.

2. ANTECEDENTES

2.1 Condiciones ambientales óptimas para el desarrollo coralino

Los corales escleractinios se encuentran generalmente en aguas tropicales y subtropicales debido a las condiciones ambientales que requieren para su desarrollo y supervivencia. Algunos corales toleran cambios en estas condiciones o están adaptados a un rango específico, mientras que otros pueden ser muy sensibles a estos cambios. Los corales escleractinios se encuentran en declive debido a cambios en la temperatura y acidificación del océano, y otros impactos ambientales (Veron *et al.*, 2009). Las condiciones óptimas para su desarrollo son una temperatura entre 18.4 °C y 23 °C; la luz, debido a que los simbiontes que albergan la necesitan para realizar fotosíntesis y proporcionar energía y nutrientes a los corales; y la saturación de aragonita, que es una fuente de carbono para que los corales puedan construir su esqueleto (Guinotte *et al.*, 2003; Manzello *et al.*, 2008).

Es importante para el desarrollo de corales escleractinios la relación simbiótica que mantienen con dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae. Cambios en las condiciones ambientales óptimas pueden generar una interrupción de esta asociación, y ocurre la pérdida de simbiontes conocida como blanqueamiento del coral (Weis, 2008). Algunos corales y sus simbiontes son tolerantes a diferentes rangos de temperatura, regímenes de luz debido a la profundidad en que se encuentran, pH y altas concentraciones de nutrientes, mientras que algunos pueden ser muy sensibles y poco tolerantes a cambios ambientales drásticos (Dubinsky & Stambles, 2011). Como ejemplo, numerosas colonias de *Pocillopora* en el Golfo de California sufrieron blanqueamiento debido a un descenso de 2-4 °C, debajo del promedio, de la temperatura superficial del océano por evento de enfriamiento en 2008; la pigmentación de la colonia, las densidades celulares de simbiontes, la capacidad del fotosistema II y la mortalidad fueron usadas para evaluar la condición de 84 colonias de *Pocillopora* marcadas y monitoreadas por dos años previo al evento de enfriamiento y blanqueamiento. El 100% de las colonias que albergaban simbiontes tipo C1b-c (*Cladocopium*) sufrieron blanqueamiento y de estas el 56% mortalidad total o parcial, mientras que solamente una colonia de 59, que albergaban simbiontes tipo D1

(*Durusdinium*) sufrió blanqueamiento y mortalidad parcial. Por otro lado, colonias de corales de los géneros *Porites* y *Pavona* asociadas a simbioses de tipo C (*Cladocopium*), no encontrados en las colonias *Pocillopora* no fueron afectadas por el descenso de temperatura en el Golfo de California (Lajeunesse *et al.*, 2010).

2.2 Corales hospederos: *Porites panamensis* y *Porites sverdrupi*

Los corales del género *Porites* presentan una taxonomía compleja. Pueden crecer en muchos ambientes, pero son vulnerables a impactos locales, aislamiento genético y tienen capacidad de dispersión limitada (Paz-García & Balart, 2016; Saavedra-Sotelo *et al.*, 2013). Son importantes formadores de estructuras arrecifales en el Caribe y el Pacífico mexicano.

La especie, *P. panamensis* se encuentra en comunidades de coral en sustratos rocosos que van desde 0 a 36 metros y sus poblaciones son abundantes como colonias aisladas o parches en el Golfo de California y se distribuye hasta Panamá (Guzmán & Cortés, 2008). Se reproduce la mayor parte del año de manera sexual y es una especie gonocórica con transmisión vertical de simbioses, esto es, que las larvas heredan los simbioses de los parentales transmitidos durante la fecundación (Paz-García, 2008c; Chávez-Romo *et al.*, 2013; Byler *et al.*, 2013).

Las poblaciones de *P. panamensis* a lo largo de su distribución están adaptadas a condiciones variantes que incluyen baja salinidad, temperaturas extremas, pH bajo (< 7.8), aguas eutróficas y ventilas hidrotermales (Halfar *et al.*, 2005; Cabral-Tena *et al.*, 2013; Oporto-Guerrero *et al.*, 2018). Se sugiere que el éxito de esta especie es debido a la diversidad genética y capacidad de sus simbioses (*Cladocopium*) de tolerar diversas condiciones ambientales (Oporto-Guerrero *et al.*, 2018; Walther-Mendoza *et al.*, 2016).

Porites sverdrupi es endémica del Golfo de California y sus poblaciones han pasado por eventos de extinción local y expansión de su distribución relacionados a cambios en la temperatura del océano (Paz-García & Balart, 2016). El reporte más reciente de su distribución indica que hay tres sitios con poblaciones saludables: Arrecife San Lorenzo en

Bahía de la Paz, Isla de Santa Catalina en Bahía Loreto, y El Requesón en Bahía Concepción (Martínez-Castillo *et al.*, 2018). Esta especie se encuentra en la categoría ‘vulnerable’ según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) por ser de distribución limitada, susceptible a degradación de su hábitat, enfermedades y temperaturas extremas (Chiriboga *et al.*, 2008).

P. sverdrupi presenta morfología ramificada que le permite ser un coral de vida libre asociado a camas de rodolitos, aunque en estadios iniciales de su desarrollo requiere de un sustrato del cual se desprende (Reyes-Bonilla *et al.*, 1997; Paz-García & Balart, 2016). Se considera que la diversidad genética de esta especie es alta y con flujo genético entre la población de Bahía de Loreto y el Requesón (Martínez-Castillo *et al.*, 2018). A pesar de su importancia como especie endémica de la región ha sido poco estudiada en lo que respecta a su ecología, fisiología, reproducción y simbiosis.

2.3 Dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae

Los dinoflagelados miembros de la familia Symbiodiniaceae son simbiosis fotosintéticos en los arrecifes coralinos, siendo abundantes e importantes en estos ecosistemas debido a su alta productividad (Finney *et al.*, 2010; Pochon *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2015). Pueden encontrarse asociados a varios phylum de metazoos incluyendo Cnidaria, Mollusca, Porifera, Platyhelminthes y eucariotas unicelulares como Foraminifera y Ciliados (LaJeunesse *et al.*, 2018). Difieren en su habilidad de establecer una relación simbiótica con el hospedero ya que algunos son tolerantes a diversas temperaturas, profundidades y distintos niveles de estrés, y otros son muy específicos en cuanto al hospedero y las condiciones ambientales (Dubinsky & Stambles, 2011).

La familia Symbiodiniaceae contiene 9 géneros, antes designados como “clados” de la A a la I, que se diferencian por su morfología, fisiología, ecología, bioquímica, genética y comportamiento (Pochon & Gates, 2010; LaJeunesse *et al.*, 2018). El género *Cladocopium* (antes clado C) es el que surgió más recientemente en el tiempo, y dentro del cual hay dos especies descritas (*C. goreau* y *C. thermophilum*) y muchas variantes no descritas como

especies (ej.C1, Cv1) (Shoguchi *et al.*, 2018). Los corales *P. panamensis* y *P. sverdrupi* albergan simbioses pertenecientes al género *Cladocopium* (Walther-Mendoza *et al.*, 2016; LaJeunesse *et al.*, 2018).

2.4 Genoma y transcriptoma de Symbiodiniaceae

El genoma de Symbiodiniaceae es de 1-5 GB, siendo el más pequeño comparado con el de otros dinoflagelados, debido a su pequeño tamaño celular (Aranda *et al.*, 2017). La duplicación de genes en este grupo es un mecanismo evolutivo que permite expansiones linaje-específicas para estilos de vida simbióticos, especialmente para genes que codifican para transportadores de iones (Shouguchi *et al.*, 2018).

La organización y regulación de los genes incluye la existencia de regiones promotoras inusuales para muchos genes, ADN que contiene 5-hidroximetiluracil (reemplazando 12-70% de timina), una gran dependencia en la traducción para la regulación de genes, y su mecanismo de regulación transcripcional único (Lin, 2011; Bayer *et al.*, 2012). El genoma nuclear es muy largo y utiliza bases de ADN modificadas no encontradas comúnmente en eucariotas. Además, el genoma de los plástidos está contenido en mini-círculos que codifican para 18 genes (Leggat *et al.*, 2011). El genoma nuclear de *Cladocopium* muestra expansiones específicas de dominios repetidos y una alta frecuencia de genes que carecen de intrones (Shouguchi *et al.*, 2018).

Los estudios de genomas y transcriptomas de Symbiodiniaceae indican la capacidad de establecer y mantener la simbiosis con corales, siendo las funciones más representadas: el transporte transmembrana de moléculas, mecanismos de respuesta ante especies reactivas de oxígeno, y protección contra radiación por rayos UV (Gonzalez-Pech *et al.*, 2017). Esto incluye la presencia de una gran cantidad de dominios transportadores de membrana específicos para bicarbonato, amonio, fosfato, lípidos, glicerol, aminoácidos, colina, azúcares, sulfatos, también transportadores generales de iones (Barfield *et al.*, 2018). Los genes involucrados en provisión de nutrientes a sus hospederos son abundantes y están asociados a metabolismo de carbohidratos, lípidos, nucleótidos, energía metabólica, y biosíntesis de glicanos (Aranda *et al.*, 2017).

Los transcriptomas presentan una amplia cantidad de genes asociados con rutas metabólicas de aminoácidos, vitaminas, terpenoides, policétidos, cofactores, biosíntesis de metabolitos secundarios que son genes que no se han encontrado expresados en el hospedero, y esto indica complementariedad molecular entre hospederos y simbioses (Lyn *et al.*, 2017).

Se han identificado los genes involucrados en mecanismos de reconocimiento a hospederos y de transporte de nutrientes; y se reportan diferencias entre las enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis de glicanos ricos en manosa, lo que sugiere que las variaciones en la estructura de las glicoproteínas están relacionadas con la especificidad de reconocimiento del hospedero (Lin *et al.*, 2015). También se han detectado rutas de síntesis de aminoácidos complementarias entre hospederos y simbioses, por ejemplo entre la anemona *Aiptasia pulchella* y *Symbiodinium sp.*, 7 a 12 amino ácidos son sintetizados por el simbiote y traslocados a la anemona (Wang & Douglas, 1999; Lehnert *et al.*, 2014). Entre *Porites australiensis* y *Cladocopium* tipo C15, se reportan aminoácidos sintetizados por ambos, y asparagina sintetizada por el simbiote mientras que la cisteína por el coral (Shinzato *et al.*, 2014).

Hasta la fecha hay tres borradores de genomas públicos de Symbiodiniaceae, y varios transcriptomas disponibles, pero se conoce poco del contenido de genes o la función biológica y sus variaciones entre y dentro de cada género (González-Pech *et al.*, 2017). La tabla I resume algunos datos de transcriptomas públicos de *Cladocopium sp.* como el número total de secuencias y el N50.

Tabla I. Transcriptomas de *Cladocopium* (Clado C).

Aislado de:	tipo	Número de secuencias	N50 (bp)	Largo total (Mbp)	Sitio de colecta	Referencia
<i>Acropora hyacinthus</i>	C	26,986	534	12.546	America Samoa	Ladner <i>et al.</i> , 2012
<i>Montipora digitata</i>	C	55,588	687	30.570	Aquarium culture stock	González-Pech <i>et al.</i> , 2017b
<i>Siderastrea siderea</i>	C	65,683	1,746	97.581	Belice	Davies <i>et al.</i> , 2016
cultivo	C1	45,782	1,443	45.706	MMETSP	Keeling <i>et al.</i> , 2014
<i>Acropora tenuis</i>	C1	116,479	1,323	106.169	Symbiont Culture Facility at the AIMS	Levin <i>et al.</i> , 2016
cultivo	C15	37,277	1,299	33.008	MMETSP	Keeling <i>et al.</i> , 2014
<i>Porites australiensis</i>	C15	26,627	1,571	32.01	Okinawa, Japón.	Shinzato <i>et al.</i> , 2014

METSP: Marine microbial eukaryote transcriptome sequencing project. AIMS: Australian Institute of Marine Science

2.5 Estudios de expresión de genes en Symbiodiniaceae

La mayoría de los estudios de expresión de genes en corales y sus simbiontes, relacionados con distintas condiciones de estrés térmico, ciclos de luz y oscuridad, niveles de CO₂ simulando distintos niveles de acidificación, se han desarrollado bajo condiciones controladas de laboratorio y con cultivos aislados de simbiontes (Bayer *et al.*, 2012; Barshis *et al.*, 2014; Gierz *et al.*, 2017; Rivest *et al.*, 2018). Algunos estudios contrastan ambientes naturales que presentan diferencias en temperatura del agua, por provenir de sitios de latitudes diferentes y sitios con distintos niveles de eutrofización (Lin *et al.*, 2017; Barfield *et al.*, 2018).

Los estudios enfocados y utilizando distintos niveles de estrés térmico, han encontrado genes sobre expresados que codifican para proteínas de respuesta a estrés, genes antioxidantes y proteínas de choque térmico, incluyendo factores de transcripción y moléculas chaperonas, proteínas de reparación de daño al ADN, genes relacionados a la

fotosíntesis y genes implicados en regulación del ciclo celular (Gierzs *et al.*, 2017). Los genes diferencialmente expresados por estrés debido a aguas eutróficas se asocian a plasticidad fisiológica de los simbioses. Los genes afectados están relacionados a la biosíntesis de metabolitos secundarios, al transporte de nutrientes, procesamiento de proteínas en el retículo endoplasmático, ribosomas, fotosíntesis y regulación del ciclo circadiano (Lin *et al.*, 2017).

Los estudios de expresión de genes realizados en diferentes hospederos y simbioses concuerdan en que múltiples factores, como adaptación local a distintos ambientes y diferentes combinación coral-simbionte, son importantes para modelar las tasas y patrones espaciales de adaptación de los corales frente al calentamiento global, la capacidad de respuesta y adaptación al ambiente por parte de los dinoflagelados Symbiodiniaceae (González-Pech *et al.*, 2017; Barfield *et al.*, 2018).

2.6 Estudios de Symbiodiniaceae en diferentes rangos de profundidad

Los corales escleractíneos se distribuyen en toda la zona fótica, donde están expuestos a gradientes de luz de diversos ordenes de magnitud que dependen de la profundidad, y esto da como resultado patrones de zonación vertical de los corales (Veron, 2000; Iglesias-prieto *et al.*, 2004). Este patrón de zonación batimétrico sugiere la hipótesis de que diferentes tipos de dinoflagelados simbióticos permiten a sus hospederos adaptarse y aclimatarse a un rango fótico de hábitats. Esto se evidenció en un estudio que utilizó enzimas de restricción para caracterizar taxonómicamente los simbioses de algunas especies de corales del género *Montastraea*, encontrándose diferencias significativas en la distribución de ellas a diferentes profundidades (0-6 y 6-14 metros) (Rowan & Knowlton, 1995). La función ecológica de Symbiodiniaceae y especificidad de hospedero asociada a diferencias en profundidad también ha sido encontrada en los corales *Madracis mirabilis* y *M. pharencis*, donde los simbioses *Breviolum* tipo B13 y el B15 están restringidos a aguas someras (1- 25 metros) y profundas (25 – 40 metros), respectivamente (Frade *et al.*, 2008).

En el Golfo de California Iglesias-Prieto y colaboradores (2004) entregan evidencia del comportamiento fisiológico diferencial de los simbioses de dos especies de corales escleractíneos dominantes en los arrecifes, *Pocillopora verrucosa* y *Pavona gigantea*, distribuidos en áreas someras y profundas respectivamente. Mediante mediciones de la irradiancia y fluorescencia *in situ* así como luego de trasplantes a las profundidades de la otra especie coralina, demuestran que los simbioses que alberga cada especie están adaptados a un régimen particular de luz, siendo un aspecto importante para entender la diversificación de nichos. Demostraron que a 2.5 m de profundidad la irradiancia es 4 veces mayor que a 9.5 m. Al mismo tiempo verificaron la identidad de los simbioses genéticamente en muestras de ambas especies coralinas, y concluyen que los simbioses explican los patrones de distribución vertical de los corales *Pocillopora verrucosa* (0-6 m, simbiote *Durusdinium* tipo D1) y *Pavona gigantea* (6-14m, simbiote *Cladocopium* tipo C1c). Los resultados sugieren la capacidad diferencial de los simbioses de ajustar su aparato fotosintético a sub-saturaciones de intensidades de luz. Además, en este estudio señalan que presiones geográficas y de selección local pueden también influenciar las interacciones específicas entre hospederos y simbioses, y la capacidad de los simbioses de especializarse a un hospedero en una región particular (Iglesias-Prieto *et al.*,2004).

3. JUSTIFICACIÓN

El coral *Porites panamensis* posee una gran importancia por ser uno de los principales formadores de comunidades arrecifales del Pacífico oriental desde el Golfo de California hasta Panamá. Por el contrario, el coral *Porites sverdrupi* es endémico del Golfo de California y se encuentra dentro de la categoría de vulnerable según la UICN, ya que sus poblaciones son susceptibles a eventos de extinción local. La simbiosis que mantienen estos corales con dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae les permite adaptarse y sobrevivir a diversas condiciones, por lo que es de gran importancia a distintos niveles, evolutiva y ecológicamente. Esta investigación aporta conocimiento a nivel molecular sobre los simbiosites *Cladocopium sp.* asociados a *P. panamensis* y *P. sverdrupi*, del Golfo de California ofreciendo los primeros estudios a nivel de expresión de genes para *Cladocopium sp.* a diferentes profundidades y diferentes hospederos, aportando valiosa información sobre los procesos biológicos y función molecular que desempeñan estos simbiosites en sus hospederos. Esta información ayudará a entender como responden los genes de diferentes especies a diferentes condiciones y les permite estar adaptados localmente en su ambiente natural, así como a las consecuencias probables ante cambios significativos en su entorno, como los niveles del mar.

4. HIPÓTESIS

Los dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae poseen diferencias evolutivas, ecológicas, moleculares y funcionales que les ha permitido adaptarse a diferentes ambientes, regímenes de luz, y hospederos de manera específica, por esto, en este estudio se espera encontrar diferencias en la expresión de genes del transcriptoma de *Cladocopium* *sp.* proveniente de los hospederos *P. panamensis* y *P. sverdrupi* distribuidos a diferentes profundidades en la localidad de El Requesón, Bahía Concepción, Golfo de California.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Comprender la función de *Cladocopium sp.* en los corales *P. panamensis* y *P. sverdrupi* de la localidad el Requesón, Golfo de California.

5.2 Específicos

Determinar la expresión diferencial de genes del transcriptoma *Cladocopium sp.* de las dos especies de coral.

Identificar las funciones moleculares y procesos biológicos implicados en los genes diferencialmente expresados de *Cladocopium sp.*

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Golfo de California y características de la localidad el Requesón

El Golfo de California presenta un gradiente de temperaturas que van desde 13 °C en invierno hasta 34 °C en verano y se ve afectado por fenómenos decadales como el Niño y la Niña que ocasionan anomalías en el calentamiento y enfriamiento en la temperatura superficial del océano, respectivamente (Fielder, 2002; Manzello *et al.*, 2008). Presenta también un gradiente en concentraciones de clorofila y bajas concentraciones de aragonita (Halfar *et al.*, 2005; Lluch-Cota *et al.*, 2007). Algunas especies de coral en el Golfo de California presentan patrones de distribución vertical debido al régimen de luz al que están adaptados sus simbiontes que les permiten vivir a profundidades específicas (Iglesias-Prieto *et al.*, 2004).

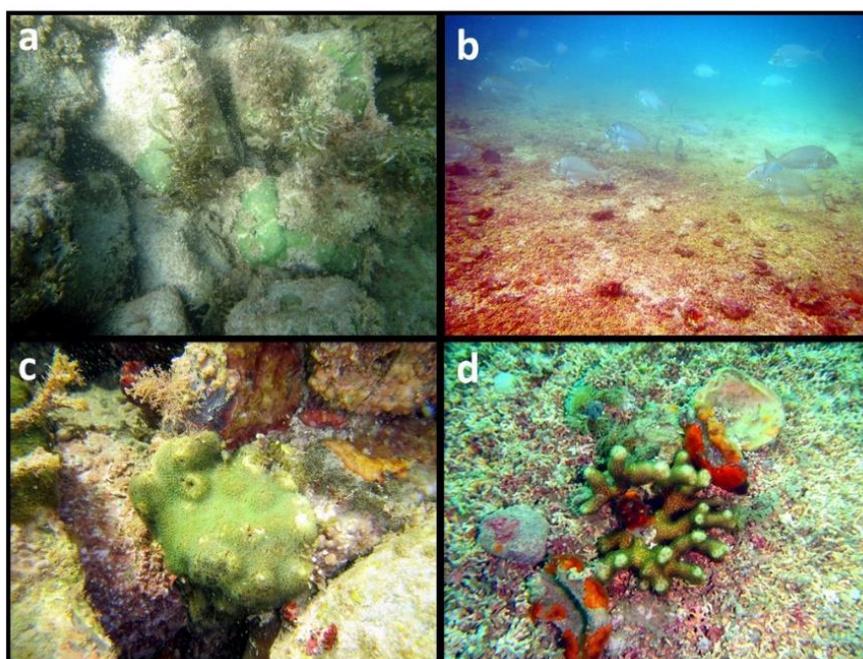


Figura 1 a) Sustrato rocoso parte somera. b) Camas de rodolitos a mayor profundidad > 5 metros. c) *Porites panamesis* unido al sustrato rocoso d) *Porites sverdrupi* coral de vida libre, sobre rodolitos. Fotografías tomadas en salida de campo 2018.

El Requesón, se encuentra dentro de la Bahía Concepción en Golfo de California donde se reporta un intervalo de temperatura de 18 a 35 °C (Rodríguez-Meza *et al.*, 2009).

La parte somera (0 a 5 metros aprox.) posee una cobertura rocosa con presencia del coral *Porites panamensis* y a mayor profundidad (> 5 metros) se encuentran los corales de vida libre *Porites sverdrupi* asociados a camas de rodolitos (Steller & Foster, 1995; Reyes-Bonilla *et al.*, 1997). En este sitio la penetración de luz disminuye con el aumento de profundidad como consecuencia de concentración de nutrientes y sedimentos disueltos por la acumulación de metales como arsénico, mercurio, hierro y sulfatos que precipitan, se disuelven y dispersan en la Bahía (Forrest *et al.*, 2005; Leal-Acosta *et al.*, 2013).

El Requesón es un sitio natural donde es posible encontrar a los corales *P. panamensis* y *P. sverdrupi* distribuidos a diferentes profundidades en la columna de agua. Este patrón de zonación vertical que permite el estudio de sus simbioses para comprender aspectos sobre su ecología y función molecular.

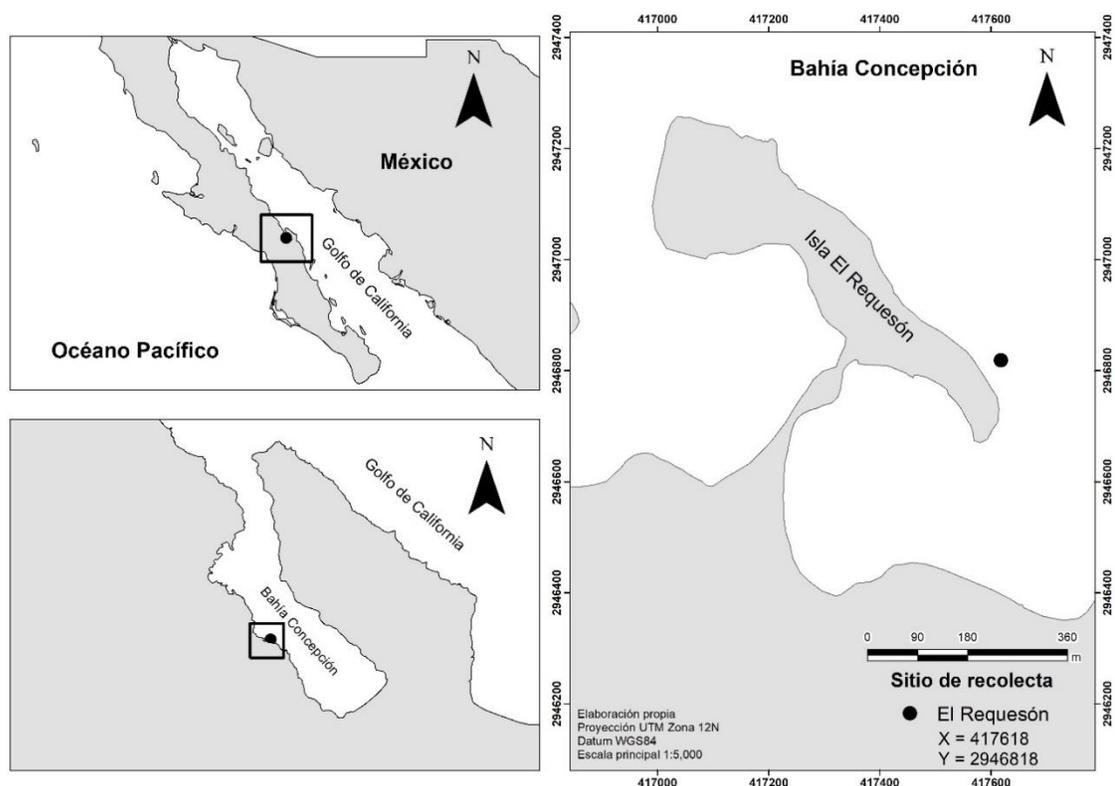


Figura 2. Sitio de recolecta de especímenes El Requesón

6.2 Recolecta de corales e identificación

Se recolectaron 12 fragmentos de coral de seis colonias de *Porites panamensis* y seis colonias de *Porites sverdrupi* en la localidad el Requesón, dentro de la Bahía Concepción en el Golfo de California. La recolecta se realizó a dos estratos de profundidad: somero (1-5 metros) y profundo (9 a 14 metros). De cada fragmento se tomó nota de la profundidad y registro fotográfico de la colonia. Los fragmentos de 1x1 cm fueron preservados en el buffer RNA later y luego almacenados a - 20°C hasta la extracción de ARN.

La identificación de los corales en el campo se basó en su morfología. Sin embargo, debido a la plasticidad morfológica que poseen las especies de coral se realizó una extracción de ADN y amplificación por PCR (Polimerase Chain Reaction) para corroborar las especies de coral, utilizando los marcadores mitocondriales específicos ND5, ND4, ND1 para distinguir entre especies del género *Porites* (Paz-García *et al.*, 2016). Las condiciones de PCR se encuentran descritas en Paz-García *et al.* (2016). Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar al laboratorio de Genomics Facility del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Estatal de Louisiana (LSU, Louisiana State University, por sus siglas en inglés).

Los cromatogramas de las secuencias obtenidas fueron analizados mediante el programa Codon Code Aligner y alineadas en MEGA7. Posteriormente, se realizaron análisis de diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) con el programa DnaSP6 (Rozas *et al.*, 2017) transformadas a formato roedhl para la construcción de la red de haplotipos mediante el método de 'Median Joining' en el programa Network v.5.0. (fluxus-engineering.com). Finalmente, se verificó la concordancia morfológica y genética de los corales colectados.

6.3 Extracción de ARN y generación de librerías

Para la extracción de ARN total se utilizó el kit de extracción RNeasy Plus Mini kit (QIAGEN) (Shinzato, 2014) siguiendo el protocolo de fabrica (Lin *et al.*, 2017). Las librerías fueron generadas usando el kit para Illumina NEBNext Ultra directional RNA Library Prep, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se describen a continuación brevemente:

primero se realizó la purificación de ARN mensajero utilizando micro-esferas magnéticas poly-T, seguido de una fragmentación y pegado de cebadores para la síntesis de la primera y segunda cadena de cDNA. Luego se purificó la doble cadena de cDNA usando micro-esferas AMPure XP y se realizó la reparación de colas al agregar dA para preparar las dobles cadenas de cDNA y ligar los adaptadores Illumina. Se realizó una segunda purificación con micro-esferas AMPure XP, seguido del enriquecimiento por PCR y ligado de primers de identificación para cada librería. Finalmente, se purificó la reacción de enriquecimiento mediante micro-esferas AMPure XP.

Las librerías fueron enviadas para verificación de calidad mediante un Bioanalyzer (Agilent High Sensitivity Chip) al laboratorio de Genomics Facility del Departamento de Ciencias Biológicas de LSU. El análisis realizado para comprobar la calidad fue un ensayo de ADN de alta sensibilidad (High sensitivity DNA assay). Luego se realizó la secuenciación simultánea de transcriptomas de hospederos (*Porites panamensis* y *P. sverdrupi*) y simbioses (*Cladocopium* sp.) usando la plataforma Illumina-HiSeq3000/4000 en, Oklahoma Medical Research Foundation NGS Core, generando lecturas pareadas de 150 pb (pares de bases).

6.4 Análisis bioinformáticos

Todos los análisis bioinformáticos fueron realizados en el servidor de la Universidad Estatal de Luisiana (LSU) en el cluster SuperMike-II (mike.hpc.lsu.edu), el cual posee 146 TFlops Peak Performance con 440 nodos que ejecuta el sistema operativo Red Hat Enterprise Linux 6. A este servidor es posible acceder por medio de una plataforma segura (SSH), utilizando tu propia cuenta y contraseña asignadas por High Performance Computing de LSU. La memoria por nodo disponible es de 32/64/256 GB para ejecutar trabajos. La figura 3 muestra el resumen de los procedimientos realizados, que luego serán descritos.

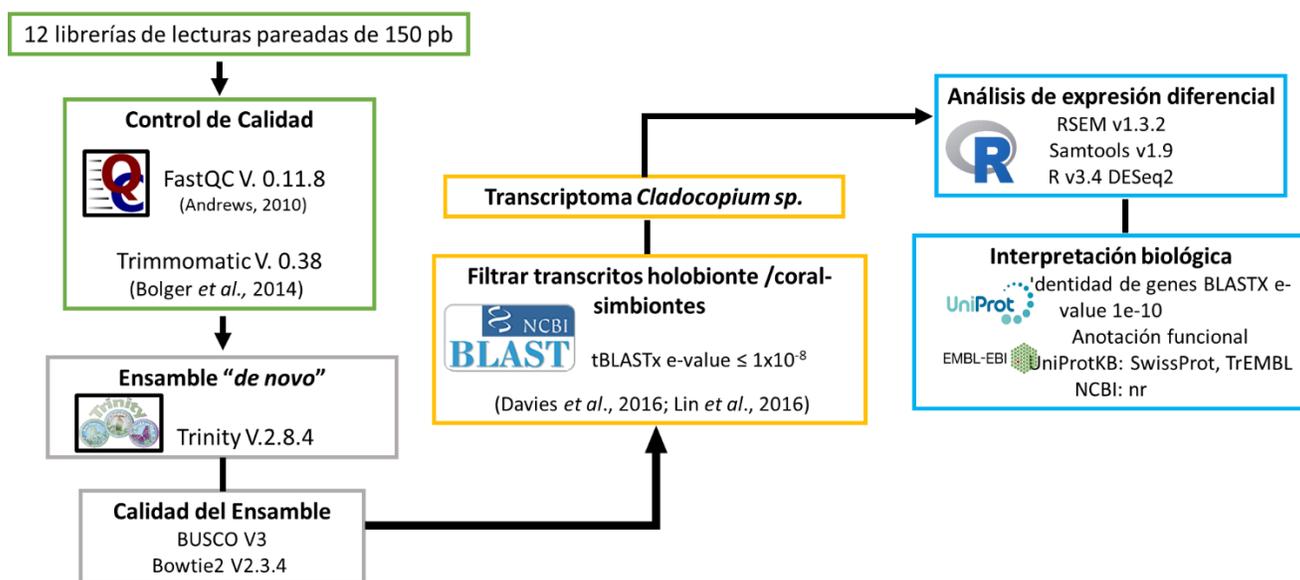


Figura 3. Procedimientos para los análisis bioinformáticos

6.5 Cortar los adaptadores y bases de baja calidad

Para revisar la calidad de las lecturas obtenidas se utilizó el software FastQC v. 0.11.8 (Andrews, 2010). Éste muestra estadísticos de calidad de las lecturas obtenidas para cada librería, cuantifica las lecturas, el porcentaje de GC (guanina y citosina), el contenido de cada base nucleotídica, la longitud de las lecturas, y el valor de calidad de Phred (Q) de cada base se calculó bajo la fórmula:

$$Q = -10 \log_{10}(P) \quad (1)$$

donde,

Q= calidad de Phred

P= probabilidad de que la base sea errónea

Posteriormente, se eliminaron los adaptadores y las bases de mala calidad mediante el software Trimmomatic 0.38 (Bolger *et al.*, 2014). Los parámetros de calidad fueron: escaneo de las lecturas con un slidingwindow de 10 pb de ancho, cortando cuando la calidad media por base de la lectura caía debajo del valor de Phred de 20. Las lecturas con longitud menor de 60 pb fueron descartadas.

Luego de realizado el corte, se corrieron los resultados nuevamente en el programa FastQC para observar la calidad de las librerías, además de obtener los estadísticos básicos como %CG y número total de lecturas. A continuación, en la figura 4 se observa un ejemplo de una librería cruda y luego de cortar adaptadores y bases de mala calidad.

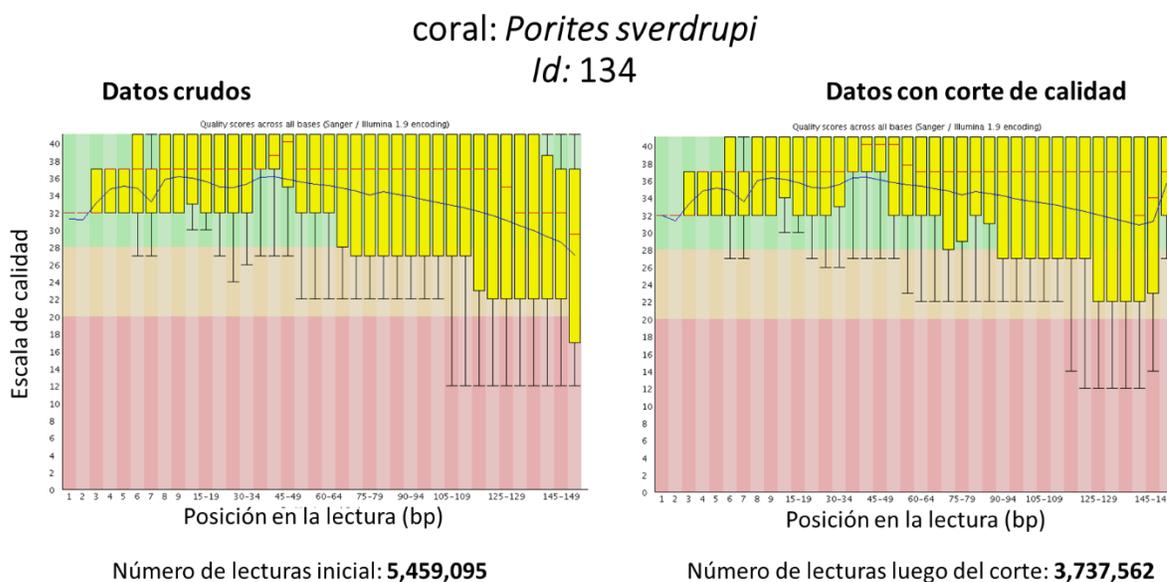


Figura 4 Lecturas de la muestra 134_R1. En el eje y: valores de calidad de Phred, rango entre 40-20 mayor calidad. Eje x: posición de la base en la lectura va de 1 a 149. Barra amarilla: 75% rango intercuartílico. Línea azul: valor medio de calidad.

6.6 Ensamble “*De Novo*”

Un ensamble “*de novo*” construye una lista de transcritos que proveen una buena representación del transcriptoma, usando las lecturas de RNA-seq las cuales son muy utilizadas para estudiar organismos no modelo (Lafond-Lapalme *et al.*, 2017). Para ensamblar los transcritos del hospedero y simbiote se utilizó el software Trinity (Grabherr *et al.*, 2011; Hass *et al.*, 2013). El software Trinity depende de otros programas para funcionar: Jellyfish (k-mer counting software), Fastool (fasta and fastq format Reading and conversión), bowtie2, Python, jdk y samtools. Para la presente investigación se realizaron tres ensambles *de novo*; uno para cada holobionte (incluye hospedero y simbiotes) (*P. panamensis* y *P. sverdrupi*) y un ensamble global con los dos corales. Este último, tomando

en cuenta que los transcritos de los hospederos serán excluidos del ensamble por ser de interés solamente los transcritos de *Cladocopium sp.*

Los parámetros utilizados para los ensambles “de novo” fueron: lecturas tipo “fq”, máximo de memoria utilizada 200 Gigas, 16 núcleos del servidor por nodo, orientación de las lecturas cadena-específica “RF”, lecturas pareadas “left” y “right”. De los archivos de salida generados por Trinity, se conservó únicamente el archivo con extensión “.fasta” que contiene el ensamble.

6.7 Verificación de calidad del ensamble

Se revisaron las estadísticas básicas de los ensambles “de novo” con la herramienta TrinityStats.pl que incluye en paquete de software Trinity. Esta herramienta proporciona el total de genes y transcritos ensamblados, el porcentaje de GC, el valor N50, la longitud media y promedio de los transcritos y el número total de bases ensambladas (Hass *et al.*, 2013).

Posteriormente, se evaluó la calidad e integridad de cada ensamble mediante el programa BUSCO v. 3.0.2 (Seppey *et al.*, 2015). BUSCO utiliza grupos de genes ortólogos de una sola copia anotados en bases de datos propias del programa, para brindar una medida cuantitativa de la integridad de los ensambles de genomas y/o transcriptomas en términos de contenido de genes esperado. BUSCO utiliza los modelos de Markov del programa HMMER v.3.1b2 (Eddy, 2009) y predicciones *de novo* del programa Augustus 3.2.1 (Stanke *et al.*, 2008), y requiere también los programas Python y BLAST+. Mediante BUSCO, se evaluó la expectativa evolutiva del contenido de genes de los ensambles de los holobiontes *P. panamensis* y *P. sverdrupi*, contra las bases de datos de genes ortólogos de ‘Metazoa’ y ‘Protista’ (www.orthodb.org). Se utilizaron estas dos bases de datos ya que son las que mejor se adecuan a los organismos de estudio. Los resultados de la ejecución de BUSCO se muestran en términos de porcentaje para la base de datos que fue utilizada bajo las siguientes categorías: (C) genes ortólogos completos, (S) con una sola copia, (D) duplicados, (F) fragmentados y (M) ausentes. Se realizó un mapeo de las lecturas de las librerías a cada transcriptoma con el fin de conocer que tan bien se incorporaron las lecturas al

transcriptoma, e identificar la posición de origen de las lecturas en el ensamble, mediante el programa Bowtie2 v.2.3.4.1 (Langmead, 2012).

6.8 Separación de transcritos de coral y simbiote

Para distinguir entre los transcritos correspondientes a hospederos y simbiotes, se hizo un mapeo de las lecturas de nucleótidos con especies ya codificadas mediante la herramienta BLAST. Esta herramienta ha sido utilizada para identificar secuencias similares compartidas, basado en alineamientos locales entre una secuencia de consulta y una secuencia objetivo de una base de datos (González-Pech *et al.*, 2018). Para ello, se crearon cuatro bases de datos con 16 ensambles de genomas y transcriptomas disponibles/públicos hasta el mes de agosto de 2018 para corales y Symbiodiniaceae (Tabla II). Las bases de datos fueron clasificadas de la siguiente manera 1) Hospedero 2) Symbiodiniaceae 3) corales aposimbióticos (libres de simbiotes) y 4) Symbiodiniaceae cultivado (Davies *et al.*, 2016; Rivest *et al.*, 2018). Las bases de datos 1 y 2 provienen de fragmentos de coral (hospedero + simbiotes) y podrían contener contaminación de cnidario o simbiotes. La tercera base de datos son ensambles libres de simbiotes (corales aposimbióticos), es decir, de corales en estado larvario que no poseían ningún tipo de simbiote asociado. Los ensambles de la última base de datos contienen secuencias de Symbiodiniaceae de vida libre o provienen de líneas de cultivo en laboratorio libres de secuencias contaminantes de hospederos.

Tabla II. Ensamblados de genomas y/o transcriptomas utilizados para separar los contigs de *Porites panamensis* y *P. sverdrupi* de Symbiodiniaceae

Referencia	Base de datos	Fuente
<i>Acropora hyacinthus</i>	Coral	Barshis <i>et al.</i> , 2013
<i>Acropora millepora</i>	Coral	Moya <i>et al.</i> , 2012
<i>Porites astreoides</i>	Coral	Kenkel <i>et al.</i> , 2013
<i>Porites astreoides</i>	Coral	Mansour <i>et al.</i> , 2016
<i>Porites rus</i>	Coral	Wibberg, D. 2018 submitted
<i>Acropora digitifera</i>	Apocoral	Shinzato <i>et al.</i> , 2011
<i>Acropora hyacinthus larva</i>	Apocoral	Meyer <i>et al.</i> , 2012
<i>Acropora tenuis</i>	Apocoral	Matz lab
<i>Porites lutea</i>	Coral	Liew <i>et al.</i> , 2016
<i>Galaxea fascicularis</i>	Coral	Lin <i>et al.</i> , 2017`

<i>Symbiodinium goreau</i> C1	Sym	Liu <i>et al.</i> , 2018
<i>Symbiodinium sp. Clade C</i> Y103	Sym_Cultivado	Shoguchi <i>et al.</i> , 2018
<i>Symbiodinium microadriaticum</i> A	Sym_Cultivado	Aranda <i>et al.</i> , 2017
<i>Symbiodinium sp. Clade A</i> Y106	Sym_cultivado	Shoguchi <i>et al.</i> , 2018
<i>Symbiodinium Clade C</i>	Sym	Ladner <i>et al.</i> , 2012
<i>Symbiodinium Clade D</i>	Sym	Ladner <i>et al.</i> , 2012

Las bases de datos fueron indexadas en Blast, y se realizaron búsquedas de Blast traducidas (tblastx v2.4.0, Camacho *et al.*, 2009), del transcriptoma ensamblado del coral (hospedero y simbioses) contra las 4 bases de datos siguiendo el procedimiento descrito por Davies *et al.* (2016). En él, si un contig del transcriptoma del coral posee un traslape de aminoácidos > 50 pb con 80% de identidad (cut-off) a cualquier secuencia de cnidarios será considerado como contig del hospedero, por otro lado, si el mismo contig tuvo un traslape de 50 pb con 80% de identidad con alguna secuencia de Symbiodiniaceae cultivado, fue removido del transcriptoma del hospedero.

Los contigs de Symbiodiniaceae fueron identificados de la misma manera, removiendo los contigs que se asignen a la base de datos de coral aposimbiótico con un traslape en las secuencias de aminoácidos de 50 pb y 80% de identidad. Luego del filtrado los contigs que presentaron buen traslape con las bases de datos de Blast coral aposimbiótico y Symbiodiniaceae cultivado, fueron removidas porque no es posible determinar su origen. Esta aproximación conservadora aumenta la confianza en que los transcritos de Symbiodiniaceae encontrados si pertenecen al simbionte y no al hospedero.

Luego de remover los contigs que pertenecen al hospedero y los contigs ambiguos (presentes en Symbiodiniaceae y en coral), queda el ensamble de transcriptoma de los simbioses de interés (*Cladocopium sp.*), con el que se generaron las estadísticas del ensamble utilizando Trinitystats.pl. Luego se procedió a los análisis de expresión diferencial y anotación de genes expresados diferencialmente.

6.9 Análisis de expresión diferencial

Se utilizó el ensamble global de *Cladocopium sp.* para los análisis de expresión diferencial. Para la estimación de la abundancia y cuantificación de los transcritos se utilizó

el software RSEM v1.3.1 (Li & Dewey, 2011). Luego, se realizó la construcción de matrices de conteo utilizando la función de Trinity ‘abundance stimate to matrix’.

El número significativo de genes expresados diferencialmente (DEGs) se calculó con el paquete DESeq2 de R 1.10.1 (Wright *et al.*, 2015; Barfield *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2017) que provee rutinas estadísticas para determinar la expresión diferencial en datos digitales de expresión de genes usando un modelo basado en distribución binomial negativa (Love *et al.*, 2014). Los parámetros utilizados para considerar un gen diferencialmente expresado fueron el valor de Log2FoldChange > 2 y un valor de P < 0.01. Los valores de P resultantes fueron ajustados con una tasa de corrección de descubrimiento falso (FDR, False Discovery Rate por sus siglas en inglés) usando el método de Benjamini-Hochberg utilizado previamente en estudios transcriptómicos con corales (Lin *et al.*, 2017; Barfield *et al.*, 2018). El mapa de expresión diferencial fue generado utilizando heatmap2 como paquete de R (Lin *et al.*, 2017).

6.10 Anotación de genes

Para identificar los genes de *Cladocopium sp.* que se expresaron diferencialmente en cada hospedero se anotaron por medio de BLASTx (busca en bases de datos de proteínas usando un *query* traducido de nucleótidos) con un valor de e-value $\leq 1 \times 10^{-10}$ (Davies *et al.*, 2016; Ladner *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2017), utilizando la base de datos de Swiss-Prot (a manually annotated and reviewed protein sequence database) (Lin *et al.*, 2017), la base de datos de TrEMBL (automatically annotated and not reviewed) y la base de datos nr (non-redundant protein data base) de la NCBI (por sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information). Este procedimiento también se realizó para identificar los genes de *Cladocopium sp.* de cada coral (*P. panamensis* y *P. sverdrupi*) que luego fueron ingresados al programa Venny v.2.1., el cuál utiliza los ID de cada gen identificado y compara los genes exclusivos para cada grupo y los genes compartidos. Se generó una base de datos con todos los ID's de transcritos los cuales tuvieron *hit* con las bases de datos de proteínas.

La anotación funcional se realizó asignando las categorías de ontología génica GO terms (Gene Ontology, por sus siglas en inglés), proceso biológico, función molecular y

componente celular de cada gen anotado, mediante un análisis de GO terms en la base de datos de UniProtKB (Uniprot Protein Knowledgebase) que contiene información de proteínas anotadas, revisadas y validadas por un curador. Los términos de GO, obtenidos para los genes expresados diferencialmente, fueron graficados con el software REVIGO para cada categoría según los valores de P de la expresión diferencial para gen (Supek *et al.*, 2011). Este software utiliza los Go terms asignados para cada gen y los resume removiendo los términos redundantes. Los análisis pueden ser visualizados como gráficos de dispersión, gráficos de interacción de procesos o nubes de etiquetas. Los resultados se presentan en gráficos de frecuencias para cada categoría.

7. RESULTADOS

7.1 Librerías de ARNseq y control de calidad

Se obtuvieron 12 librerías pareadas con lecturas de longitud de 150 pares de bases (bp). Se eliminaron los adaptadores y las lecturas de baja calidad. En el anexo A se observa el número de lecturas eliminadas luego de este proceso, el porcentaje de citocina y guanina para cada librería luego del corte de calidad, y el número total de lecturas a ensamblar para cada holobionte.

Las librerías poseen más de medio millón de lecturas. Para el holobionte *P. panamensis* se obtuvo un total de 25, 861,926 lecturas a ensamblar, y para el holobionte *P. sverdrupi*, se obtuvo un total de 37,557,132 lecturas a ensamblar (Anexo A). La muestra 153, perteneciente a *P. sverdrupi*, tuvo una baja cantidad de lecturas, por lo cual no fue tomada en cuenta para los análisis, al poder influir en los análisis de expresión diferencial dado su bajo número de lecturas y dar lugar a interpretaciones erróneas. El porcentaje promedio de lecturas eliminadas para *P. panamensis* fue 67% y para *P. sverdrupi* 48 %; el porcentaje promedio de citocina y guanina para ambos corales fue 46.6%.

7.2 Ensamble de los holobiontes

En el ensamble del holobionte *Porites panamensis*, se obtuvo un total de 303,006 transcritos con un porcentaje de CG de 46.75. La N50 de los contigs fue de 433 pb, siendo la media de longitud de los contigs de 302 pb. En el ensamble del holobionte *Porites sverdrupi* se obtuvo un total de 430,204 transcritos con un porcentaje de CG de 47.48. La N50 para este ensamble fue de 379 pb con una longitud media de contigs de 266 pb. En el ensamble global considerando ambos holobiontes, se obtuvo un total de 603,078 transcritos con un porcentaje de CG de 46.86. Se obtuvo una N50 de 400 pb, y una longitud media de los contigs de 269 pb.

7.3 Verificación de calidad del ensamble

La base de datos protista de BUSCO tiene un total de 215 grupos de genes ortólogos, algunos de organismos modelo. En la presente investigación, al comparar los datos del

ensamble del holobionte *P. panamensis* (considerando transcritos de coral y simbioses) contra esta base de datos, se obtuvo 43 grupos de genes ortólogos completos, 5 fragmentados y 167 ausentes. Para el holobionte *P. sverdrupi*, se obtuvo un total de 68 grupos de genes ortólogos completos, 2 fragmentados y 145 ausentes del total de 215. Por otro lado, la base de datos Metazoa posee 978 grupos de genes ortólogos, de los cuales al compararlos contra el ensamble del holobionte *P. panamensis* se obtuvo que, 352 estuvieron completos, 361 fragmentados y 265 ausentes. Mientras que al comparar con el ensamble del holobionte de *P. sverdrupi* se obtuvo un total de 477 grupos de genes ortólogos completos, 292 fragmentados y 209 ausentes. Del mapeo de lecturas a los ensamblajes mediante Bowtie2, se obtuvo un 82.10% para el ensamble del holobionte *P. panamensis* y 77.09%, para el ensamble del holobionte *P. sverdrupi*, de tasa de alineamiento de las lecturas.

7.4 Separación de transcritos de coral y simbioses

Al realizar la búsqueda mediante tblastx de los ensamblajes de los holobiontes contra las 4 bases de datos: Coral, Apocoral, Symbiodiniaceae y Symbiodiniaceae cultivos se obtuvo, para el ensamble del holobionte *P. panamensis* más de un millón de hits con valores menores o igual a un $e\text{-value}1E^{-8}$; de esos valores se tomaron en cuenta únicamente los hits que tenían al menos 50 bp (50 aminoácidos) de alineamiento y el 80% de identidad. Luego de esto se eliminaron los duplicados, y se retuvo de la base de datos de coral 80,616 hits, 8,679 de apocoral, 28,444 de Symbiodiniaceae y 17, 802 de cultivos, tal como se observa en la Fig. 5.

Del total de hits de la base de datos de Symbiodiniaceae, 26,175 tuvieron hits también con la base de datos de coral y apocoral, por lo que fueron descartados como contigs ambiguos. Del total de hits de la base de datos de cultivos 1,642 resultaron contigs ambiguos. Finalmente, con la certeza de tener contigs solamente del simbionte tuvimos un total de 18,429 contigs, como se observa en la Fig. 6.

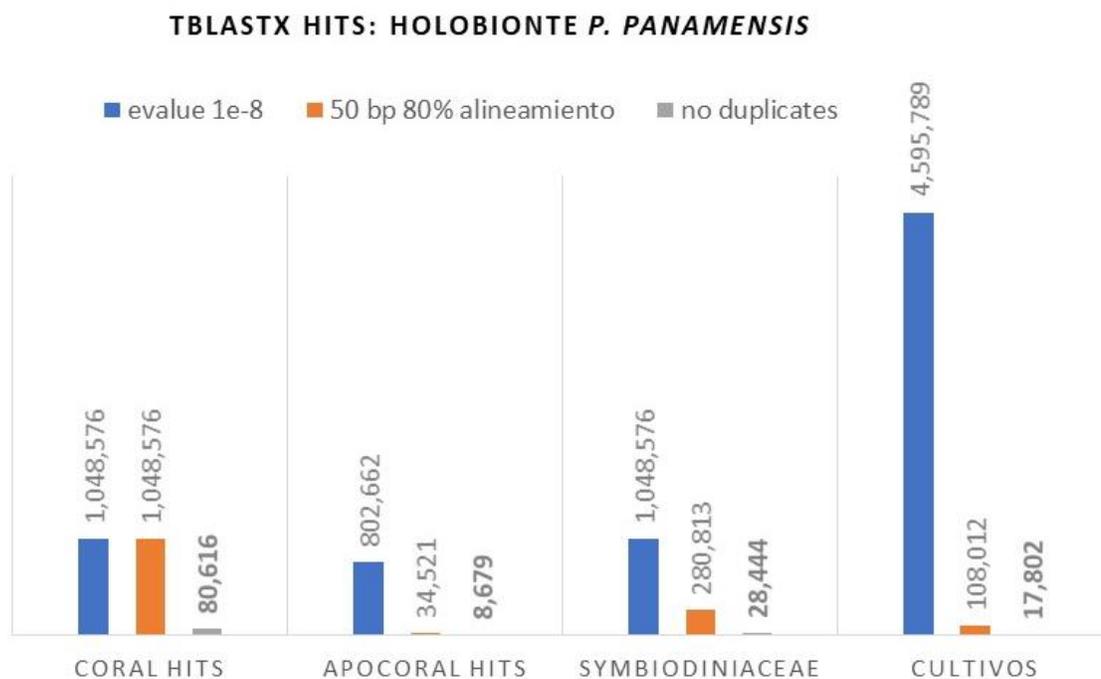


Figura 5 TBLASTX hits del ensamble *P. panamensis* contra cuatro bases de datos. El color azul representa el primer filtro que corresponde al e-value, el anaranjado al segundo filtro y el gris la cantidad total de contigs únicos.

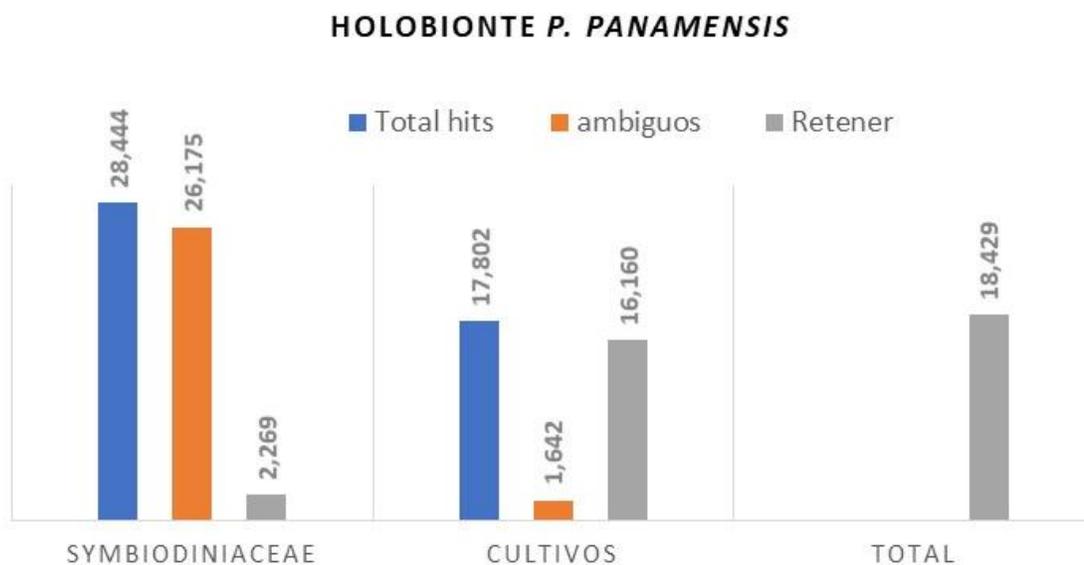


Figura 6. TBLASTX hits del ensamble *P. panamensis* y las bases de datos exclusivas de simbiosites. En gris el total de contigs no ambiguos, exclusivos del simbiote.

Luego de remover los contigs ambiguos y retener solamente los hits exclusivos de simbionte, se utilizó TrinityStats.pl para obtener los datos del ensamble de *Cladocopium sp.* proveniente del ensamble original del holobionte *P. panamensis*. Se obtuvo en este ensamble 13,725 transcritos con un N50 de 554, % CG de 54.39 y una longitud media de los contigs de 463 pb, con un total de 6,689,763 bases ensambladas.

Para el ensamble del holobionte *P. sverdrupi* se obtuvieron más de un millón de hits con valores menores o igual a un $e\text{-value}1E^{-8}$; de esos valores se tomaron en cuenta únicamente los hits que tenían al menos 50 bp (50 aminoácidos) de alineamiento y el 80% de identidad. Luego de esto se eliminaron los duplicados, y se retuvo de la base de datos de coral 82,371 hits, 9,389 de apocoral, 42,475 de Symbiodiniaceae y 26,148 de cultivos de Symbiodiniaceae (Fig.7).

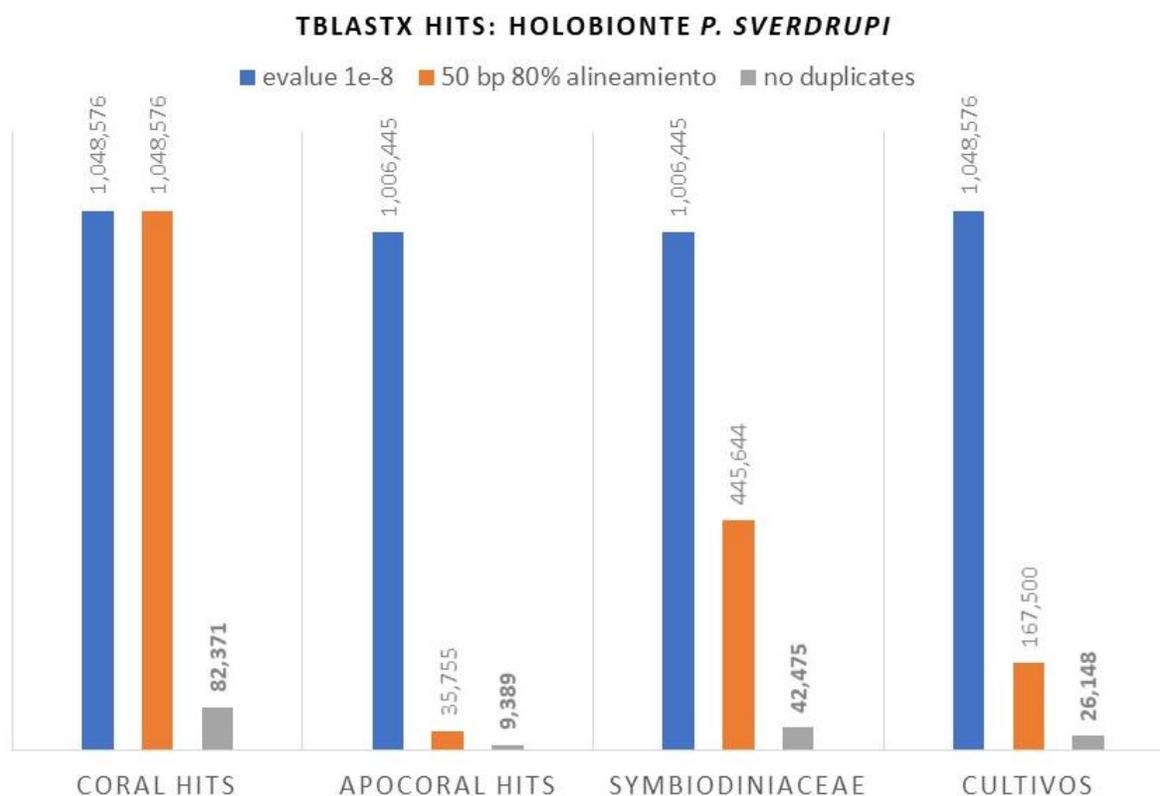


Figura 7 TBLASTX hits del ensamble *P. sverdrupi* contra cuatro bases de datos. El color azul representa el primer filtro que corresponde al e-value, el anaranjado al segundo filtro, y el gris oscuro a la cantidad total de contigs únicos.

Del total de hits de la base de datos de Symbiodiniaceae, 25,935 tuvieron hits también con la base de datos de coral y apocoral, por lo que fueron descartados como contigs ambiguos. Del total de hits de la base de datos de cultivos, 15,252 resultaron contigs ambiguos. Finalmente, con la certeza de tener contigs solamente del simbionte se retuvo un total de 27,436 contigs, como se observa en la Fig. 8 en la última columna gris.

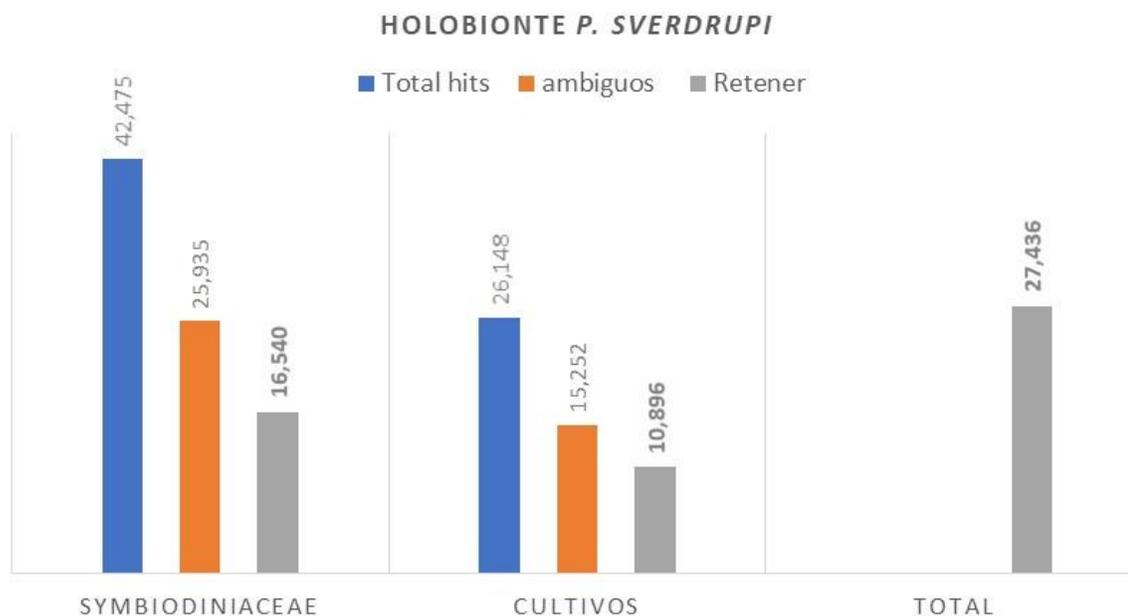


Figura 8. TBLASTX hits del ensamblaje *P. sverdrupi* y las bases de datos exclusivas de simbionte. En gris el total de contigs no ambiguos, exclusivos del simbionte.

Al remover los contigs ambiguos y retener solamente los hits exclusivos de simbionte, se utilizó TrinityStats.pl para obtener los datos del ensamblaje de *Cladocopium sp.* proveniente del ensamblaje original del holobionte *P. sverdrupi*. Se obtuvo en este ensamblaje 19,093 transcritos con un N50 de 563, % CG de 54.10 y una longitud media de los contigs de 385 pb, con un total de 8,952,300 bases ensambladas.

7.5 Ensamblaje global de *Cladocopium sp.*

Se obtuvo el ensamblaje “*de novo*” de *Cladocopium sp.* luego de filtrar y retirar los transcritos de los corales *P. panamensis* y *P. sverdrupi*. Se obtuvo un total de 33,770 genes de Trinity o transcritos, con un porcentaje de GC de 54.40 y un N50 713. En la tabla III se

observa la comparación de los estadísticos de cada ensamble de holobionte y de *Cladocopium sp.*

Tabla III. Estadísticos de los ensambles “de novo” obtenidos. TTT: total transcritos de trinity, %CG: porcentaje citocina-guanina. Pb: pares de bases. HPP: holobionte *P. panamensis*. HPS: holobionte *P. sverdrupi*

Ensamble	TTT	%CG	N50 (pb)	Número de bases ensambladas
Holobionte <i>P. panamensis</i>	303,006	46.75	433	119,898,460
<i>Cladocopium sp.</i>	13,725	54.39	554	6,689,763
Holobionte <i>P. sverdrupi</i>	430,204	47.48	379	159,232,967
<i>Cladocopium sp.</i>	19,093	54.10	563	8,952,300
Global (HPP+HPS)	603,078	46.86	400	233,478,572
<i>Cladocopium sp.</i>	47,855	54.40	713	26,600,456

7.6 Genes expresados diferencialmente

Para el análisis de expresión diferencial se consideró como tratamientos independientes a cada hospedero. Se obtuvieron 107 genes expresados diferencialmente (≥ 2 -fold; $p \leq 0.001$), 74 sobre-expresados y 33 sobre-expresados, para *Cladocopium sp.* provenientes de los hospederos *P. panamensis* y *P. sverdrupi*, respectivamente, tomando como diferentes tratamientos cada hospedero. La figura 8 muestra el agrupamiento jerárquico de los genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés), en donde las filas representan cada gen y las columnas las réplicas para cada tratamiento. Cada tratamiento se agrupa con sus réplicas con un patrón similar de expresión de genes. En la Fig.9, el color amarillo representa un mayor nivel de expresión en la escala de la figura y el morado un nivel de expresión menor.

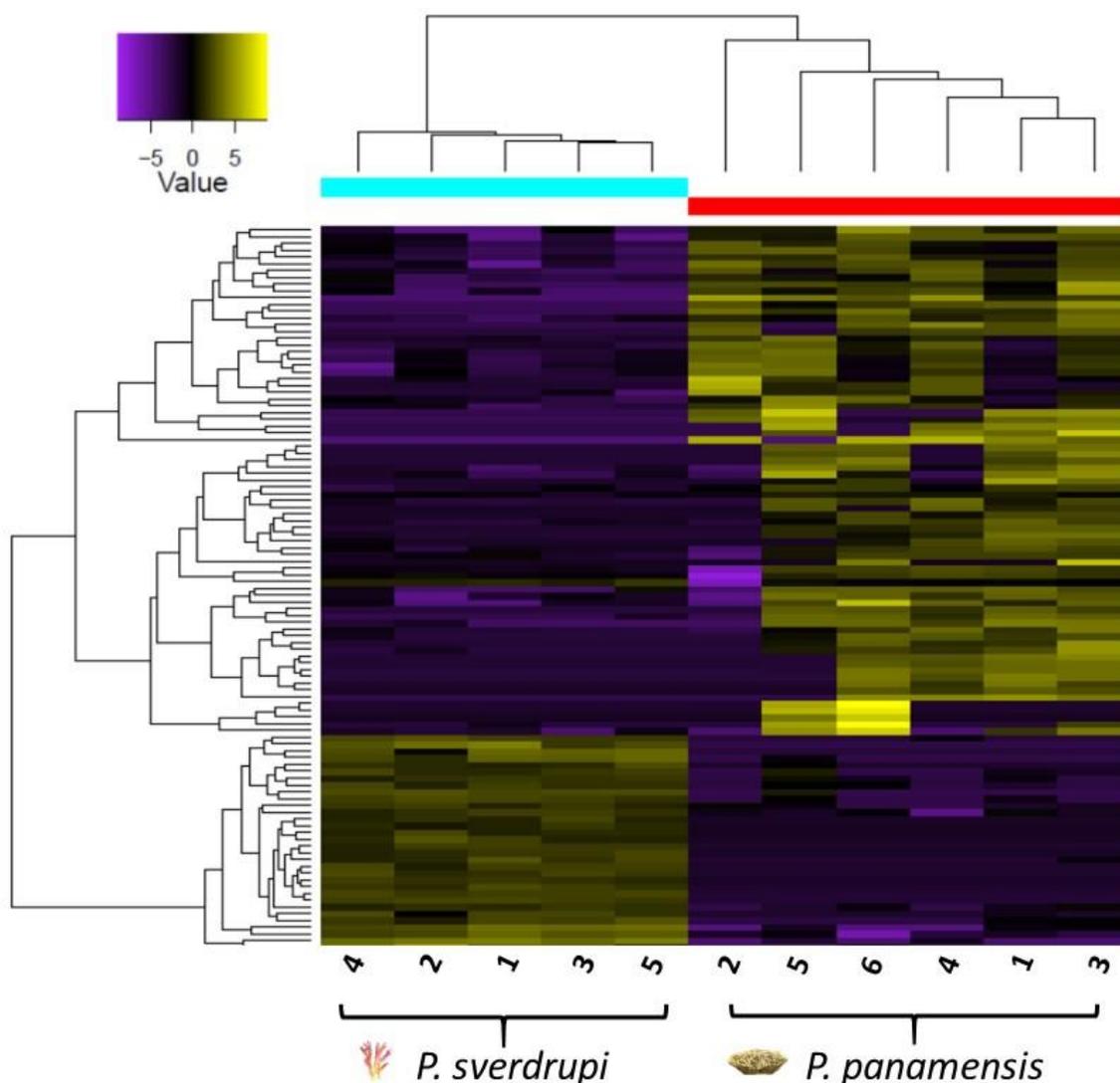


Figura 9. Agrupamiento jerárquico de DEGs. El mapa muestra los genes (filas) con expresión diferencial (Trinity/DESeq2 > fold 2, FDR 0.001) entre las réplicas (columnas) de *Cladocopium sp.* de diferentes hospederos.

7.7 Anotación de genes

Mediante Blastx de los ensamblados de *Cladocopium sp.*, provenientes del hospedero *P. panamensis* y *P. sverdrupi* contra la base de datos de Swiss-Prot (UniProt Release 2019_05) con un e-value $1E-10$ (Davies *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2017). Para *P. panamensis* se identificaron un total de 2,295 y para *P. sverdrupi* 2,745 genes; 362 genes fueron compartidos, siendo exclusivos de *P. panamensis* 1,933 y 2,384 de *P. sverdrupi* (Fig.10). Esta

cantidad de genes no representa el total de genes, sino solamente los cuales fue posible anotar en la base de datos de proteínas validadas y revisadas.

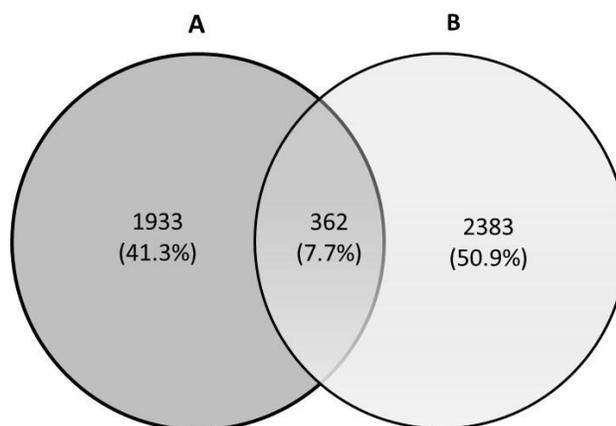


Figura 10. Genes de *Cladocopium* únicos para cada especie. A) *Cladocopium* sp. (holobionte *P. panamensis*) B) *Cladocopium* sp. (holobionte *P. sverdrupi*).

De los 107 genes expresados diferencialmente fue posible identificar 51 genes sobre-expresados en *Cladocopium* sp., 30 provenientes del hospedero *P. panamensis* y 21 provenientes del hospedero *P. sverdrupi*. En la tabla IV se encuentra la información de los 30 genes anotados para *Cladocopium* sp. del hospedero *P. panamensis*; de estos se observan en negritas (tabla IV) los genes que se consideran conservados en los dinoflagelados simbióticos (Rosic *et al.*, 2015); genes correspondientes a proteínas de choque térmico HSP (Heat Shock Protein genes, por sus siglas en inglés), genes fotosintéticos y genes de las proteínas quinasas calcio-dependientes, además de genes de respuesta a estrés (Lin *et al.*, 2019).

Tabla IV. Genes sobre-expresados para *Cladocopium* sp. del hospedero *P. panamensis*

UniProt ID	Descripción	Blast especie	Blast e-value
RL15_DICDI	60S ribosomal protein L15/Long chain base biosynthesis protein 2b	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.67E-18
A0A1Q9CXV7_SYMMI	60S ribosomal protein L5	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	3.96E-29
ACTC_PISOC	Actin, cytoplasmic	<i>Pisaster ochraceus</i>	1.66E-79
A0A1Q9F3H7_SYMMI	Aha1_N domain-containing protein	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.05E-50

ATPA_XENLA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	<i>Xenopus laevis</i>	1.03E-176
A0A1Q9ERRO_SYMMI	Choline-sulfatase, partial	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	2.07E-47
CYSK_STAHA	Cysteine synthase	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	7.83E-21
PHRA_AGRFC	Deoxyribodipyrimidine photo-lyase	<i>Agrobacterium fabrum</i>	1.29E-74
FCPB_MACPY	Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein B, chloroplastic/light-harvesting protein	<i>Macrocyctis pyrifera/Symbiodinium sp. C3</i>	5.23E-14
A0A1Q9E112_SYMMI	GDP-mannose transporter GONST4	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	6.72E-34
GLTB_MYCTU	Glutamate synthase [NADPH] large chain	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1.35E-165
BIP3_TOBAC	Luminal-binding protein 3	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.31E-54
CP19D_ARATH	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP19-4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1.98E-75
GLT16_HUMAN	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 16	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	3.92E-94
A0A1Q9CDM9_SYMMI	Pentatricopeptide repeat-containing protein	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.98E-17
RUXG_ARATH	Probable small nuclear ribonucleoprotein G	<i>Arabidopsis thaliana</i>	
A0A1Q9EU17_SYMMI	Protein O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.91E-47
TAR1_KLULA	Protein TAR1	<i>Kluyveromyces lactis</i>	6.77E-13
RRT15_YEAST	Regulator of rDNA transcription protein 15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.77E-16
RRT15_YEAST	Regulator of rDNA transcription protein 15	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3.37E-14
A0A1Q9DH34_SYMMI	Sulfide:quinone oxidoreductase, mitochondrial	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	5.43E-26
TBA_LYTPI	Tubulin alpha chain	<i>Lytechinus pictus</i>	6.42E-35
TBB_LYTPI	Tubulin beta chain	<i>Lytechinus pictus</i>	6.42E-35
TBB_LYMST	Tubulin beta chain	<i>Lymnaea stagnalis</i>	6.83E-30
Y036_HAEIN	Uncharacterized ABC transporter ATP-binding protein/ Calcium-dependent protein kinase 3	<i>Haemophilus influenzae/Symbiodinium microadriaticum</i>	5.52E-54
A0A1Q9E1G7_SYMMI	Uncharacterized protein	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	9.18E-24
YCX91_PHAEO	Uncharacterized protein ORF91	<i>Phalaenopsis aphrodite</i>	3.82E-17
YCX91_PHAEO	Uncharacterized protein ORF91	<i>Phalaenopsis aphrodite</i>	3.82E-17
A0A1Q9E9T0_SYMMI	Vegetative incompatibility protein HET-E-1	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	3.22E-128

En la tabla V se presenta la información correspondiente a los 21 genes anotados para *Cladocopium sp.* proveniente del hospedero *P. sverdrupi*. Se identificó un gen conservado (en negritas, tabla V) que se incluye en la categoría “housekeeping genes” (HKGs, por sus siglas en inglés) y genes de respuesta a estrés, además de genes que codifican para proteínas ribosomales y genes implicados en la producción de energía.

Tabla V. Genes sobre-expresados en *Cladocopium sp. del hospedero P. sverdrupi*

Uniprot ID	Descripción	Blast especie	Blast e-value
ANR50_HUMAN	Ankyrin repeat domain-containing protein 50	<i>Homo sapiens</i>	9.48E-21
ATPI_RHDSA	ATP synthase subunit a, chloroplastic	<i>Rhodomonas salina</i>	5.93E-67
DCPS_BOVIN	m7GpppX diphosphatase	<i>Bos taurus</i>	1.14E-26
GLNA3_BUTFI	Glutamine synthetase	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	2.72E-34
RL30_BRABE	60S ribosomal protein L30	<i>Branchiostoma belcheri</i>	3.29E-52
RS12_CYAPA	40S ribosomal protein S12	<i>Cyanophora paradoxa</i>	1.10E-32
TMED9_HUMAN	Transmembrane emp24 domain-containing protein 9	<i>Homo sapiens</i>	8.38E-23
UGAT_BELPE	Cyanidin-3-O-glucoside 2-O-glucuronosyltransferase	<i>Bellis perennis</i>	2.19E-20
A0A1Q9EKR3_SYMMI	E3 ubiquitin-protein ligase SIS3	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	6.55E-61
A0A1Q9DMB5_SYMMI	E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	2.69E-21
A0A1Q9DRY9_SYMMI	Mitogen-activated protein kinase	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	3.15E-100
A0A1Q9EWU2_SYMMI	Phthiocerol synthesis polyketide synthase type I PpsA	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	3.84E-12
A0A1Q9EWU2_SYMMI	Phthiocerol synthesis polyketide synthase type I PpsA	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.46E-12
A0A1Q9EWU2_SYMMI	Phthiocerol synthesis polyketide synthase type I PpsA	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	9.41E-14
A0A1Q9DTP1_SYMMI	Polyphosphatidylinositol phosphatase INP53	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.14E-17
A0A1Q9CRZ7_SYMMI	Potassium/sodium hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	4.59E-20
DIM1_HUMAN	Probable dimethyladenosine transferase	<i>Homo sapiens</i>	3.49E-55
A0A1Q9DEF7_SYMMI	putative dipeptidase	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	7.90E-20
A0A1Q9CGI7_SYMMI	Tubulin alpha-3 chain	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	3.29E-54
A0A1Q9DUE8_SYMMI	Zinc finger CCCH domain-containing protein 55	<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	1.99E-90

7.8 Categorías de ontología de genes (GO terms)

Se obtuvo la asignación de las categorías de ontología génica para los genes sobre-expresados que lograron anotarse. De los 30 genes de *Cladocopium sp.* proveniente del hospedero *P. panamensis* se tiene que corresponden a: 41 funciones moleculares, 32 procesos biológicos y 36 componentes celulares.

El proceso biológico (BP) con mayor frecuencia fue el de procesos metabólicos del nitrógeno (GO: 0006807, 38.74%), el cual incluye reacciones químicas y rutas metabólicas que involucran compuestos orgánicos e inorgánicos que contienen nitrógeno, incluyendo fijación del nitrógeno, nitrificación, denitrificación, procesos de asimilación y reducción del

nitrógeno y la inter-conversión de nitrógeno orgánico y amonio. Le siguen los procesos asociados a respuesta celular estimulada por daño al ADN (GO: 0006974, 2.36%), reparación al ADN (GO:0006281, 2.23 %), y transporte transmembrana de iones (GO: 0034220, 3.52%).

La función molecular (MF) con mayor frecuencia fue la actividad catalítica (GO:0003824) que es la catálisis de reacciones bioquímicas que ocurren a temperaturas fisiológicas. Seguido de ésta tenemos la actividad de la enzima transferasa (GO:0003735) que cataliza la reacción de transferencia de un grupo (metil, glicosil, acil, compuestos fosforilados, otros compuestos), la unión de nucleótidos (GO:0009982), y unión de iones metálicos (GO:0005216) con interacciones selectivas y no covalentes con cualquier ion metálico. El componente celular (CC) más representado en los genes sobre-expresados es la membrana (GO:0016020), componentes integrales de membrana (GO:0016021) que consisten en productos de genes y complejos proteicos que están en la región hidrofóbica de la membrana, y el citoplasma (GO:0005737).

Las categorías con mayor porcentaje de frecuencia se presentan en el anexo B, excepto las categorías con un porcentaje $0.03 \leq$ las cuales fueron: (BP) reparación foto reactiva (GO:0000719), fotosíntesis (GO:0009765), glicosilación de proteínas vía treonina (GO:0018243) y vía serina (GO:0018242); (CC) complejo proteico SMN-Sm (GO:0034719), cuerpo multivesicular (GO:0005771), P granula (GO:0043186), complejo espliceosomal de tipo U12 (GO:0005689), lumen del retículo endoplasmático (GO:0005788), U5 snRNP (GO:0005682), partícula de reconocimiento de señal focalización del retículo endoplasmático (GO:0005786); (MF) Unión a la ciclosporina A (GO:0001671), actividad transferasa de polipéptido N-acetylgalactosamina (GO:0003824), unión a la proteína Hsp90 (GO:0005200), actividad foto-liasa (GO:0005525), actividad de la enzima glutamato sintasa (NADPH)(GO:0008484), activador de la ATPasa (GO:0004355).

Para los 21 genes anotados de *Cladocopium sp.* provenientes del hospedero *P. sverdrupi* se obtuvo que corresponden a 29 funciones moleculares, 32 procesos biológicos

y 21 componentes celulares. Algunos genes presentaron hasta 11 GO asignados por categoría, mientras que otros no tenían GO asignado al no haber información disponible o no estar caracterizadas aún las categorías GO para dichos genes sobre- expresados.

La función molecular con mayor frecuencia fue la actividad catalítica (GO:0003824, 65.83%), seguido de la actividad de la enzima hidrolasa (GO:0016787, 22.29%) que cataliza la hidrólisis de varios enlaces (ej. C-O, C-N, C-C), y la unión de ácidos nucleicos (GO:0003676, 21.23%). El proceso biológico con mayor frecuencia fue el proceso metabólico de compuestos nitrogenados (GO:0006807, 38.74%), seguido por transporte transmembrana (GO:0055085, 8.92%) que se refiere al transporte de un soluto a través de la bicapa lipídica, y traducción (GO:0006412, 5.69%). El componente celular con mayor frecuencia fue la membrana (GO:0016020, 61.69%), seguido de componentes integrales de membrana (GO:0016021, 55.87%) y el citoplasma (GO:0005737, 26.02%).

Las categorías con mayor porcentaje de frecuencia se presentan en el anexo B, excepto las categorías con un porcentaje $0.03 \leq$ las cuales fueron: (BP) recubrimiento COPI de la vesícula de Golgi (GO:0048205, 0.001%), regulación positiva de procesamiento de ARNr (GO: 2000234, 0.0020%), respuesta celular a la menadiona (GO:0036245, 0.0020%), transporte de sustancias desde los endosomas temprano hasta el Aparato de Golgi (GO:0034498, 0.004%), transporte retrógrado de endosoma a membrana plasmática (GO:1990126, 0.004%), ruta de señalización mediada por azúcar (GO:0010182, 0.005%), salida de proteínas del retículo endoplasmático (RE) (GO:0032527, 0.014%), escisión de 5'-cap dependiente de la desadenilación de ARNm nuclear-transcrito (GO:0000290, 0.0190%) y corte cis de ARNm vía spliceosoma (GO: 0045292, 0.031%); (CC) compartimiento intermedio de membrana entre RE-Golgi (GO:0045292, 0.0310%); (MF) actividad de la difosfatasa m7G (5') pppN (GO:0050072, 0.0030%), unión cap de ARN 7-metilguanosa (GO:0000340, 0.0070%), actividad de la cianidina-3-O-glucosido 2-O-glucuronosiltransferasa (GO:0102160, 0.0120%) y unión de syntaxina (GO:0019905, 0.0270%).

Algunos GO de cada categoría se encontraron representados en *Cladocopium* de *P. panamensis* y *P. sverdrupi* con la misma frecuencia de expresión de genes mientras otros solo se presentaron en uno de los dos. Se comparten cuatro, ocho y ocho GO's para las categorías proceso biológico (Fig.11), función molecular (Fig.12) y componente celular (Fig.13). El GO de actividad catalítica es el de mayor frecuencia tanto para *Cladocopium* de *P. panamensis* y *P. sverdrupi* con un 65.83% que no se muestra en la Fig.12.

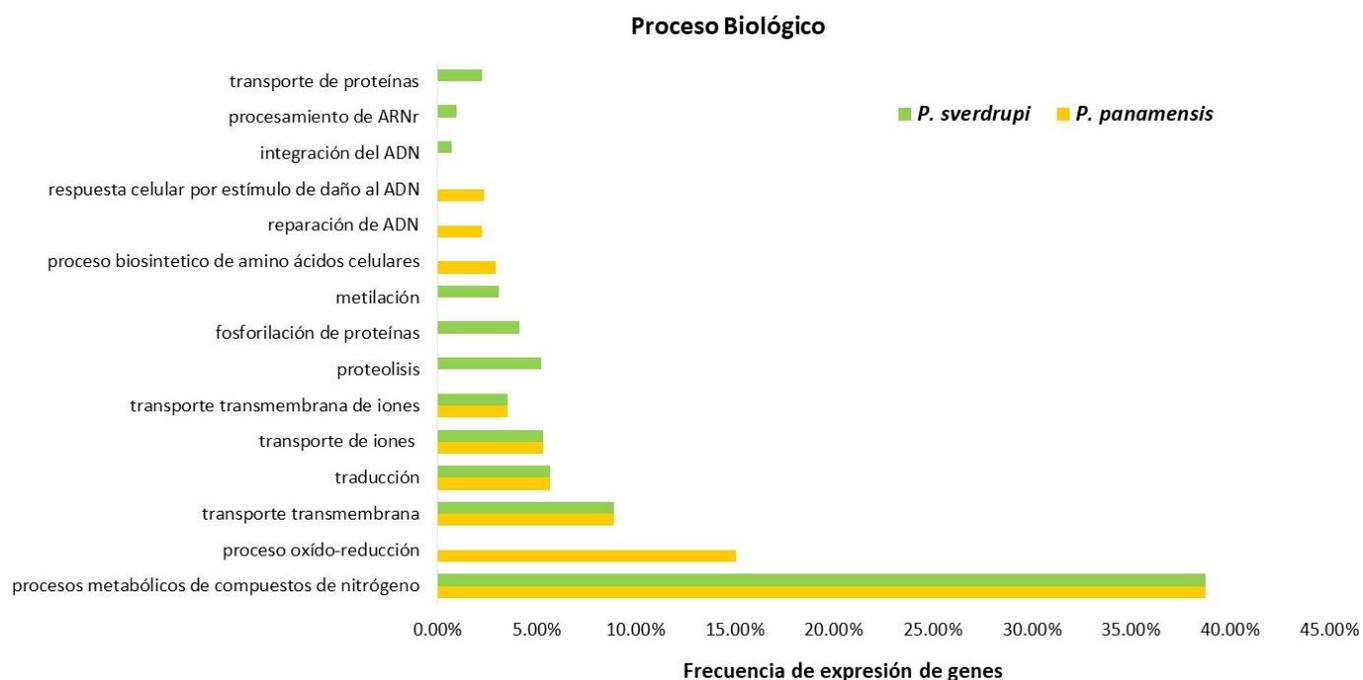


Figura 11. Procesos biológicos representados en los genes sobre-expresados en *Cladocopium* de *P. panamensis* y *P. sverdrupi*. Frecuencia de expresión de genes calculada para cada GO a partir del p-value adj. de la expresión diferencial de genes utilizando el Software REVIGO.

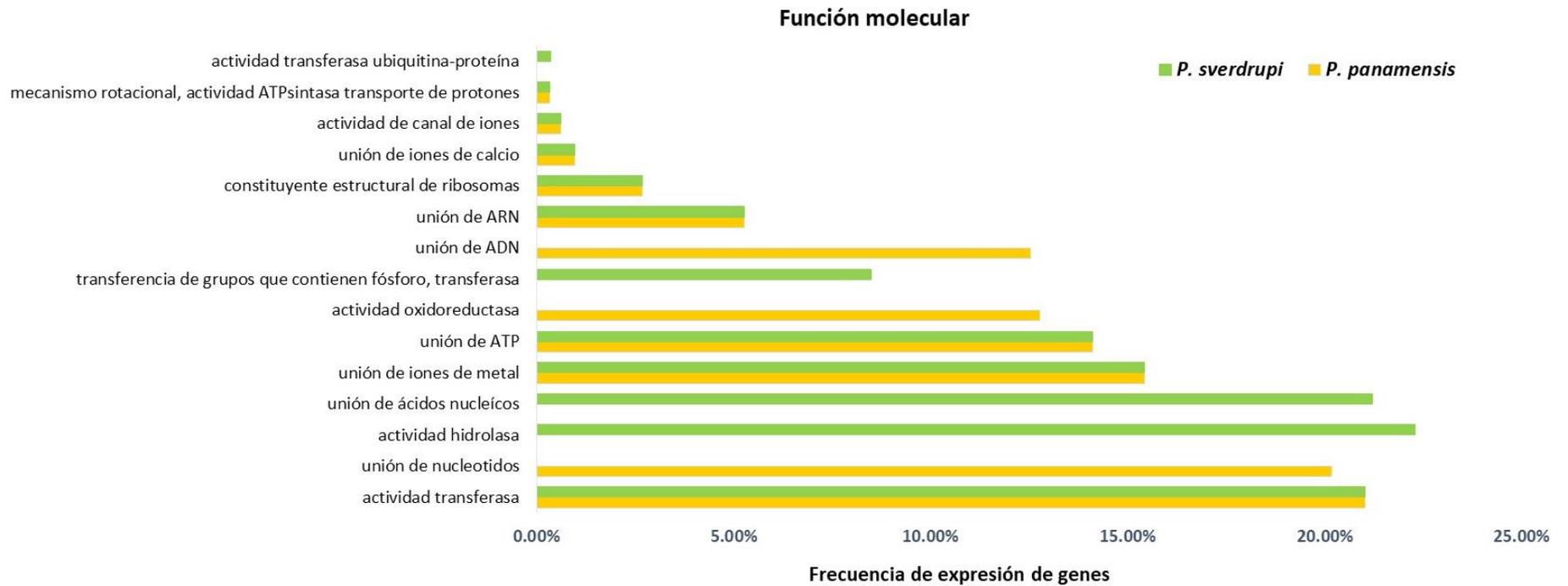


Figura 12. Funciones moleculares representadas en los genes sobre-expresados en *Cladocopium* de *P. panamensis* y *P. sverdrupi*. Frecuencia de expresión de genes calculada para cada GO a partir del p-value adj. de la expresión diferencial de genes. Utilizando el software REVIGO.

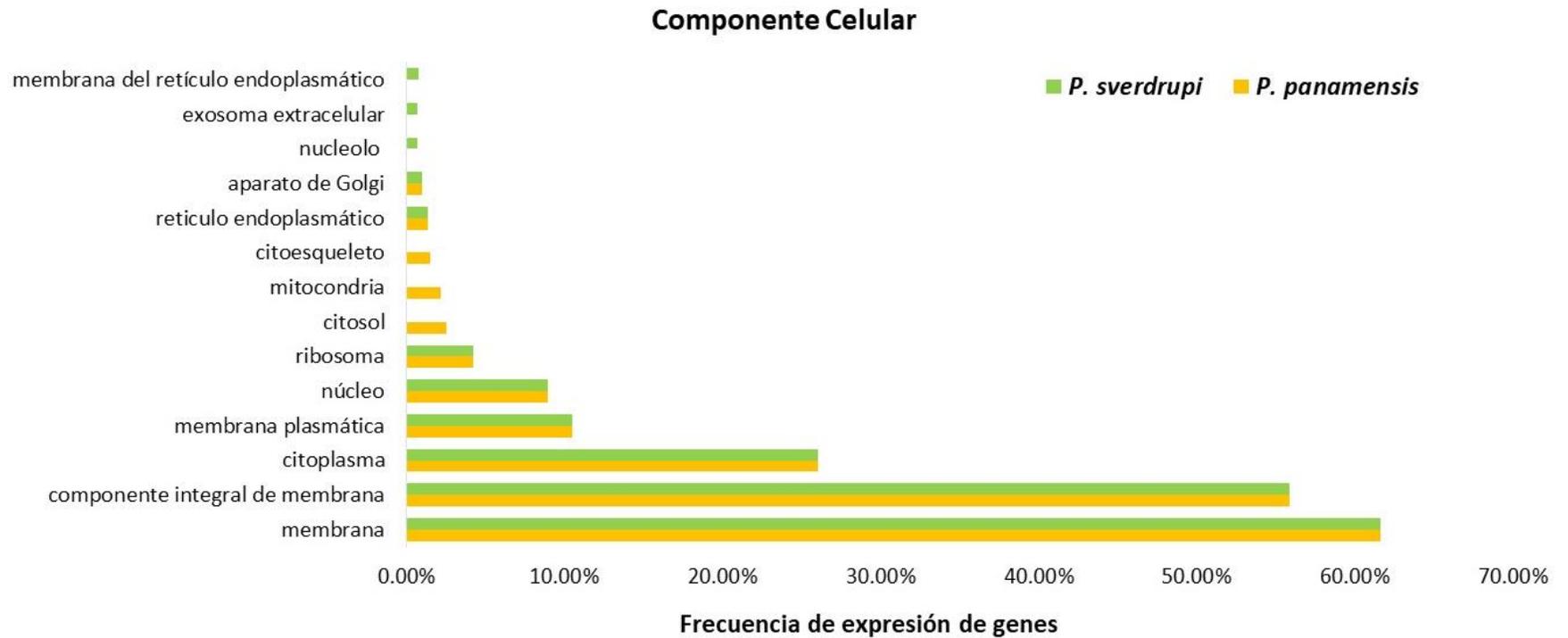


Figura 13. Componentes celulares representados en los genes sobre-expresados en *Cladocopium* de *P. panamensis* y *P. sverdrupi*. Frecuencia de expresión de genes calculada para cada GO a partir del p-value adj. de la expresión diferencial de genes, utilizando el software REVIGO.

8. DISCUSIÓN

Los dinoflagelados de la familia Symbiodiniaceae han sido estudiados desde distintas disciplinas para comprender aspectos evolutivos y ecológicos, debido a su importancia como simbioses de los corales formadores de arrecifes y la susceptibilidad de este sistema simbiote-coral a cambios en su ambiente natural, que generan condiciones de estrés que afectan la simbiosis.

Los estudios comparativos de los simbioses dinoflagelados se encontraban aún en etapas tempranas hasta la incorporación de la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). Los estudios genómicos y transcriptómicos de Symbiodiniaceae han ido incrementando a pesar de no ser un organismo modelo (Leggat *et al.*, 2011). En la última década se han realizado estudios sobre transcriptomas de varios corales hospederos en diferentes contextos, como la respuesta de *Symbiodinium* a distintas condiciones de laboratorio, estudios evolutivos en diferentes géneros de Symbiodiniaceae, descripción de la ecología funcional y diversificación de nicho, hasta aspectos muy específicos como expresión de elementos retrotransposones activados por estrés térmico (DeSalvo *et al.*, 2010; Shinzato *et al.*, 2014; Parkinson *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

Este estudio presenta los primeros transcriptomas “*de novo*” ensamblados para *Cladocopium sp.* proveniente de los corales *P. panamensis* y *P. sverdrupi*. Al compararlo con estadísticos de transcriptomas de *Cladocopium sp.* proveniente de otros corales, es posible decir que los transcriptomas de este estudio están dentro del rango de lo reportado previamente para estadísticos como número total de transcritos, N50, y número total de genes predichos. Los valores obtenidos de N50 están entre de 534 a 713 lo cual está dentro del rango de valores obtenidos por otros (Ladner *et al.*, 2012; Riesgo *et al.*, 2014; González-Pech *et al.*, 2017). El N50 es considerado un estadístico que refleja la calidad de un ensamble (O’neil & Emrich, 2013), por lo que obtener valores dentro del rango reportado por otros autores es un indicador de la calidad de los ensambles generados. El número total de genes

predicho y porcentaje de CG también se encuentra dentro del rango de valores reportado por otros autores (Rosic *et al.*, 2015; González-Pech *et al.*, 2017).

8.1 Implicaciones ecológicas de los genes expresados diferencialmente: procesos biológicos y función molecular

El presente estudio desarrolló el análisis de expresión diferencial de genes de *Cladocopium sp.* presente en dos hospederos, en un sitio con diferentes profundidades que implica diferencias ambientales en cuanto a penetración de luz y temperatura. Se detectaron 107 genes de *Cladocopium sp.* que se expresan diferencialmente en los dos hospederos, y esto denota la influencia del ambiente y el hospedero a nivel molecular. Las diferencias ambientales en factores como temperatura e irradiancia, diversidad y abundancia de hospederos y de simbioses, que varían de región a región, son factores que se cree modulan la especificidad expresada en ciertos holobiontes (coral-simbiontes) (Iglesias-Prieto *et al.*, 2004).

Los simbioses de los corales de distribución somera de este estudio (*P. panamensis*) expresan un set de genes diferentes al de los simbioses de los corales de distribución profunda (*P. sverdrupi*) que conllevan a la expresión de distintas proteínas. Estos están involucrados en algunos procesos biológicos y funciones moleculares similares como el metabolismo del nitrógeno, el transporte transmembrana, transporte de iones y actividad catalítica (Fig.11 y 12). Estos procesos que están representados con mayor frecuencia indican algunos de los procesos fundamentales para la simbiosis dinoflagelado-coral, relacionados con transporte de nutrientes, reciclaje de nitrógeno, comunicación celular, estrés oxidativo, que son procesos que han sido propuestos como adaptaciones fisiológicas necesarias para el estilo de vida simbiótico de los dinoflagelados (Rosic *et al.*, 2015, Lin *et al.*, 2017, Golzalez-Pech *et al.*, 2017). Implican un flujo de nutrientes y compuestos del simbiote hacia el hospedero (Shinzato *et al.*, 2014).

A pesar de estos procesos compartidos, también se observa la expresión diferencial de genes que sugieren la respuesta y adaptación por parte de los simbioses a la profundidad en que se encuentran sus hospederos. Esta adaptación local, especialización de simbioses a una zonación vertical específica se ha estudiado desde otras perspectivas y técnicas de análisis como enzimas de restricción (Rowan & Knowlton 1995), marcadores moleculares (Frade *et al.*, 2008) y experimentos de trasplantes de corales de una profundidad a otra para comprobar la especificidad de los simbioses (Iglesias-Prieto *et al.*, 2004). En este estudio se presenta evidencia a nivel de expresión de genes, que sugiere que las diferencias en los patrones de expresión de genes entre diferentes linajes de Symbiodiniaceae, cultivados y bajo condiciones ambientales controladas, evidencian divergencia evolutiva y podrían ser adaptaciones (Parkinson *et al.*, 2016), en este caso adaptaciones locales a dos profundidades.

A pesar de ser diferentes genes los sobre-expresados (tabla IV y V) en *Cladocopium sp.* para cada hospedero y profundidad, estos codifican para procesos biológicos similares. Además, cumplen específicamente con las necesidades que cada hospedero pueda presentar según la profundidad a la que se encuentre. Como *Cladocopium sp.* en el hospedero *P. panamensis* (somero 0-5 m) sobre expresa un gen de respuesta a estrés, que responde al estímulo de daño al ADN al codificar la enzima 'deoxyribodipyrimidine photolyase (phr)' (Hemond *et al.*, 2015); ella está involucrada en la reparación por daño al ADN inducido por luz UV mediante la foto reactivación que es uno de los principales mecanismos de reparación al ADN en larvas plánulas de corales expuestas a altos niveles de radiación UV por flotar cerca de la superficie (Reef *et al.*, 2009).

La respuesta al daño por luz UV de Symbiodiniaceae es absorber y bloquear la radiación UV mediante producción de aminoácidos mycosporine-like (MAAs) (Banaszak *et al.*, 2000; Gordon & Leggat, 2010). Sin embargo, está reportado que *Cladocopium* (Clado C) ha evolucionado perdiendo familias de genes, entre ellas los genes realizan la biosíntesis de MAAs (Shoguchi *et al.*, 2018). Los resultados confirman que *Cladocopium* al perder la familia

de genes productores de MAAs, sobre expresa el gen *phr* como mecanismo de respuesta al daño por radiación UV (tabla IV); la expresión diferencial de fotoliasas también ha sido reportada como respuesta a estrés térmico por Symbiodiniaceae (*Fugacium*, Clado F) (Gierzs *et al.*, 2017). En este estudio, el gen *phr* se sobre expresa en *Cladocopium sp* proveniente del coral recolectado en aguas someras *P. panamensis*, pero no en *Cladocopium sp* proveniente del coral *P. sverdrupi* (aguas profundas 9 – 14 metros) quizás debido a que no se encuentra expuesto a la misma cantidad de radiación por rayos UV.

Diferencias en expresión de genes pueden ser funcionalmente importantes y estar influenciadas por selección natural relacionada a la diversificación de nichos (Parkinson *et al.*, 2016). *Cladocopium sp.* de *P. sverdrupi*, expresa diferentes genes relacionados con la respuesta a estrés, como el gen ‘ankyrin repeat domain-containing protein 50 (AR)’ y ‘Zinc finger CCCH domain-containing protein 55’ (Lin *et al.*, 2019); mientras que *Cladocopium* en *P. panamensis* expresa los genes ‘Choline-sulfatasa’ considerado como señal de estrés y con función molecular de transporte de metales, reportado en el estudio del holobionte *Orbicella faveolata* conteniendo *Cladocopium* tipo C7 y C12 (Daniels *et al.*, 2015) y ‘Pentatricopeptide repeat-containing protein (PPR)’ considerado gen de respuesta a estrés reportado en la especie *Fugacium kawagutti* (Lin *et al.*, 2019). Esto sugiere que los simbiontes *Cladocopium sp.* de cada hospedero de este estudio están bajo diferentes tipos de estrés por las condiciones que se presentan en cada micro-hábitat del que fueron colectados (aguas someras y aguas profundas); también es probable que estos respondan al estrés según los requerimientos de su coral hospedero.

Por otro lado, las PPR son los principales mediadores en la expresión de genes a nivel post-transcripcional en los organelos, tienen roles en la transcripción, procesamiento de ARN, corte, edición y traducción, y por esto son muy importantes en la expresión del genoma y biogénesis de organelos (Manna, 2015). El gen PPR sobre expresado en *Cladocopium sp.* de *P. panamensis* podría estar relacionado con el procesamiento normal de ARN dentro de las células. Los dominios AR median numerosas interacciones entre

proteínas y contribuyen a varias funciones celulares de señalización, regulación del ciclo celular y transporte (Mosavi *et al.*, 2004); también se han reportado su rol en degradar proteínas en simbiontes termo sensibles (*Cladocopium*, tipo C1) (Levin *et al.*, 2016). El gen 'ankyrin repeat domain-containing protein 50 (AR) sobre expresado en *Cladocopium sp.* de *P. sverdrupi*, puede relacionarse tanto al funcionamiento celular regular como a estrés por temperatura.

Cladocopium en ambos hospederos expresa genes involucrados en procesos biológicos como procesamiento y modificaciones de ARN, metabolismo de ATP, modificaciones postraduccionales de proteínas. Genes involucrados en estos procesos han tenido también expresión diferencial en condiciones eutróficas (Lin *et al.*, 2017). Los genes sobre expresados en *Cladocopium* de *P. sverdrupi* realizan modificaciones postraduccionales de proteínas como ubiquitinación, metilación y fosforilación; mientras que en *P. panamensis* solamente está sobre expresados genes del proceso biológico glicosilación. Alta representación de proteínas involucradas en modificaciones postraduccionales ha sido reportada para *Cladocopium* tipo C3, entre éstas el grupo de proteínas de ubiquitina reportada como grupo de proteínas de respuesta al estrés (Leggat *et al.*, 2007), además la medida de ubiquitinación de proteínas es usada como indicador de degradación de proteínas, y en *Fugacium kawaguti* la ubiquitinación es reportada como indicador de estrés oxidativo (Roberty *et al.*, 2016). Se sobre expresan en *Cladocopium* del hospedero *P. sverdrupi*, los genes 'E3 ubiquitin-protein ligase SHPRH' y 'E3 ubiquitin-protein ligase SIS3' también reportadas en *Symbidinium microadriaticum* (Aranda *et al.*, 2017). Y en humanos SHPRH participa en una ruta metabólica fundamental en mecanismo de reparación al ADN que protege el genoma ante estrés genotóxico (Motegi *et al.*, 2006). Esto puede ser indicativo que el coral *P. sverdrupi* y sus simbiontes se encuentra bajo algún tipo de estrés, aunque no es posible de decir si está relacionado con las condiciones de luz y temperatura a la profundidad que se encuentra esta especie.

Los diferentes genes sobre expresados se podrían interpretar como diferenciación ecológica de *Cladocopium* y adaptación a regímenes de luz específicos debido a la distribución de profundidad de sus hospederos en el sitio de estudio. Sin embargo, es necesario realizar experimentos bajo condiciones de luz controladas en estos corales para corroborar lo planteado en este estudio sobre *Cladocopium*. O experimentos con *P. panamensis* a diferentes profundidades

8.2 Genes relacionados con la fotosíntesis

La adaptación a regímenes de luz únicos durante un tiempo evolutivo de algunas especies (como *Symbiodinium minutum*, *S. pseudominutum*, *S. psygmophilum*, *S. eanigmaticum*) se ve reflejada en la variación de expresión de genes entre especies que presentan sobreexpresión de genes relacionados a la fotosíntesis (Parkinson *et al.*, 2016). Estas diferencias pueden tener un rol crucial en la ecología y evolución de la simbiosis coral-dinoflagelado. En este estudio, la síntesis de aminoácidos y fotosíntesis fueron procesos biológicos presentes solamente en *Cladocopium sp. de P. panamensis*, que es el hospedero de distribución somera en el sitio de estudio.

Se conoce que las diferencias en niveles de expresión entre genes relacionados a la fotosíntesis pueden estar relacionadas con la variación en el ciclo circadiano (día y noche) (Hemond & Vollmer, 2015) en un mismo hospedero o entre especies de simbiosis, o puede asociarse a la variación funcional en la bioquímica de la fotosíntesis (Parkinson *et al.*, 2016). En el caso del gen 'Fucoxanthin-chlorophyll a-c binding protein B, chloroplastic' sobre expresado en *Cladocopium sp. de P. panamensis* está involucrado en la fotosíntesis al tener función molecular como proteína colectora de luz ('light-harvesting protein, LH) y unión de clorofila, y podría estar relacionada a cierto grado de estrés térmico al que estén expuestos los corales de distribución somera en este sitio. Esto ha sido reportado con niveles de expresión significativos en simbiosis (*Fugacium*, clado F) expuestos a estrés térmico (Gierz *et al.*, 2017).

Por otro lado se han reportado genes relacionados con la fotosíntesis, y con función de unión de clorofila como 'peridinin-chlorophyll a-binding protein', y las 'intrinsic membrane-bound LHPs' que no están reguladas por la intensidad de luz, sino que sugieren la posibilidad que el control de las funciones fotosintéticas está dado por control-postranscripcional (Xiang *et al.*, 2015). Otras características como diferentes mecanismos de transcripción de los genes de minicírculos también pueden facilitar la especialización ecológica de los simbiosomas a diferentes regímenes de luz (Dang & Green 2010). Esto último, también podría ser considerado en el presente estudio debido a los genes sobre expresados implicados en procesamiento del ARN.

A pesar de que la sobre expresión de genes relacionados con la fotosíntesis en *Cladocodium* presente en el coral *P. panamensis* podría ser debido a una variación funcional bioquímica, al régimen de luz al que está sometido o a un mecanismo de control postranscripcional de la fotosíntesis. Hay evidencia que sugiere que las proteínas LHC (Light-Harvesting protein Complex, por sus siglas en inglés) poseen una evidente diversidad funcional que permite a los dinoflagelados simbióticos utilizar con eficiencia la variedad de condiciones de luz que se pueden encontrar en el medio marino; al menos, esto señalan Bold y colaboradores (2012) que ocurre en *Cladocodium* tipo C3. Por lo que se evidencia que *Cladocodium* está funcionalmente adaptado al régimen de luz que presenta su hospedero, *P. panamensis*, en su distribución somera (0 a 5 m).

8.3 Genes relacionados a procesos celulares esenciales

La expresión de algunos genes como actina, tubulina, cicofilina, calmodulin, y proteínas de choque térmico como HPS70 y HPS90, se mantiene estable en diferentes géneros de la familia Symbiodiniaceae, debido al rol en procesos celulares esenciales y son independientes del estrés al que estén expuestos los corales (Rosic *et al.*, 2015). En este estudio se sobre expresan el gen 'Tubulin Alpha-3 chain' en *Cladocodium* de *P. sverdrupi* y los genes 'actin cytoplasmatic', 'tubulin alpha chain', 'tubulin beta chain' en *Cladocodium* de *P. panamensis*; ellos tienen la función molecular de unión de GTP (guanosin trifosfato) y unión de nucleótidos de importancia en la transducción de señales fuera de la célula las

cuales se activan al unir GTP y se desactivan al estar unidas al GDP, y son principales constituyentes de los microtúbulos que pueden estar asociados con diversas proteínas e influir en su estado de polimerización (Lehninger, Nelson & Cox, 2004). Estos genes son comúnmente usados como HKGs (house keeping genes) (DeSalvo *et al.*, 2010b; Rosic *et al.*, 2011b) por ser genes requeridos para el mantenimiento de las funciones básicas celulares, en el caso de tubulina y actina, involucrados en la organización del citoesqueleto.

Por otro lado, las proteínas de choque térmico han sido reportadas en corales como indicadoras de estrés, sin embargo, en *Symbiodiniaceae* los patrones de expresión de estas proteínas sugieren una regulación independiente del hospedero (Rosic *et al.*, 2011). Las proteínas de choque térmico están involucradas en el plegamiento y desplegamiento de proteínas, así como en procesos de degradación y transporte, y se consideran evolutivamente conservadas e importantes para regular funciones celulares (Sorensen *et al.*, 2003), por lo que la sobre expresión de la proteína “Aha1_N domain-containing protein” en *Cladocopium* del hospedero *P. panamensis*, que desempeña la función molecular de unión a la proteína HPS90, actúa como chaperona de unión y activadora de ATPasa, y no se consideraría como gen de respuesta a estrés sino como gen conservado para funciones celulares regulares.

El nitrógeno es un factor limitante en ambientes oligotróficos en aguas marinas tropicales, por lo que muchos organismos marinos poseen la habilidad de asimilar nitrógeno de fuentes inorgánicas (Pernice *et al.*, 2012). Dado esta limitación de nutrientes la traslocación de nitrógeno orgánico en forma de aminoácidos, de parte de *Symbiodiniaceae* al coral es muy importante (Gordon & Leggat, 2010). Evidencia de esto es que los dominios de transportadores de amonio están altamente enriquecidos en todas las especies de *Symbiodiniaceae*, y se han identificado en el genoma 68 dominios transportadores de amonio en *Symbiodinium microadriaticum*, 42 en *Breviolum minutum*, y 46 en *Fugacium kawagutti* (Aranda *et al.*, 2017).

En *Cladocopium sp.* los procesos biológicos con mayor frecuencia para ambos hospederos fueron procesos metabólicos de compuestos de nitrógeno (Fig.11 y 12). Se conoce que tanto los corales como los dinoflagelados de Symbiodiniaceae son capaces de asimilar amonio de su ambiente, además de producirlo metabólicamente vía las enzimas glutamato deshidrogenasa y glutamina sintetasa. Por lo que la sobre expresión de los genes glutamina sintetasa y glutamato sintasa [NADPH] de cadena larga en *Cladocopium*, de *P. sverdrupi* y *P. panamensis*, respectivamente, nos indica la absorción de nitrógeno inorgánico del ambiente, importante para la biosíntesis de aminoácidos y la translocación de compuestos de nitrógeno al hospedero. La limitación de nitrógeno en los simbioses es sugerida como mecanismo por el cual el hospedero induce la biosíntesis de lípidos y polisacáridos en Symbiodiniaceae (Peng *et al.*, 2012), y se sabe que los lípidos son una de las principales fuentes de energía de los corales por parte de sus simbioses.

Los genes sobre expresados relacionados con procesos celulares esenciales nos indican que *Cladocopium* independientemente del estrés al que esté sometido por las diferentes condiciones que puedan presentarse para los corales en el sitio de estudio, desempeñan las actividades celulares necesarias para procesos biológicos esenciales como el metabolismo del nitrógeno, síntesis de aminoácidos y transporte transmembrana de compuestos. Estos procesos a su vez son importantes para los hospederos que reciben constantemente nutrientes de parte de sus simbioses dinoflagelados.

9. CONCLUSIONES

- Se detectaron 107 genes expresados diferencialmente en el transcriptoma de *Cladocopium sp.* respecto a dos hospederos, los corales *Porites panamensis* y *Porites sverdrupi*.
- La sobre expresión de 74 genes en *Cladocopium* del hospedero *P. panamensis* de distribución somera y 33 genes para el hospedero *P. sverdrupi* de distribución profunda en el sitio de estudio, indica cierto grado de especialización ecológica por parte de los simbiositos ya que responden a nivel molecular de manera diferente.
- Los genes sobre expresados por *Cladocopium* proveniente de *P. panamensis* están involucrados en procesos biológicos de respuesta a estrés por daño al ADN inducido por radiación UV y genes de respuesta a estrés por temperatura, lo cual se podría interpretar como diferenciación ecológica o adaptación a un régimen de luz específico.
- *Cladocopium* proveniente de *P. sverdrupi* sobre expresa genes involucrados en respuesta a estrés que están involucrados en degradación de proteínas y modificaciones postraduccionales de proteínas, los cuales pueden estar relacionados a otro tipo de estrés como poca penetración de luz o mayor cantidad de nutrientes disueltos en el medio.
- En *Cladocopium* de ambos hospederos se sobre expresaron genes involucrados en procesos celulares esenciales como transporte de nutrientes, transducción de señales fuera de la célula, metabolismo del nitrógeno esencial para síntesis de aminoácidos, que codifican para proteínas estructurales y genes involucrados en el procesamiento de proteínas. Estos genes se consideran conservados y de gran importancia para la simbiosis que *Cladocopium* mantiene con sus hospederos.

10. LITERATURA CITADA

- Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics/babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Ashburner, M. *et al.* 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25(1):25-29.
- Aranda, M. *et al.*, 2017. Genomes of coral dinoflagellate symbionts highlight evolutionary adaptations conducive to a symbiotic lifestyle. *Nat. Sci. Rep.* 6:39734
- Banaszak, A., T. LaJeunesse, R.K. Trench. 2000. The synthesis of mycosporine-like amino acids (MAAs) by cultured, symbiotic dinoflagellates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249(2): 219-233.
- Barfield, S. J., G. V. Aglyamova, L. K. Bay, M. V. Matz. 2018. Contrasting effects of *Symbiodinium* identity on coral host transcriptional profiles across latitudes. *Mol. Ecol.*, 27(15), 3103-3115.
- Barshis, D., J. Ladner, T. Oliver, F. Seneca, N. Traylor-Knowles, S. Palumbi. 2013. Genomic basis for coral resilience to climate change. *PNAS*, 110(4): 1387-1392.
- Barshis, D., J. Ladner., T. Oliver, S. Palumbi. 2014. Lineage-Specific transcriptional profiles of *Symbiodinium* spp. Unaltered by heat stress in a coral host. *Mol. Evol.* 31(6): 1343-1352.
- Bayer, T., M. Aranda, S. Sunagawa, L. YumDeSalvo, E., A. Coffroth, C. Voolstra, M. Medina. 2012. *Symbiodinium* transcriptomes: Genome insights into the Dinoflagellate Symbionts of Reef-Building Corals. *PLoS ONE* 7(4): e35269.
- Brander, L., P. Van Beukering, S.J. Cesar. 2007. The recreational value of coral reefs: a meta-analysis. *Ecol. Econ.* 63(1): 209-218.
- Byler, K., M. Carmi-Veal, M. Fine, T. Goulet. 2013. Multiple symbiont acquisition strategies as an adaptive mechanism in the *Stylophora pistillata*. *PLoS ONE*, 8(3): 1-7
- Bolger, A. M., M. Lohse, B. Usadel. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinform.*, btu170.
- Boldt L, D. Yellowlees, W. Leggat. 2012. Hyperdiversity of genes encoding integral light-harvesting proteins in the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *PLoS One* 7:e47456
- Cabral-Tena, R., H. Reyes-Bonilla, S. Lluch-Cota, D. Paz-García, L. Calderón-Aguilera, O. Norzagaray-López, E. F. Balart. 2013. Different calcification rates in males and females of the coral *Porites panamensis* in the Gulf of California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 476: 1-8.

- Camacho, C. *et al.* 2009. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 10:421.
- Chávez-Romo, H., A. Paz-García, F. Correa-Sandoval, H. Reyes-Bonilla, R. López-Pérez, P. Media-Rosas. 2013. Difference in reproductive strategies of two scleractinian corals (branching vrs, massive) along the west coast of México. *Cienc. Mar.* 39(4): 387-400.
- Chen, J.E., G. Cui, X. Wang, Y.J. Liew, M. Aranda. 2018. Recent expansion of heat-activated retrotransposons in the coral symbiont *Symbiodinium microadriaticum*. *ISME J* 12, 639-643.
- Chiriboga, A. G. Edgar, H. Reyes-Bonilla. 2008. *Porites sverdrupi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T133512A3781140.
- Colquhoun, D. 2014. An investigation of the false discovery rate and the misinterpretation of p-values. *R. Soc. Open sci.* 1:14016.
- Dang, Y., B.R. Green. 2010. Long transcripts from dinoflagellate chloroplast minicircles suggest “rolling circle” transcription. *J. Biol. Chem.* 285:5196-5203
- Daniels, C., S. Baumgarten, L. Yum, C. Michell, T. Bayer, C. Arif, C. Roder, E. Weil, C. Voolstra. 2015. Metatranscriptome analysis of the reef-building coral *Orbicella faveolata* indicates holobionts response to coral disease. *Front. Mar. Sci.* 2:62.
- Davies, S., A. Marchetti, J. Ries, K. Castillo. 2016. Thermal and pCO₂ stress elicit divergent transcriptomic responses in a resilient coral. *Front. Mar. Sci.* 3:112
- DeSalvo, M., S. Sunagawa, P. Fisher, C. Voolstra, R. Iglesias-Prieto, M. Medina. 2010. Coral host transcriptomic states are correlated with *Symbiodinium* genotypes. *Mol. Ecol.* 19: 1174-1186.
- DeSalvo, M., S. Sunagawa, C. Voolstra, M. Medina. 2010b. Transcriptomic responses to heat stress and bleaching in the elkhorn coral *Acropora palmata*. *MEPS* 402: 97-113.
- Dixon, P. 2009. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Sci.* 14, 927–930.
- Dubinsky, Z., N. Stambles. 2011. *Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Springer. United States.
- Eddy SR. 2009. A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Gen. Inform.* 23:205-11
- Edmunds, P. 2011. Zooplanktivory ameliorates the effects of ocean acidification on the reef coral *Porites* spp. *Limnol. Oceanogr.* 56(6): 2402-2410.

- Fassler J, Cooper P. BLAST Glossary. 2011 Jul 14. In: BLAST Help [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>
- Fiedler, P. 2002. Environmental change in the eastern tropical Pacific Ocean: review of ENSO and decadal variability. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 244(29): 265-283.
- Finney J.C., D. Pettay, E. Sampayo, M. Warner, H. Oxendorf, T. LaJeunesse. 2010. The relative significance of host-habitat, depth, and geography on the ecology, endemism, and speciation of coral endosymbionts in the genus *Symbiodinium*. *Microb. Ecol.* 60(1): 250-263.
- Foster, M., R. Riosmena-Rodriguez, D. Steller, J. Woelkerling. 1997. Living rhodolith beds in the Gulf of California and their implications for paleoenvironmental interpretation. In: Johnson, M. Ledesma-Vazquez. 1997 *J. Pliocene Carbonates and Related Facies Flanking the Gulf of California, Baja California, Mexico*. Dept. of Geosciences, Massachusetts.
- Forrest. M., J. Ledesma-Vázquez, W. Ussler, J. Kulongoski, D. Hilton, H. Greene. 2005. Gas geochemistry of a shallow submarine hydrothermal vent associated with the El Requeson fault zone, Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *Chem. Geol.* 224: 82-95.
- Frade, PR., F. De Jongh, F. Vermeulen, J. Van Bleijswijk, R.P.M. Bak. 2008. Variation in symbiont distribution between closely related coral species over large depth ranges. *Mol. Ecol.* 17:691-703.
- Network v.5.0.1.1.<https://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm> Expertise in software for genetics and engineering.2004-2019.
- Genikhovich, G. U. Technau. 2009. The starlet sea anemone *Nematostella vectensis*: An anthozoan model organism for studies in comparative genomics and functional evolutionary developmental biology. *Cold Spring Harb Protoc.*
- Gierzs, S., S. Foret, W. Leggat. 2017. Transcriptomic analysis of thermally stressed *Symbiodinium* reveals differential expression of stress and metabolism genes. *Front. Plant Sci.* 8: 271.
- Glynn P.W. *et al.*, 2017. Eastern Pacific coral reef provinces, coral community structure and composition: an overview. In: Glynn P., Manzello, D., Enochs, I. (eds) *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific*. *Coral Reefs of the World*, vol 8. Springer, Dordrecht.
- González-Pech, R., M. Ragan, C. Chan. 2017. Signatures of adaptation and symbiosis in genomes and transcriptomes of *Symbiodinium*. *Nat. Sci. Rep.* 7: 15021

- González-Pech, R., S. Vargas, W. Francis, G. Worheide. 2017b. Transcriptomic resilience of a coral holobiont to low pH. bioRxiv. 157008.
- González-Pech, R., T. Stephens, C. Xin. 2018. Commonly misunderstood parameters of NCBI BLAST and important considerations for users. Bioinform. 2018: 1-2.
- Gordon, B.R., W. Leggat. 2010. *Symbiodinium* Invertebrate symbioses and the role of metabolomics. Mar. Drugs. 8(10): 2546-2568.
- Grabherr, M., *et al.* 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nat. Biotechnol., 29: 644-652.
- Guendulain, S. 2010. Variación de la densidad de zooxantelas, concentración de pigmentos, biomasa y porcentaje de lípidos en tejidos de *Pavona gigantea* Verril, 1896 en Bahías de Huatulco. (Tesis de Licenciatura en Biología Marina). Universidad del Mar. Oaxaca, México.
- Guzmán, H., J. Cortés. 2008. *Porites panamensis*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2. www.iucnredlist.org.
- Halfar, J., L. Godinez-Orta, B. Riegl, J.E. Valdez-Holguin, J.M. Borges. 2005. Living on the edge: high-latitude *Porites* carbonate production under temperate eutrophic conditions. Coral Reefs, 24(4): 582–592.
- Hass, B. J. *et al.* 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nat. Protoc. 8: 1494-1512.
- Helmkampf, M., M. R. Bellinger, M. Frazier, M. Takabayashi. 2018. Symbiont type and environmental factors affect transcriptome-wide gene expression in the coral *Montipora capitata*. Ecol. Evol. 9(1):378-392.
- Hemond, E.M., S.V. Vollmer. 2015. Diurnal and nocturnal transcriptomic variation in the Caribbean staghorn coral, *Acropora cervicornis*. Mol. Ecol. 24: 4460-4473.
- Henson, J., G. Tischler. Z. Ning. 2012. Next-generation sequencing and large genome assemblies. Pharmacogenomics 12(8): 901-915.
- Iglesias-Prieto, R., H. Reyes, R. Riosmena. 2003. Effects of 1997-1998 ENSO on coral reef communities in the Gulf of California, Mexico. Geofis. Int. 42 (3):467-471.
- Iglesias-Prieto R, V.H. Beltran, T. LaJeunesse, H. Reyes-Bonilla, P.E. Thome. 2004. Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. Proc. R. Soc. Lon., B, Biol. Sci. 271: 1757–1763.

- Keeling, P., *et al.* 2014. The Marine Microbial Eukaryote Transcriptome Sequencing Project (MMETSP): illuminating the functional diversity of eukaryotic life in the oceans through transcriptome sequencing. *PLOS Biol.* 12: e1001889.
- Kenkel, C. D., E. Meyer, M.V. Matz. 2013. Gene expression under chronic heat stress in populations of the mustard hill coral (*Porites astreoides*) from different thermal environments. *Mol. Ecol.* 22:4322–4334.
- Ladner, J., D. Barshis, S. Palumbi. 2012. Protein evolution in two co-occurring types of *Symbiodinium*: an exploration into the genetic basis of thermal tolerance in *Symbiodinium* clade D. *BMC Evol. Biol.* 12, 217.
- Lafond-Lapalme, J., D. Marc-Olivier, S. Wang, P. Moffett, B. Mimee. 2017. A new method for decontamination of de novo transcriptomes using a hierarchical clustering algorithm. *Bioinform.* 33 (9): 1293-1300.
- Langmead, B., S. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods.* 9: 357-359.
- LaJeunesse, T. C., H.R. Bonilla, M. Warner, M. Wills, G.W. Schmidt. 2008. Specificity and stability in high latitude eastern Pacific coral – algal symbioses. *Limnol. Oceanogr.* 53(2): 719–727.
- LaJeunesse, T., R. Smith, M. Walther, J. Pinzón, D. Pettay, M. McGinley, M. Aschaffenburg. 2010. Host-symbiont recombination versus natural selection in the response of coral-dinoflagellate symbioses to environmental disturbance. *Proc. Biol. Sci.* 277(1696): 2925–2934.
- LaJeunesse, T., J. Parkinson, P. Gabrielson, H. Jeong, J. Reimer, C. Voolstra, S. Santos. 2018. Systematic revision of Symbiodiniaceae highlights the antiquity and diversity of coral endosymbionts. *Curr. Biol.* 28(16): 2570-2580.
- Levin, R., *et al.* 2016. Sex, scavengers, and chaperones: transcriptome secrets of divergent *Symbiodinium* thermal tolerances. *Mol. Biol. Evol.* 33, 2201-2215.
- Leal-Acosta, M., E. Shumilin, N. Mirlean, F. Delgadillo-Hinojosa, I. Sánchez-Rodríguez. 2013. The impact of marine shallow water hydrothermal venting on arsenic and mercury accumulation by seaweed *Sargassum sinicola* in Concepcion Bay, Gulf of California. *Environ. Sci: Processes Impacts.*
- Leggat, W., O. Hoegh-Guldberg., S. Dove. 2007. Analysis of and EST library from the dinoflagellate (*Symbiodinium* sp.) symbiont of reef-building corals. *J. Phycol.* 43: 1010-1021.

- Leggat W, D. Yellowlees, M. Medina. 2011. Recent progress in *Symbiodinium* transcriptomics. J Exp. Mar. Biol. Ecol. 408:120–125.
- Lehnert, E., M. Mouchka, M. Burriesci, N. Gallo, J. Schwarz, J. Pringle. 2014. Extensive differences in gene expression between symbiotic and aposymbiotic cnidarians. G3, 4 (2): 277-295.
- Lewis A, A. Chan, T. LaJeunesse. 2018. New species of closely related endosymbiotic dinoflagellates in the greater Caribbean have niches corresponding to host coral phylogeny. J. Eukaryot. Microbiol. 2018, 0, 1-14.
- Li, B., C. Dewey. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. BMC Bioinformatics 12, 323.
- Liew, Y., M. Aranda, C. Voolstra. 2016. Reefgenomics.Org- a repository for marine genomics data. Database. baw152.
- Lin, S. 2011. Genomic understanding of dinoflagellates. Res. Microbiol. 162: 551-569.
- Lin, S., et al. 2015. The *Symbiodinium kawagutti* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis. Sci. 350 (6261): 691-694.
- Lin, Z., Chen, M., X. Dong, X. Zheng, H. Huang, X. Xu, J. Chen. 2017. Transcriptome profiling of *Galaxea fascicularis* and its endosymbiont *Symbiodinium*, reveals chronic eutrophication tolerance pathways and metabolic mutualism between partners. Nat. Sci. Rep. 7:42100.
- Lin, S., L. Yu, H. Zhang. 2019. Transcriptomic responses to thermal stress and varied phosphorus conditions in *Fugacium kawagutti*. Microorganisms 7(4): 96.
- Liu, H., et al., 2018. *Symbiodinium* genomes reveal adaptive evolution of functions related to coral-dinoflagellate symbiosis. Nat. Comm. Biol. 1:95.
- Lehninger, A., D. Nelson, M. Cox. 2004. Principles of biochemistry. Worth Publishers. 4th edition. New York. 1328 p.
- Lluch-Cota, S., et al., 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. Prog. Oceanogr. 73 (1): 1-26.
- López-Pérez, A., H. Reyes-Bonilla, A. Budd, F. Correa-Sandoval. 2003. The taxonomic status of *Porites sverdrupi*, an endemic coral of the Gulf of California. Cienc. Mar. 29(4B): 677-691.
- López-Pérez, R. 2013. Species composition and morphologic variation of *Porites* in the Gulf of California. Coral Reefs 32: 867-878.

- Love, M., W. Huber, S. Anders. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15: 1-21.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko. 2003. *Brock biology of microorganisms*. Pearson-Prentice Hall. 10th ed. ISBN 84-205-3679-2.
- Manna, S. 2015. An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie.* 113: 93-99.
- Manzello, D., J. Kleypas, D. Budd, C. Eakin, P. Glynn, C. Langdon. 2008. Poorly cemented coral reefs of the eastern tropical Pacific: possible insights into reef development in a high-CO₂ world. *PNAS* 105(30): 10450–5.
- Mansour, T., J. Rosenthal, C. Brown. 2016. Transcriptome of the Caribbean stony coral *Porites astreoides* from three developmental stages. Submitted
- Martínez-Castillo, V., H. Reyes-Bonilla, A. Rocha-Olivares. 2018. High genetic diversity and limited genetic connectivity in 2 populations of an endemic and endangered coral species: *Porites sverdrupi*. *Cienc. Mar.* 44 (1): 49-58.
- Méndez Mendez, S.M. 2016. Diversidad genética de los dinoflagelados simbióticos (*Symbiodinium*) del coral *Porites panamensis* en el Pacífico Oriental Tropical. (Tesis Licenciatura en Biología). Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. 81 p.
- Meyer, E., G.V. Aglyamova, M.V. Matz. 2011. Profiling gene expression responses of coral larvae (*Acropora millepora*) to elevated temperature and settlement inducers using a novel RNA-Seq procedure. *Mol. Ecol.* 20, 3599–3616.
- Mosavi, L.K., T.J. Cammett, D.C. Desrosiers, Z. Peng. 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.* 2004, 13, 1435–1448.
- Moya, A., L., *et al.* 2012. Whole transcriptome analysis of the coral *Acropora millepora* reveals complex responses to CO₂-driven acidification during the initiation of calcification. *Mol. Ecol.* 21, 2440–2454.
- Mortazavi, A., B. Williams, K. McCue., L. Schaeffer, B. Wold. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. *Nat. Met.* 5, 621-628.
- Motegi, A., R. Sood, H. Moinova, S. Markowitz, P. Liu, K. Myung. 2006. Human SHPRH suppresses genomic stability through proliferating cell nuclear antigen polyubiquitination. *J. Cell Biol.* 175(5): 703.
- NHI. 2020. Genetics Home Reference. <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/hgp/genome> National Human Genome Research Institute.

- O'Neil, S. S. Emrich. 2013. Assessing *De Novo* transcriptome assembly metrics for consistency and utility. *BMC Genomics* 2013, 14:465.
- Oporto-Guerrero, T. H. Reyes-Bonilla, L.B. Ladah. 2016. Presence of the reef-building coral, *Porites panamensis*, in a shallow hydrothermal field in the Gulf of California. *Mar. Biodiv.* 1-6.
- Parkinson, J., S. Baumgarten, C. Michell, I. Baums, T. LaJeunesse, C. Voolstra. 2016. Gene expression variation resolves species and individual strains among coral-associated dinoflagellates within the genus *Symbiodinium*. *Genome Biol. Evol.* 8(3): 665-680.
- Paz-García, D., F. Correa-Sandoval, H. Chávez-Romo, H. Reyes Bonilla, R. López-Pérez, P. Medina-Rosas, M. Hernández-Cortés. 2008. Genetic structure of the massive coral *Porites panamensis* (Anthozoa: Scleractinia) from the Mexican Pacific. *Proc. Inter. Coral Reef Symposium*, (14): 449–453.
- Paz-García, D., T. LaJeunesse, H. Chávez-Romo, F. Correa-Sandoval, H. Reyes-Bonilla. 2008b. Differences in the distribution of *Symbiodinium spp.* among morphotypes and genotypes of *Porites panamensis* from the Gulf of California, Mexico. *Proc. Inter. Coral Reef Symposium*, (5): 164–167.
- Paz-García, D., H. Chávez-Romo, F. Correa-Sandoval, H. Reyes-Bonilla, A. López-Pérez, P. Medina-Rosas, M. Hernández-Cortés. 2012. Genetic connectivity patterns of corals *Pocillopora damicornis* and *Porites panamensis* (Anthozoa: Scleractinia) along the West Coast of Mexico. *Pac. Sci.* 66(1): 43-61.
- Paz-García, D., E.F. Balart. 2016. New record of the endemic coral *Porites sverdrupi* (Gulf of California): do fluctuations in seawater temperature regulate its southernmost range limit?. *Mar. Biodiv.* 46(2):499-502.
- Paz-García, D., C. Galván-Tirado, J. Alvarado, J. Cortés, F. García-De-León, M. Hellberg, E.F. Balart. 2016. Variation in hole mitogenome of reef building *Porites* corals. *Conserv. Genet. Resour.* 8 (2): 123-127.
- Peng, S., S. Chen, Y., Song, H. Huang, P. Jiang, W. Chen, L. Fang, Y. Lee. 2012. Assesment of metabolic modulation in free-living versus endosymbiotic *Symbiodinium* using synchrotron radiation-bases infrared microspectroscopy. *Biol. Lett.* 8: 434-437. doi:10.1098/rsbl.2011.0893
- Peixoto RS, P.M. Rosado, D.C.A. Leite, A.S. Rosado, D.G. Bourne. 2017. Beneficial microorganisms for corals (BMC): proposed mechanisms for coral health and resilience. *Front. Microbiol.* 8:341.

- Pernice, M., A. Meibom, A. Heuvel, C. Kopp, I. Domart-Coulon, O. Hoegh-Guldberg, S. Dove. 2012. A single-cell view of ammonium assimilation in coral-dinoflagellate symbiosis. *ISME J* 6: 1314-1324.
- Pochon, X., R. Gates. 2010. A new *Symbiodinium* clade (Dinophyceae) from soritid foraminifera in Hawai'i. *Mol. Phyl.Evol.* 56: 492-497.
- Pochon, X., H. Putman, F. Burki, R. Gates. 2012. Identifying and characterizing alternative molecular markers for the symbiotic and free-living dinoflagellate genus *Symbiodinium*. *PLoS ONE* 7 (1): 1-13
- Potts, D., T. Done, P. Isdale, D. Fisk. 1984. Dominance of a coral community by the genus *Porites* (Scleractinia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 23(1): 79-84.
- Prada, C., S. McIlry, C. Beltran, D. Valint, S. Ford, M. Hellberg, A. Coffroth. 2014. Cryptic diversity hides host and habitat specialization in a gorgonian-algal symbiosis. *Mol. Ecol.* 23: 3330-3340.
- Reyes-Bonilla, H., R. Riosmena-Rodríguez, M. Foster. 1997. Hermatypic corals associated with rhodolith beds in the Gulf of California, México. *Pac. Sci.* 51(3):328-337.
- Reef, R., S. Dunn, O. Levy, S. Dove, E. Shemesh, I. Brickner, W. Leggat, O. Hoegh-Guldberg. 2009. Photoreactivation is the main repair pathway for UV-induced DNA damage in coral planulae. *J. Exper. Biol.* 212: 2760-2766.
- Riesgo, A., K. Peterson, C. Richardson, T. Heist, B. Strehlow, M. McCauley, C. Cotman, M. Hill, A. Hill. 2014. Transcriptomic analysis of differential host gene expression upon uptake of symbionts: a case study with *Symbiodinium* and the major bioeroding sponge *Cliona varians*. *BMC Genomics*, 15:376
- Rivest, EB., M.W. Kelly, M.B. DeBiase, E.G. Hofmann. 2018. Host and symbiont in *Pocillopora damicornis* larvae display different transcriptomic responses to ocean acidification and warming. *Front. Mar. Sci.* 5:186.
- Roberty, S., P. Furla, J.C. Plumier. 2016. Differential antioxidant response between two *Symbiodinium* species from contrasting environments. *Plant Cell Environ.* 39 (12): 2713-2724.
- Rodríguez-Meza G.D., E. Shumilin, D. Sapozhnikov, L. Méndez-Rodríguez, B. Acosta-Vargas. 2009. Evaluación geoquímica de elementos mayoritarios y oligoelementos en los sedimentos de Bahía Concepción (B.C.S., México). *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 61: 57-72.
- Rosic, N.N., M. Pernice, S. Dove, S. Dunn, O. Hoegh-Guldberg. 2011. Gene expression profiles of cytosolic heat shock proteins Hsp70 y Hsp90 from symbiotic dinoflagellates in

- response to thermal stress: possible implications for coral bleaching. *Cell stress chaperones* 16(1): 69-80.
- Rosic, N.N., M. Pernice, M. Rodriguez-Lanetty, O. Hoegh-Guldberg. 2011b. Validation of Housekeeping genes for gene expression studies in *Symbiodinium* exposed to thermal and light stress. *Mar. Biotechnol.* 13(3): 355-365.
- Rosic, N.N., E. Siang, C. Chan, H. Ching, P. Kaniewska, D. Edwards, S. Dove, O. Hoegh-Guldberg. 2015. Unfolding the secrets of coral-algal symbiosis. *The ISME Journal*, (2015) 9: 844-856.
- Rowan R., N. Knowlton. 1995. Intraspecific diversity and ecological zonation in coral algal symbiosis. *PNAS. U S A.* 92:2850–2853.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. Ramos-Onsins, A. Sánchez-Gracia. 2017. DnaSP v6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3299-3302
- Saavedra-Sotelo, N.C., L.E. Calderon-Aguilera, H. Reyes-Bonilla, D.A. Paz-García, R.A. López-Pérez, A. Cupul-Magaña, J.A. Cruz-Barraza, A. Rocha-Olivares. 2013. Testing the genetic predictions of a biogeographical model in a dominant endemic Eastern Pacific coral (*Porites panamensis*) using a genetic seascape approach. *Ecol. Evol.* 3 (12): 4070-91.
- Seifert, E. 2014. OriginPro 9.1: Scientific Data Analysis and Graphing Software-Software Review. *J. Chem. Inf. Model.* 54(5): 1552-1552.
- Seppey M., M. Manni, E.M. Zdobnov. 2019. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In: Kollmar M. (eds) *Gene Prediction. Methods. Mol. Biol.* vol 1962. Humana, New York, NY.
- Shinzato, C., *et al.* 2011. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change. *Nature* 476: 320-323.
- Shinzato, C., I. Mayuri, K. Makoto. 2014. A snapshot of a Coral “Holobiont”: A transcriptome assembly of the scleratinian Coral, *Porites*, captures a wide variety of genes from both the host and symbiotic zooxantellae. *Plos One* 9(1): e85182.
- Shoguchi, E., *et al.* 2013. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure. *Curr. Biol.* 23(15):1399-1408.
- Shoguchi, E., *et al.*, 2018. Two divergent *Symbiodinium* genomes reveal conservation of gene cluster for sunscreen biosynthesis and recently lost genes. *BMC Genomics* 19:458.

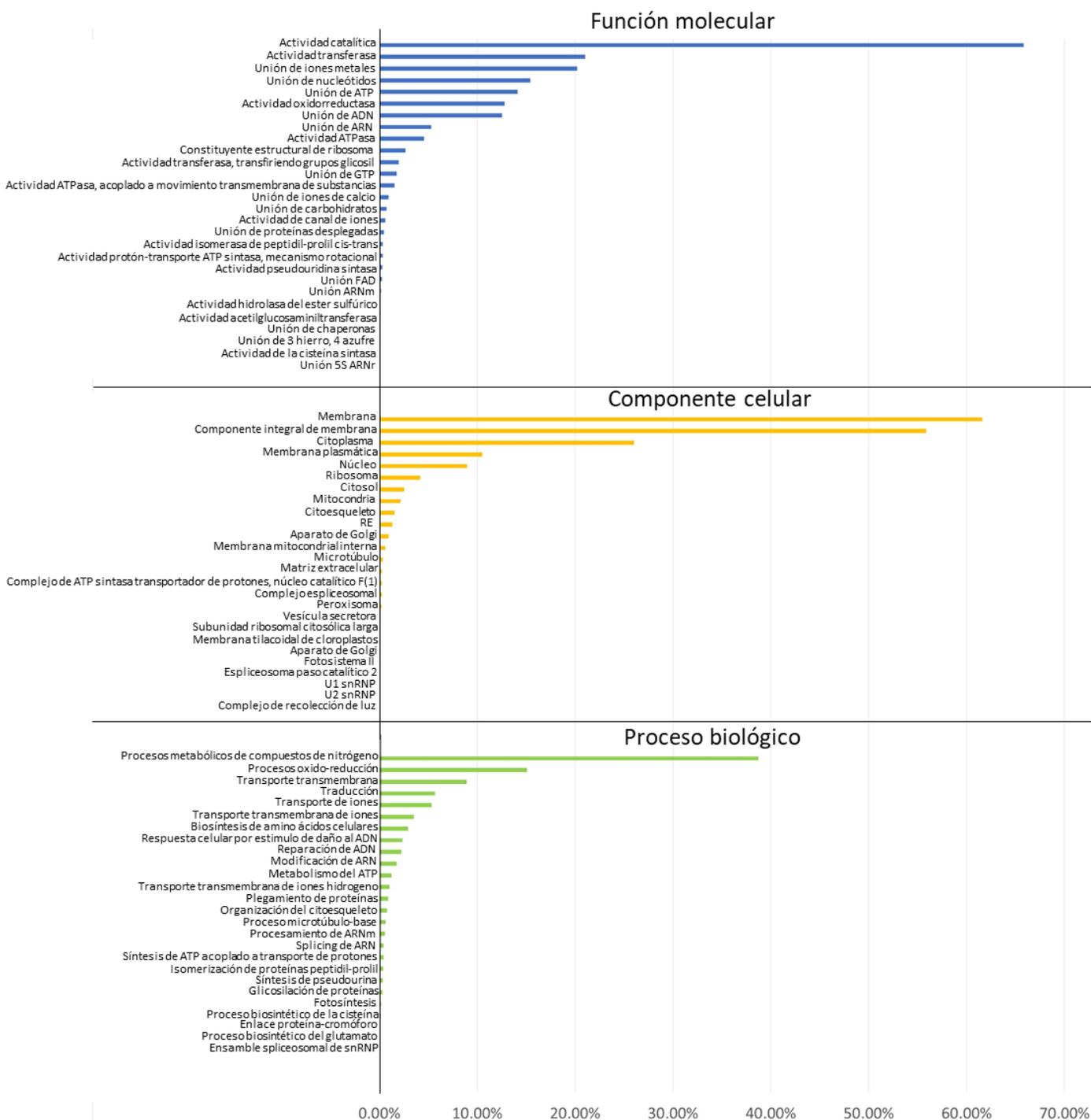
- Sorensen, J., T. Kristensen, V. Loeschcke. 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6: 1025-1037.
- Stanke, M., M. Diekhans, R. Baertsch, D. Haussler. 2008. Using native and syntenically mapped cDNA alignments to improve de novo gene finding. *Bioinform.* 24(5): 637-44.
- Stat, M., D. Carter, O. Hoegh-Guldberg. 2006. The evolutionary history of *Symbiodinium* and scleractinian hosts-Symbiosis, diversity, and the effect of climate change. *Perspec. Plant Ecol. Evol. Syst.* 8: 23–43.
- Steller, D. Foster, M. 1995. Environmental factors influencing distribution and morphology of rhodoliths in Bahia Concepcion, B.C.S., Mexico. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 194:201-202.
- Supek, F., M. Bošnjak, N. Škunca, T. Šmuc. 2011. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One*, 6 (7): e21800.
- Scitable by Nature Education. <https://www.nature.com/scitable/definition/transcriptome-296/>
- The Gene Ontology Consortium. 2019. The Gene Ontology Resource: 20 years and still Going strong. *Nucleic Acids Res.* 41(D1): D330-D338.
- Tritt, A. J.A. Eisen, M.T. Facciotti, A.E. Darling. 2012. An integrated pipeline for de novo assembly of microbial genomes. *PLoS ONE* 7(9): e42304.
- Veron, J. E. N. 2000. Corals of the world: vols 103. AIMS and CRR. Queensland, Australia.
- Veron, J.E., O. Hoegh-Guldberg, T.M. Lenton, J.M. Lough, D.O. Obura, P. Pearce-Kelly, C.R. Sheppard, M. Spalding, M.G. Stafford-Smith, A.D. Rogers. 2009. The coral reef crisis: the critical importance of <350 ppm CO₂. *Mar. Pollut. Bull.* 58(10):1428-36.
- Walther-Mendoza, M., H. Reyes-Bonilla, T. LaJeunesse, A. López-Pérez. 2016. Distribución y diversidad de dinoflagelados simbióticos en corales pétreos de la Costa de Oaxaca, Pacífico de México. *Rev. Mex. Biodivers.* 87(2): 417-426.
- Wang, J., A. Douglas. 1999. Essential amino acid synthesis and nitrogen recycling in an alga-invertebrate symbiosis. *Mar. Biol.* 135 (2): 219-222.
- Wang, Z., M. Gerstein, M. Snyder. 2009. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10: 57-63.
- Weis, V. 2008. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: stress causes the collapse of symbiosis. *J. Exper. Biol.* 211:3059-3056.
- Wibberg, D. 2018. The *Porites rus* whole genome shotgun. CEBITEC, Genome Research of industrial microorganisms (GRIM), Universitaetsstrasse 27, 33615. Submitted.

- Wright, R. M., G.V. Aglyamova, E. Meyer, M.V. Matz. 2015. Gene expression associated with white syndromes in a reef building coral, *Acropora hyacinthus*. BMC Genomics 16:371.
- Xiang, T., W. Nelson, J. Rodriguez, D. Tolleter, A. Grossman. 2015. *Symbiodinium* transcriptome and global responses of cells to immediate changes in light intensity when grown under autotrophic or mixotrophic conditions. The Plant J. 82: 67-80.

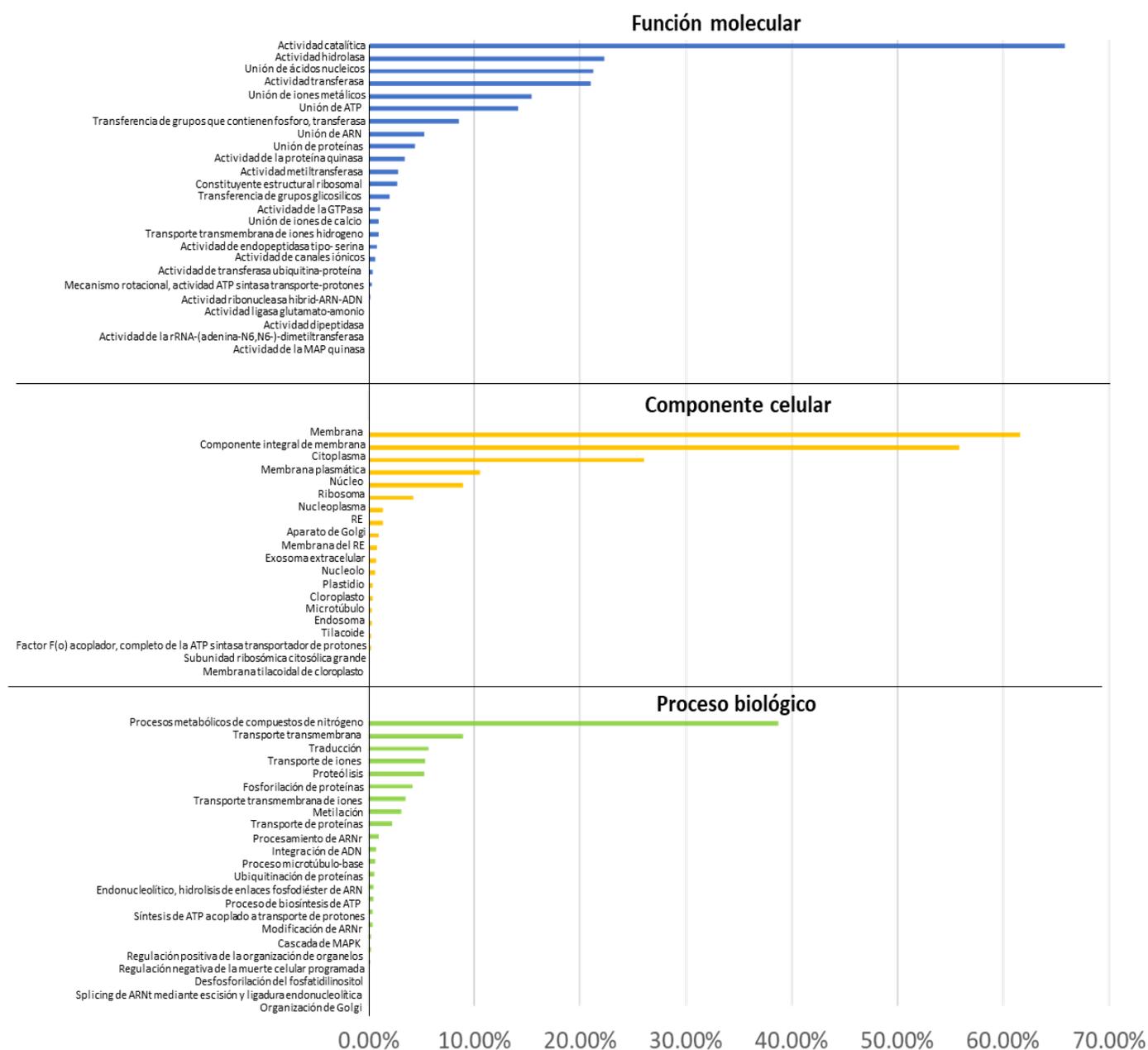
11. ANEXOS

Anexo A. Librerías de RNA-seq utilizadas en los análisis bioinformáticos

Especie coral	ID	Número de lecturas		No. De lecturas eliminadas	%CG	Lecturas a ensamblar	
		Número inicial	Después del corte de calidad				
<i>Porites Panamensis</i>	162_R1	7374816	2955485	4419331	46		
	162_R2	7374816	2955485	4419331	48		
	163_R1	6514717	593965	5920752	53		
	163_R2	6514717	593965	5920752	55		
	164_R1	7640735	3056027	4584708	44		
	164_R2	7640735	3056027	4584708	44		
	165_R1	6109888	794540	5315348	45		
	165_R2	6109888	794540	5315348	46		
	166_R1	5612226	3408198	2204028	43		
	166_R2	5612226	3408198	2204028	43		
	167_R1	6055589	2122748	3932841	46		
	167_R2	6055589	2122748	3932841	47	25861926	
	<i>Porites sverdrupi</i>	150_R1	7016712	3127910	3888802	45	
		150_R2	7016712	3127910	3888802	46	
151_R1		6759743	4600868	2158875	47		
151_R2		6759743	4600868	2158875	49		
153_R1		149097	11581	137516	45		
153_R2		149097	11581	137516	45		
134_R1		5459095	3737562	1721533	46		
134_R2		5459095	3737562	1721533	48		
140_R1		6047503	3473407	2574096	46		
140_R2		6047503	3473407	2574096	48		
141_R1	5968465	3838819	2129646	47			
141_R2	5968465	3838819	2129646	48	37557132		



Anexo B. Anotación funcional en categorías de ontología génica (GO) de los genes sobre-expresados de *Cladocopium sp.* proveniente del hospedero *P. panamensis*. Los resultados se muestran como distribución porcentual (%) de los GO.



Anexo C. Anotación funcional en categorías de ontología génica (GO) de los genes sobre-expresados de *Cladocopium sp.* proveniente del hospedero *P. sverdrupi*. Los resultados se muestran como distribución porcentual (%) de los GO.