



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DELINEACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE *Pocillopora*
(Lamarck, 1816) UTILIZANDO MARCADORES
MITOCONDRIALES Y NUCLEARES RECUPERADOS DE
LIBRERÍAS TRANSCRIPTÓMICAS.

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

Francisco José Gutiérrez Gutiérrez

La Paz, Baja California Sur, junio de 2022.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 20 del Mes de Mayo del 2022, 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:

"Delineación molecular de especies de *Pocillopora* (Lamarck, 1816) utilizando marcadores mitocondriales y nucleares recuperados de librerías transcriptómicas"

Presentada por el alumno:

Francisco José Gutiérrez Gutiérrez

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 Páez
Co-Director de Tesis



Dr. David Arturo Paz García
Co-Director de Tesis



Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Co-Tutor de Tesis



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

La Paz, Baja California Sur, a 1 de junio de 2022

Los miembros del comité de tesis del estudiante Francisco José Gutiérrez Gutiérrez del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo. Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
Ithenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:
Máximo 20% para tesis Posgrado
Se muestra captura de pantalla



	Citas excluidas	10%
	Bibliografía excluida	SIMILAR
Resumen de Coincidencias		
1	Internet 69 palabras Copiado el 25-Oct-2020 onlinelibrary.wiley.com	1%
2	Internet 59 palabras Copiado el 04-May-2022 cibnor.repositorioinstitucional.mx	<1%
3	Internet 54 palabras Copiado el 19-Nov-2021 www.frontiersin.org	<1%
4	Internet 51 palabras Copiado el 17-Jul-2021 docplayer.es	<1%
5	Internet 45 palabras hdl.handle.net	<1%
6	Internet 41 palabras Copiado el 08-Mar-2022 oup.silverchair-cdn.com	<1%
7	Internet 40 palabras Copiado el 09-Abr-2022 www.biorxiv.org	<1%

Firmas del comité





Dr . Eduardo Francisco Balart Páez Dr. David Arturo Paz García Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Co-Director de Tesis Co-Director de Tesis Co-Tutor de Tesis

Conformación de Comités

Comité Tutorial

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

Dr. David Arturo Paz García
Programa Cátedras CONACyT-CIBNOR
Co-Director de Tesis

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

Comité Revisor de Tesis

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Dr. David Arturo Paz García
Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Jurado de Examen

Dr. Eduardo Francisco Balart Páez
Dr. David Arturo Paz García
Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

Suplente

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez

Resumen

La incorporación de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento (HTS) al estudio de la biodiversidad de sistemas arrecifales ha propiciado el uso del concepto filogenético de especie como un paradigma predominante en la descripción de nuevos grupos taxonómicos. Particularmente en géneros como *Pocillopora*, cuyas características morfológicas no son consistentes con la historia evolutiva propuesta por distintos marcadores moleculares, resulta indispensable un análisis genético comparativo de marcadores tradicionales con los desarrollados a partir de análisis filogenómico. El objetivo del presente trabajo fue comparar el número de especies resultantes de análisis filogenético, análisis de delimitación de especies de un solo locus y análisis de redes haplotípicas de los marcadores mt AT6-ORF y HSP70, con las especies resultantes de análisis filogenéticos, de componentes principales y ancestría individual de SNPs derivados de exones exclusivos de corales escleractíneos. Se encontró una discordancia mito-nuclear, en la cual el número de especies resultantes para las 46 librerías RNA-Seq mediante el análisis a priori del marcador mitocondrial AT6-ORF fueron seis, y mediante SNPs bialélicos derivados de exones cuatro especies. Los resultados concuerdan con aproximaciones recientes en las cuales tanto el uso de loci individuales, o cientos de loci nucleares compartidos entre individuos, rechazan las hipótesis de monofilia recíproca entre linajes evolutivos propuestas mediante análisis del mitogenoma. Futuros estudios que indaguen en el proceso de especiación mediante herramientas genómicas podrán corroborar si esta discordancia corresponde o no a eventos de contacto secundario entre especies con barreras reproductivas incipientes.

Palabras clave: RNA-Seq, filogenética, Scleractinia, bioinformática

<https://orcid.org/0000-0002-1022-4273>

Vo. Bo Co-Directores de Tesis



Dr. Eduardo Francisco Balart Páez



Dr. David Arturo Paz García

Summary

The use of high-throughput sequencing (HTS) technologies to the study of the biodiversity of reef systems has led to the use of the phylogenetic species concept as a predominant paradigm in the description of new taxonomic groups. Particularly in coral genera such as *Pocillopora*, whose morphological characteristics are not consistent with the evolutionary history proposed by different molecular markers, a comparative genetic analysis of traditional markers with those developed from phylogenomic analysis is essential. The aim of the study was to compare the number of species resulting from phylogenetic analysis, single-locus species delimitation analysis (mt AT6-ORF, HSP70) and haplotypic network analysis, with the species resulting from phylogenetic, principal component analysis and individual ancestry of SNPs derived from exons exclusive to scleractinian corals. A mito-nuclear discordance was found, in which the number of species proposed for the 46 RNA-Seq libraries analyzed by the analysis of the mitochondrial region AT6-ORF, is greater (6) than the number obtained by biallelic SNPs (4). The results agree with recent approaches in which either the use of individual loci, or hundreds of nuclear loci shared between individuals, reject the reciprocal monophyly hypothesis between evolutionary lineages proposed by mitogenome analysis. Future studies that investigate the speciation process using genomic tools will be able to corroborate whether or not this discrepancy corresponds to secondary contact events between species with incipient reproductive barriers.

Keywords: RNA-Seq, phylogenetics, bioinformatics, Scleractinia

<https://orcid.org/0000-0002-1022-4273>

Vo. Bo Co-Directores de Tesis



Dr. Eduardo Francisco Balart Páez



Dr. David Arturo Paz García

Dedicatoria

A mi amada familia y
a quienes en mi la curiosidad cultivaron

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (No.999667).

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR) y al Programa de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, a la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, a la Lic. Osvelia Ibarra Morales, a Tania Verónica Núñez Valdez, al Ing. Horacio Sandoval Gómez y a la Lic. Claudia Elizabeth Olachea León por el apoyo brindado durante mi formación académica.

A mi Comité Tutorial, Dr. Eduardo Francisco Balart Páez, Dr. David Arturo Paz García y Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez, por su apoyo, paciencia y consejos en circunstancias tan adversas como las que acontecieron durante el desarrollo de esta investigación.

A mis queridos amigos Erick Treviño y Sofía Méndez, que supieron ser excelentes guías en mi breve incursión bioinformática.

A la Dra. Noemí Bocanegra Castillo, del Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes, por facilidades y soporte técnico.

A la Liga Internacional de la Justicia de los Súper Conocidos: Dani, Iván, Andrea y Yahn, por los grandes momentos compartidos durante estos años. Solo espero que sigamos acumulando gratas experiencias en el futuro, donde sea que cada uno nos encontremos.

A mis Padres María Sol, Daniel, y a mi Hermana Sol, que sin su amor y apoyo incondicional esta tesis no hubiese sido culminada.

A mi gran familia repartida entre México, Ecuador y Estados Unidos, por siempre creer en mí y estar pendiente de mí desde que nací.

A Marianela, por acompañarme y quererme en esta caótica etapa a pesar de todo.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vi
Lista de tablas	viii
Glosario de términos	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Las especies en la sistemática de corales escleractinios.....	3
2.2 Delimitación molecular de especies de corales escleractinios	3
2.3 Filotranscriptómica y métodos de captura híbrida acoplada a enriquecimiento en corales escleractinios	5
2.4 Sistemática y filogenómica en los corales <i>Pocillopora</i>	6
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. HIPÓTESIS	10
5. OBJETIVOS	11
5.1 Objetivo general	11
5.2 Objetivos particulares.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS	12
6.1 Selección y limpieza de librerías de RNA-Seq.....	12
6.2 Establecimiento de hipótesis <i>mediante análisis de secuencias AT6-ORF</i>	15
6.3 Obtención y análisis de marcador nuclear HSP70.....	17
6.4 Identificación de SNPs en exones exclusivos de corales escleractíneos.....	19
6.5 Análisis de componentes principales y ancestría individual a partir de SNPs	21
6.6 Análisis filogenómico de SNPs.....	22
7. RESULTADOS	23
7.1 Análisis de secuencias AT6-ORF	23
7.2 Análisis de marcador nuclear HSP70.....	27
7.3 Análisis de componentes principales y ancestría individual a partir de SNPs	31
7.4 Análisis filogenómico de SNPs.....	34
8. DISCUSIÓN	36
8.1 Los procesos de especiación y la sistemática molecular de corales escleractinios	36
8.2 Discordancia mito-nuclear en <i>Pocillopora</i>	37
8.3 Filogeografía comparativa e identificación de especies en estudios transcriptómicos de <i>Pocillopora</i>	39
9. CONCLUSIONES	43
10. LITERATURA CITADA	44
11. ANEXOS	56
Anexo A.- Scripts correspondientes al mapeo y ensamble de secuencias de la región ATP6-ORF	56
Anexo B.- Scripts correspondientes la identificación de SNPs en regiones exónicas.	56

Lista de figuras

- Figura 1.** Filogenia de *Pocillopora* basada en librerías de tipo ezRAD con clasificación mediante mtORF. Valores indican Máxima verosimilitud/Probabilidad posterior bayesiana de cada nodo. Modificado de Johnston *et al.* 2017..... 7
- Figura 2.** Mapa con la ubicación de los bioproyectos de los cuales se utilizaron las librerías para el presente estudio. Yidda, Arabia Saudita. Golfo de Omán, Omán. Singapur, Singapur. Hainan, China. Taiwan, Taiwan. Islas Spratly, Vietnam. Okinawa, Japón. Baie des Citrons, Nueva Caledonia. Hawaii, EUA. Moorea, Polinesia Francesa. Manzanillo, México..... 15
- Figura 3.** Diagrama de cuerdas que ilustra los múltiples alineamientos que corresponden con la búsqueda de 104 302 kpb de exones capturados, secuenciados y concatenados por Quek *et al.* 2020..... 21
- Figura 4.** Filogenia molecular de haplotipos únicos de la región mitocondrial ATP6-ORF por método de inferencia bayesiana y particiones resultantes de métodos de delimitación ASAP, sGMYC, mGMYC. Colores representan las especies descritas asociadas a determinados haplotipos de acuerdo a la literatura. Números representan la pertenencia de los individuos de acuerdo al consenso entre la filogenia bayesiana y las distintas particiones. Nodos negros establecen una probabilidad posterior mayor a 0.9 y nodos grises menor a 0.75. 24
- Figura 5.** Red haplotípica resultante del análisis de 199 secuencias de la región mitocondrial ATP6-ORF disponibles en NCBI, obtenidas mediante secuenciación Sanger y recuperadas a partir de librerías del repositorio SRA. P. sp 7 y P. sp 8 hacen referencia a individuos que compartan haplotipos antes descritos por Pinzón *et al.*, 2013 como Tipo 7 y Tipo 8. 25
- Figura 6.** Red haplotípica resultante del análisis de secuencias de la región mitocondrial ATP6-ORF recuperadas a partir de librerías del repositorio SRA (N= ?). Nomenclatura de especies de acorde a lo obtenido en el análisis filogenético bayesiano y análisis de delimitación. 27
- Figura 7.** Filogenia molecular de haplotipos únicos del gen HSP70 por método de inferencia bayesiana y particiones resultantes de métodos de delimitación ASAP, sGMYC, mGMYC. Colores representan las especies descritas asociadas a determinados haplotipos mitocondriales de acuerdo a la literatura y al análisis del presente estudio. Nodos negros establecen una probabilidad posterior mayor a 0.9 y nodos grises menor a 0.75. 28
- Figura 8.** Red haplotípica resultante del análisis de 127 secuencias del gen HSP70 disponibles en NCBI, obtenidas mediante secuenciación Sanger y recuperadas a partir de librerías del repositorio SRA. Colores de los campos de recombinación hacen referencia los haplotipos mitocondriales de cada individuo. 30
- Figura 9.** Red haplotípica resultante del análisis del gen del gen HSP70 recuperado a partir de 46 librerías del repositorio SRA. Colores de los campos de recombinación hacen referencia los haplotipos mitocondriales de cada individuo. 31
- Figura 10.** Análisis de componentes principales realizado con 1647 SNPs bi-alélicos. Coordenadas de los componentes de cada individuo son representadas por símbolos X. Centroides y colores de los centroides indican la procedencia de las muestras..... 32
- Figura 11.** Análisis de componentes principales realizado con 1647 SNPs bi-alélicos. Coordenadas de componentes de cada individuo son representadas por símbolos X. Colores indican el haplotipo mitocondrial definido como especie en los análisis previos..... 32
- Figura 12.** Gráfica de ADMIXTURE, demostrando los porcentajes de asignación a cada uno de los clusters de ancestría (K=4, Error de Crosvalidación = 0.3743). a) Muestra una separación

individual conforme a las especies delimitadas mediante haplotipos mitocondriales. b) Denota la localidad de los individuos. 34

Figura 13. Análisis filogenómico calculado mediante 640 SNPs bi-alélicos sin datos faltantes. El modelo de sustitución fue GTR+F+ASC+G4 y las réplicas de bootstrap 100 000. Ramas sin bootstrap asignado son menores al 75%. Formas en ramas terminales denotan la localidad de donde se obtuvo la muestra. 35

Lista de tablas

Tabla 1. Descripción de procedencia de las muestras de RNA-Seq empleadas para el presente estudio.....	13
Tabla 2. Identificadores de secuencias de región ATP6-ORF empleados en el presente estudio provenientes del repositorio NCBI.....	16
Tabla 3. Identificadores de secuencias de HSP70 empleados en el presente estudio para determinación de haplotipos únicos.....	18
Tabla 4. Descriptores y estadísticos de los métodos de delimitación empleados en secuencias de la región mitocondrial AT6-ORF.	25
Tabla 5. Distribución geográfica de individuos cuya región mitocondrial ATP6-ORF fue recuperada de lecturas producidas mediante RNA-Seq.	26
Tabla 6. Descriptores y estadísticos de los métodos de delimitación empleados en secuencias de un solo alelo (ASAP, GMYC) y ambos alelos (Haploredes-Haplowebmaker) del gen HSP70.	29

Glosario de términos

Aislamiento reproductivo: la reducción en el flujo potencial de genes entre poblaciones causada por barreras de aislamiento.

Alelo: variante alternativa de un locus/gen.

Clado: es un grupo de especies que incluye un ancestro común y todos sus descendientes. Todos sus miembros están más relacionados entre ellos que con cualquier otra especie.

Concepto filogenético de especie: grupo de individuos cuyos miembros descienden de un ancestro común y que todos poseen una combinación de ciertos rasgos definitorios o derivados.

Especie hermana: en sistemática hace referencia a los miembros de un complejo de especies con un tiempo de divergencia tan corto que no permite la acumulación de diferencias morfológicas sustanciales entre ellos.

Evolución divergente: La acumulación de diferencias genéticas entre poblaciones debido a cualquier proceso evolutivo, preferentemente por selección natural, que culmina en la formación de linajes evolutivos distintos.

Fenotipo: el organismo vivo en cuestión, o algún aspecto físico del mismo.

Filogenia: historia evolutiva de un grupo de especies o cualquier grupo de taxa.

Flujo genético: El movimiento de material genético entre poblaciones.

Haplotipo: conjunto de variaciones de ADN o poliformismos que tienden a ser heredados de manera uniparental en una población.

Introgresión: Flujo genético entre especies o linajes que mueve alelos ajenos a un background genético nativo.

Linaje genético: asumiendo un proceso de evolución no reticular se considera un linaje como a una población que mantiene continuidad genética e identidad a través de muchas generaciones debido al poco o nulo intercambio reproductivo con otras poblacionales.

Locus: Muchas veces utilizado como sinónimo de gen, es una posición de una secuencia de ADN. El termino loci se utiliza para denotar pluralidad o varios genes.

Sistemática molecular: el uso de moléculas, principalmente el ADN para caracterizar la diversidad de las especies y su evolución.

SNP: Los polimorfismos de un solo nucleótido se presentan cuando un solo nucleótido (elemento fundamental del ADN) es reemplazado por otro. También se llama polimorfismo de

nucleótido simple y polimorfismo de nucleótido único.

Metapoblación: población formada por subpoblaciones conectadas.

Monofilia recíproca: significa que todas las secuencias de una especie forman un grupo monofilético en el árbol genético relativo a las secuencias de cualquier otra especie.

Morfoespecie: Una especie definida con la premisa de que todos sus individuos comparten una misma morfología a diferencia de otras especies.

Ortólogo: Un gen es ortólogo si su origen se da como resultado de un proceso de especiación y forma clados de alto soporte al utilizarlo como herramienta de análisis filogenético.

Plasticidad fenotípica: habilidad de genotipos individuales para producir distintos fenotipos cuando son expuestos a distintas condiciones ambientales.

Provincia biogeográfica: área extensa con biota distintiva, con algún nivel de relación en tiempo evolutivo, algún nivel de endemismo y cuyo origen de la biota esté circunscrito a factores abióticos (geomorfológicos, hidrográficos o geoquímicos) diferentes de otras áreas geográficas.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies son la unidad fundamental con la cual ha sido posible cuantificar y clasificar patrones de diferenciación fenotípica observados en la biosfera a un nivel metapoblacional (Avice, 2006; Barraclough, 2019; Freeman, 2013; Stankowski & Ravinet, 2021). No obstante, el establecer los límites entre una especie y otra depende en gran medida de los criterios y herramientas que se empleen para diferenciar individuos de diferentes poblaciones de una misma especie, de otros que constituyan poblaciones de otra especie (Carstens *et al.*, 2013; Rannala, 2015).

Durante las últimas décadas, con el incremento constante en la capacidad para obtener y analizar secuencias genéticas, ha sido posible redefinir conceptualmente las especies, la historia evolutiva de múltiples taxa, y los criterios empleados para distinguir entre una especie y otra (Dodsworth, 2015; Hajibabaei *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2016). Un grupo en el cual la clasificación taxonómica ha sido notablemente reestructurada desde la sistemática molecular, es la de los corales formadores de arrecifes del género *Pocillopora* (Burgess *et al.*, 2021; Chiazzari *et al.*, 2019; Schmidt-Roach *et al.*, 2013; Torres & Ravago-Gotanco, 2018). Al incorporarse paulatinamente los análisis genéticos a los estudios de clasificación de este grupo, se observó recientemente que no existe una correspondencia entre las especies definidas mediante el análisis filogenético de ADN mitocondrial, con las descritas tradicionalmente mediante características externas del exoesqueleto del coral (Flot *et al.*, 2008; Schmit-Roach *et al.*, 2013; Gélin *et al.*, 2017).

Debido a que las especies definidas desde la sistemática molecular del marcador mitocondrial ORF coinciden con criterios ecológicos, reproductivos y geográficos de clasificación complementarios, la descripción de la diversidad de este género mediante el análisis filogenético es la que ha predominado recientemente (Pinzón *et al.*, 2013; Johnston *et al.*, 2021). Sin embargo, cualquier especie o las relaciones entre especies deben de ser consideradas como hipótesis; inherentemente definidas por la cantidad y tipo de información con la cual fueron formuladas, con la posibilidad de ser aceptadas, revisadas o rechazadas ante nuevos análisis (Pante *et al.*, 2015).

Dada su amplia distribución geográfica en las comunidades arrecifales de los océanos Índico y Pacífico, *Pocillopora* cuenta en la actualidad con un amplio acervo de datos de secuenciación de alto rendimiento disponibles para reanálisis (Vidal-Dupiol, et al., 2018; Buitrago-López y Voolstra, 2020; Connelly et al., 2020; Cunning et al., 2018; Zhou et al., 2017). Por consiguiente, el uso de datos transcriptómicos para la obtención de distintos tipos de marcadores nucleares considerados filogenéticamente informativos, resulta idóneo para validar o rechazar las hipótesis establecidas para la clasificación de *Pocillopora* (Andermann et al., 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1 Las especies en la sistemática de corales escleractinios

La manera en la cual se ha concebido y modelado tanto la diversidad como la historia evolutiva de los corales del orden Scleractinia, está fuertemente ligada a la taxonomía y a los criterios históricos de clasificación de este grupo de cnidarios (Veron, 2013). Incluso antes de ser considerados animales, las más de 1500 especies, 240 géneros y 31 familias de la actualidad fueron propuestas con base en la morfología comparativa, es decir, en la descripción y análisis de características del exoesqueleto de coral a nivel macroscópico y microscópico (Kitahara et al., 2016). Además, cabe destacar que gran parte del conocimiento acerca de la diversidad de corales estuvo fundamentado en descripciones y análisis de la variación morfológica previos a la invención del buceo autónomo (Vaughan & Wells, 1943). Una vez que fue posible examinar organismos vivos y documentar extensivamente la plasticidad fenotípica, se llegó a la conclusión de que gran parte de los especímenes seleccionados para taxonomía no necesariamente fueron representativos de una localidad o región geográfica (Budd et al., 2010; Kitahara et al., 2016; Todd, 2008).

Las características morfológicas del exo-esqueleto coralino pueden estar asociadas con la aptitud poblacional a distintos tipos de gradientes ambientales; la cual es esencial en la generación de nuevas especies mediante un proceso de evolución divergente (Enríquez et al., 2017; Struck et al., 2018). Sin embargo, la incorporación de secuencias nucleotídicas para reconstrucción filogenética y su congruencia con otros criterios de clasificación, indican que los genes son los que muestran de una manera más robusta si ha ocurrido o no una divergencia evolutiva a nivel especie entre distintas poblaciones de corales (Bongaerts et al., 2021; Prada & Hellberg, 2021; Wepfer, 2020).

2.2 Delimitación molecular de especies de corales escleractinios

La delimitación de especies, en el sentido más amplio es el proceso con el cual es posible determinar a partir de una muestra de individuos, cuáles de ellos constituyen diferentes

poblaciones de una misma especie y cuales constituyen una especie distinta (Carstens *et al.*, 2013; Rannala, 2015). Dicho proceso se encuentra circunscrito a los llamados criterios operacionales, es decir, cada método estará limitado a una definición conceptual de lo que son las especies; las premisas biológicas que conlleve tal definición (flujo genético, aislamiento reproductivo, monofilia recíproca), y al tipo particular de datos con los cuales se podrá modelar la pertenencia de un individuo a un grupo determinado (Sites y Marshal, 2004; Goldstein y Desalle, 2011; De Queiroz, 2007).

La aproximación molecular o el uso de secuencias de nucleótidos para la delimitación de especies en corales escleractinios, se ha fundamentado principalmente en métodos cuyo objetivo principal fuera identificar linajes evolutivamente independientes (monofilia recíproca) entre individuos que fueron clasificados tradicionalmente mediante las características morfológicas de su exoesqueleto (Sites y Marshal, 2004; Kitahara *et al.*, 2016). Los métodos de delimitación de un solo locus han sido los más frecuentemente empleados para el estudio de la diversidad genética de géneros como *Goniopora*, *Porites*, *Echinophyllia*, *Oxypora* y *Turbinaria* (Arrigoni *et al.*, 2016; Shimpi *et al.*, 2019). Los métodos de un solo locus pueden ser basados en el cálculo de distancias genéticas interespecíficas (ABGD), exclusividad alélica mútua (haploredes), en árboles modelados a partir de procesos de coalescencia de Yule (GMYC) o árboles de procesos de Poisson (PTP) (Rannala, 2015; Dellicour y Flot, 2018). Dado que cada método tiene distintas premisas para asignar los individuos a un linaje, se han utilizado de manera complementaria en los mismos sets de datos para constatar la división entre una especie y otra (Rannala, 2015; Luo *et al.*, 2018).

Distintas plataformas de secuenciación de alto rendimiento (tecnologías que permiten obtener de docenas a cientos de millones de lecturas por individuo) permiten probar hipótesis de delimitación de especies examinando una mayor cantidad de elementos presentes en el genoma de los individuos (Young & Gillung, 2020). Algunas fragmentan el genoma y capturan regiones al azar que representen el 1% del total (RAD-Seq) mientras que otras permiten capturar exclusivamente regiones codificantes (RNA-Seq, Exon capture) o regiones filogenéticamente informativas (UCEs) (Faircloth *et al.*, 2012; McCormack *et al.*, 2013). Estudios

recientes en corales escleractinios (géneros *Acropora*, *Leptastrea* y *Porites*) en los que se han incorporado datos genómicos procedente de protocolos ezRAD o elementos ultraconservados (UCEs), han combinado los análisis de ordenación y agrupamiento (clustering) con los análisis filogenómicos bayesianos y de máxima verosimilitud para determinar la validez de los linajes (Arrigoni *et al.*, 2020; Cowman *et al.*, 2020; Terraneo *et al.* 2021).

2.3 Filotranscriptómica y métodos de captura híbrida acoplada a enriquecimiento en corales escleractinios

La filotranscriptómica surge del análisis de las lecturas producidas mediante RNA-Seq, la cual consiste en la transcripción reversa de RNA a cDNA para la elaboración de librerías genómicas para su posterior secuenciación en forma de un catálogo de millones de lecturas de 100 a 150 pares de bases (Griffith *et al.*, 2015). El protocolo RNA-Seq puede ir enfocado a la reconstrucción de transcriptomas (el set completo de transcritos expresados en un tejido en un momento dado) o hacia la cuantificación de niveles de expresión de genes (Wang *et al.*, 2009). Si lo que se busca es realizar un análisis filogenético con los datos obtenidos mediante RNA-Seq; una vez recuperado el transcriptoma de los taxa de interés es posible identificar genes ortólogos para una comparación funcional entre especies o para inferencia filogenética (Heras & Aguilar, 2019; Li *et al.*, 2019; Todd *et al.*, 2016). A la fecha se ha utilizado la filotranscriptómica en corales principalmente para establecer relaciones evolutivas de tiempo profundo: entre géneros, familias, órdenes o phyla (Bhattacharya *et al.*, 2016; Quek & Huang, 2021; Zhang *et al.*, 2019). Además, el enfoque ha sido principalmente comparativo, con los esfuerzos de investigación enfocados a expandir y mejorar los recursos transcriptómicos disponibles para distintos géneros y especies (Kenkel & Bay, 2017; Kitchen *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

Una desventaja del flujo de trabajo filotranscriptómico antes mencionado, es que tanto el ensamble de lecturas como la identificación de genes ortólogos conllevan el uso de programas computacionalmente demandantes (Kapli *et al.*, 2020; Young y Gillung, 2020). Una alternativa para una reducción de complejidad en el análisis, podría ser la identificación de secuencias de exones específicas lo suficientemente conservadas entre todos los individuos del estudio en

cuestión para resolver cuestiones como la delimitación de especies (Andermann *et al.* 2020). Recientemente se han empleado métodos de captura objetiva de UCEs y exones ortólogos con resultados consistentes para la delimitación de especies de corales como las del género *Acropora* (Ramírez-Portilla *et al.* 2022). Esta aproximación consiste en diseñar cebadores complementarios a loci objetivo, que posteriormente se unan al ADN de la muestra, sean capturados, amplificados mediante PCR y secuenciados (Andermann *et al.*, 2020; Quek y Huang, 2021).

Otra alternativa es utilizar sets de secuencias de exones disponibles para el grupo biológico con el cual se trabaja y extraer sitios variables (polimorfismos de un solo nucleótido) a partir de lecturas genómicas o transcriptómicas que se sobrelapen con la referencia (Andermann *et al.*, 2020). En la actualidad se encuentran disponibles sets de loci exónicos para varios géneros de corales, no obstante, una aproximación que considere en extraer SNPs derivados de lecturas transcriptómicas para resolver hipótesis a nivel especie todavía no se ha llevado a cabo en corales escleractinios (Quek *et al.*, 2020; Quek y Huang, 2021).

2.4 Sistemática y filogenómica en los corales *Pocillopora*

El género *Pocillopora* (Lamarck, 1816), o lo que coloquialmente se conoce como corales coliflor, se caracterizan por presentar una morfología colonial ramificada con pólipos de un diámetro de unos cuantos milímetros (Veron, 1976). Se encuentran ampliamente distribuidos en los arrecifes coralinos de los trópicos, desde el Mar Rojo a las costas del Pacífico Oriental (Pinzón *et al.*, 2013; Torres & Ravago-Gotanco, 2018).

Aproximadamente 40 especies del género *Pocillopora* han sido propuestas desde su descripción y 17 especies son reconocidas en la actualidad conforme a las diferencias observadas en características del esqueleto colonial como lo son el tipo de crecimiento, dimensiones de las ramificaciones y la presencia de verrugas (Veron, 2000). Al igual que otros géneros de coral, al implementarse el análisis filogenético primero con marcadores moleculares (ORF, HSP70, ITS2), y con marcadores tipo SNP, se observó que grupos filogenéticamente distintos (Ej. *P. acuta*, *P.*

damicornis y *P. verrucosa*) pueden ser morfológicamente indistinguibles (Chiazzari et al., 2019; Gélin et al., 2017; Johnston et al., 2017; Poquita-Du et al., 2017, Figura 1). Aunado a eso, en algunas zonas del Pacífico Oriental Tropical se ha reportado que un mismo grupo de especies (*P. eydouxi* y *P. meandrina*) puede modificar su morfología a tal grado, que dependiendo de la intensidad de ciclones tropicales por temporada, ciertas colonias manifestaron las características correspondientes a lo que hasta la fecha se considera como una especie válida (*P. inflata*), para luego regresar a su forma inicial (Paz-García et al., 2015a; Paz-García et al., 2015b). Lo reportado en el Golfo de California, junto a evidencias de heterofilia (colonias en las cuales ciertas ramificaciones tienen características morfológicas reportadas para otras especies) en el océano Índico significó que era necesario recurrir a criterios adicionales para validar la separación de grupos mediante análisis filogenético (Gélin et al., 2017).

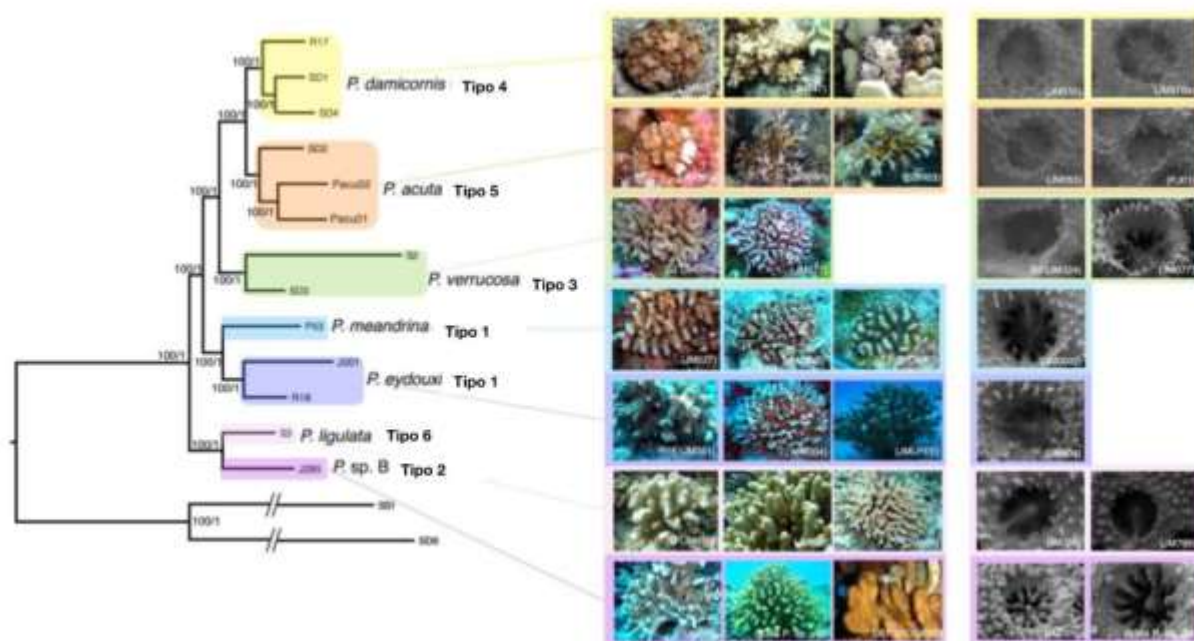


Figura 1. Filogenia de *Pocillopora* basada en librerías de tipo ezRAD con clasificación mediante mtORF. Valores indican Máxima verosimilitud/Probabilidad posterior bayesiana de cada nodo. Modificado de Johnston *et al.* 2017.

Las diferencias en distribución geográfica, diversidad de la microbiota asociada o susceptibilidad ante eventos de estrés térmico parecen coincidir con los grupos definidos mediante análisis filogenético y de delimitación de especies de un solo locus de haplotipos del gen mitocondrial ORF (Brenner-Raffalli et al., 2018; Burgess et al., 2021; Gélin *et al.*, 2017; Morikawa & Palumbi,

2019). Sin embargo, algunos de estos grupos filogenéticamente próximos no suelen ser discriminados entre sí con el uso exclusivo de marcadores mitocondriales (ORF: *P.eydouxi* y *P. meandrina*) o nucleares (HSP70 y RAD loci: *P. damicornis* y *P. acuta*) (Schmidt-Roach *et al.*, 2014; Johnston *et al.*, 2017). Es por ello, que se ha propuesto utilizar ambos tipos de marcadores tanto mitocondriales como nucleares y un muestreo geográfico amplio si lo que se busca es revisar las hipótesis de diversificación para este grupo de corales (Johnston *et al.*, 2017).

Haciendo uso del amplio acervo de recursos transcriptómicos disponible para este género, será posible corroborar con un set de individuos recolectado en distintas regiones geográficas, si el número y relaciones entre especies estimados mediante marcadores nucleares y mitocondriales, concuerdan con los establecidos en la literatura (Brenner-Raffalli, Vidal-Dupiol, *et al.*, 2018; Buitrago-Lo & Voolstra, 2020; Connelly *et al.*, 2020; Cunning *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2017). Una vez realizada esta comparación, se examinará si en los estudios de expresión diferencial en los cuales no se llevó a cabo un análisis filogenético y de delimitación previo de las muestras, se incluyeron especies distintas a las declaradas en el diseño experimental (Connelly *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

La clasificación de *Pocillopora* se fundamenta principalmente en la premisa que la variación de un solo locus mitocondrial, la región ORF, refleja los procesos de divergencia evolutiva estimados mediante el análisis de datos genómicos más reciente. Sin embargo, hasta la fecha no ha habido una revisión de los datos transcriptómicos disponibles para el género, que pueda comprobar o rechazar dicha hipótesis mediante el uso de marcadores SNPs derivados de un set de exones ortólogos entre especies. Las perspectivas que arroje el análisis de información transcriptómica complementaria a la clasificación molecular actual de este abundante género de corales, resultará benéfico para los esfuerzos de manejo, conservación e investigación biológica regionales en los cuales la taxonomía de *Pocillopora* sigue siendo guiada por los criterios morfológicos de clasificación.

4.HIPÓTESIS

H1: Dado que el uso exclusivo de marcadores mitocondriales o las características morfológicas del exoesqueleto pueden subestimar la diversidad del género *Pocillopora*, se espera que con la identificación y análisis de polimorfismos derivados de exones ortólogos se observe un mayor número de especies e identificación incorrecta de linajes de individuos empleados para las librerías publicadas en los repositorios digitales de datos transcriptómicos.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Delimitar las especies del género *Pocillopora* (Lamarck, 1816) utilizando marcadores mitocondriales y nucleares recuperados de librerías transcriptómicas.

5.2 Objetivos particulares

Comparar si la diversidad de especies descritas mediante haplotipos de ORF, se corresponde con los datos disponibles en la literatura sobre la distribución geográfica de dichos linajes.

Evaluar la diversidad crítica existente en estudios expresión diferencial empleados para el presente estudio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Selección y limpieza de librerías de RNA-Seq

El archivo SRA o Single Read Archive, es un repositorio mundial donde los archivos de lecturas en bruto, sin haber pasado un control de calidad son depositados junto con metadatos referentes a los parámetros de la secuenciación o el origen de las muestras (Leinonen *et al.*, 2010). Mediante una búsqueda de los archivos disponibles con la palabra clave “Pocillopora” se encontraron alrededor de 1092 productos de RNA-Seq y 869 librerías pareadas realizadas mediante las plataformas Illumina Genome Analyzer IIx y HiSeq: 1500, 2000, 2500, 4000, X.

De acuerdo a las bases de datos asociada a las muestras, 391 librerías fueron catalogadas como *P. damicornis* (n=92), *P. acuta* (n=259), *P. verrucosa* (n=11) y *P. meandrina* (n=29), respectivamente. Los proyectos en los que si se declaró la procedencia de las muestras, o tuvieran datos asociados al diseño experimental, fueron los que finalmente serían considerados para análisis posteriores.

Mediante el comando fastq-dump de la herramienta SRA Tools y con los parámetros --split files y -gzip se descargaron las librerías en formato fastq.gz separadas en dos archivos, uno forward y otro reverse. Posteriormente se utilizó el programa Fastqc para la evaluar la calidad de las lecturas (Andrews et al., 2012). Los parámetros a evaluar fueron el valor Phred, el contenido de cada base nucleotídica, la longitud de las lecturas y la cantidad de lecturas. Para comparar los diferentes parámetros que evalúan la calidad de las librerías se utilizó el programa MultiQC v1.9 (Ewels et al., 2016). Los adaptadores e índices fueron removidos de todas las librerías mediante el programa Trimmomatic 0.39 con los siguientes parámetros: ILLUMINACLIP:adapters.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 MINLEN:25 (Bolger et al., 2014). Lo anterior hace referencia a la remoción de lecturas de longitud menor a 25 pb y bases que sean N o de calidad menores a 3.

Después de la limpieza y una vez identificadas las librerías con una mayor cantidad de lecturas (8 millones de reads en adelante) se seleccionó aquellas que no fueran réplicas biológicas, y en

las cuales se haya podido recuperar la región mitocondrial AT6-ORF (955 pb) (Tabla 1, Fig. 2) (Flot y Tillier, 2007). Mediante el uso de una secuencia de referencia elaborada a partir de un consenso de los haplotipos de este marcador (n= 900), se recuperaron las secuencias correspondientes a 46 colonias de coral utilizando el mapeador Magic-Blast y el programa sam2consensus.py (Boratyn et al., 2019; Okonechnikov et al., 2012).

Tabla 1. Descripción de procedencia de las muestras de RNA-Seq empleadas para el presente estudio.

Bioproyecto	Localidad	Códigos SRA // Especie asignada según la literatura o metadatos disponible	Estudio publicado por revisión de pares o pre-print
PRJNA227785	Nanwan Bay, Taiwan	SRR1030693 // <i>P.damicornis</i>	Mayfield, A. B., Wang, Y. B., Chen, C. S., Lin, C. Y., & Chen, S. H. (2014). Compartment-specific transcriptomics in a reef-building coral exposed to elevated temperatures. <i>Molecular Ecology</i> , 23(23), 5816-5830.
PRJNA731596	Kāneʻohe Bay, Hawái	SRR14610906, SRR14610911, SRR14610915, SRR14610916, SRR14610919, SRR14610922, SRR14610932, SRR14610991, SRR14611004, SRR14611045, SRR14611047 // <i>P.acuta</i>	Stephens, T. G., Strand, E. L., Mohamed, A. R., Williams, A., Chiles, E. N., Su, X., ... & Putnam, H. M. (2021). Ploidy variation and its implications for reproduction and population dynamics in two sympatric Hawaiian coral species. <i>bioRxiv</i> .
PRJNA744403	Moorea , Polinesia Francesa	SRR15101691,SRR15101692 SRR15101693,SRR15101695 SRR15101696,SRR15101697 SRR15101699,SRR15101700 SRR15101718,SRR15101721 // <i>P. meandrina</i>	Becker, D. M., Putnam, H. M., Burkepille, D. E., Adam, T. C., Vega Thurber, R., & Silbiger, N. J. (2021). Chronic low-level nutrient enrichment benefits coral thermal performance in a fore reef habitat. <i>Coral Reefs</i> , 40(5), 1637-1655.
PRJNA752768	Sanya Bay, China	SRR15404811 // <i>P.damicornis</i>	N/D
PRJNA761443	Hawaii	SRR16077711 // <i>P. meandrina</i>	N/D
PRJNA595781	Okinawa, Japón	SRR12639767 // <i>P.acuta</i>	Chuang, P. S., Ishikawa, K., & Mitarai, S. (2021). Morphological and genetic recovery of coral polyps after bail-out. <i>Frontiers in Marine Science</i> , 8, 280.
PRJNA595781	Okinawa, Japón	SRR10696827, SRR10708187, SRR10708230, SRR13743401, SRR13743408, SRR13743414 //	Chuang, P. S., & Mitarai, S. (2021). Genetic changes involving the coral gastrovascular system support the transition between colonies and bailed-out polyps: evidence from a <i>Pocillopora acuta</i> transcriptome. <i>BMC</i>

		<i>P.acuta</i>	genomics, 22(1), 1-12.
			Chuang, P. S., & Mitarai, S. (2020). Signaling pathways in the coral polyp bail-out response. <i>Coral Reefs</i> , 39(6), 1535-1548.
PRJNA551401	Arabia Saudita: Arrecife Al Fahal, Mar Rojo //	SRR11880672 <i>P.verrucosa</i>	Buitrago-López, C., Mariappan, K. G., Cárdenas, A., Gegner, H. M., & Voolstra, C. R. (2020). The genome of the cauliflower coral <i>Pocillopora verrucosa</i> . <i>Genome biology and evolution</i> , 12(10), 1911-1917.
PRJNA544778	Islas Spratly, Mar de China 	SRR12786905, SRR12904788 <i>P. damicornis</i>	Zhu, Y., Liao, X., Han, T., Chen, J. Y., He, C., & Lu, Z. (2021). Transcriptomics analysis reveals intracellular mutual regulation of coral-zooxanthella holobionts. <i>bioRxiv</i> .
PRJNA399069	Oman: Background of Bay //	SRR5963037, SRR5963081 // <i>P. sp. Tipo 7</i>	Brener-Raffalli, K., Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Rey, O., Romans, P., Bonhomme, F., ... & Pillot, R. (2018). Gene expression plasticity and frontloading promote thermotolerance in Pocilloporid corals. <i>bioRxiv</i> , 398602.
PRJNA399069	Baie des Citrons, Nueva Caledonia	SRR5963052, SRR5963057, SRR5963058 // // <i>P. damicornis</i> y <i>P. acuta</i>	Brener-Raffalli, K., Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Rey, O., Romans, P., Bonhomme, F., ... & Pillot, R. (2018). Gene expression plasticity and frontloading promote thermotolerance in Pocilloporid corals. <i>bioRxiv</i> , 398602.
PRJNA433950	Hainan, China	SRR6761154 // <i>P. damicornis</i>	Tang, J., Ni, X., Zhou, Z., Wang, L., & Lin, S. (2018). Acute microplastic exposure raises stress response and suppresses detoxification and immune capacities in the scleractinian coral <i>Pocillopora damicornis</i> . <i>Environmental pollution</i> , 243, 66-74.
PRJNA435620	Hainan, China	SRR6784734 // <i>P. damicornis</i>	Zhou, Z., Zhao, S., Tang, J., Liu, Z., Wu, Y., Wang, Y., & Lin, S. (2019). Altered immune landscape and disrupted coral-Symbiodinium symbiosis in the scleractinian coral <i>Pocillopora damicornis</i> by <i>Vibrio coralliilyticus</i> challenge. <i>Frontiers in physiology</i> , 10, 366.
PRJNA435468	Singapur	SRR6935629, SRR6964364, SRR7059699 // <i>P. acuta</i>	Poquita-Du, R. C., Huang, D., Chou, L. M., & Todd, P. A. (2019). Short term exposure to heat and sediment triggers changes in coral gene expression and photo-physiological performance. <i>Frontiers in Marine Science</i> , 6, 121.
PRJNA552592	Arrecife Carrizales, Colima, México	SRR9648437 // <i>P. verrucosa</i>	N/D

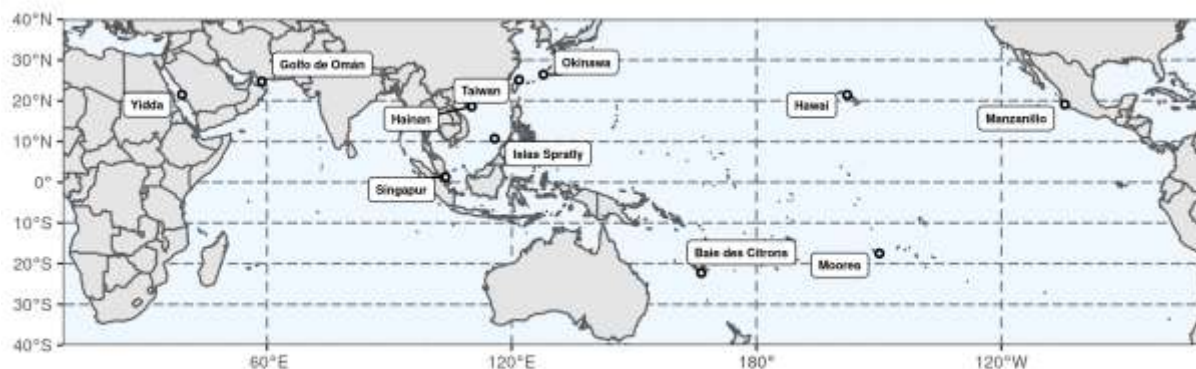


Figura 2. Mapa con la ubicación de los bioproyectos de los cuales se utilizaron las librerías para el presente estudio. Yidda, Arabia Saudita. Golfo de Omán, Omán. Singapur, Singapur. Hainan, China. Taiwan, Taiwan. Islas Spratly, Vietnam. Okinawa, Japón. Baie des Citrons, Nueva Caledonia. Hawaii, EUA. Moorea, Polinesia Francesa. Manzanillo, México.

Los parámetros empleados para el programa sam2consensus establecen que la reconstrucción de la secuencia consenso a partir de lecturas mapeadas, ignorando la referencia, deberán de tener una cobertura de al menos 1 secuencia (-m 1) para determinar cada nucleótido por sitio, considerando posteriormente que si no hay un nucleótido alineado en esa posición en el 25% del total de lecturas (-c 0.25), se aplique el código IUPAC de nomenclatura para ambigüedad de llamadas (Ortiz, 2019a).

6.2 Establecimiento de hipótesis mediante análisis de secuencias AT6-ORF

Una vez recuperadas las secuencias parciales del marcador AT6-ORF (560 pb), se procedió a elaborar análisis filogenéticos (máxima verosimilitud e inferencia bayesiana), análisis de delimitación de especies mediante un solo locus (ASAP y GMYC) y redes haplotípicas (Haplowebmaker) (Fujisawa y Barraclough, 2013; Puillandre *et al.*, 2021; Spöri y Flot, 2020). En primera instancia se utilizó el portal <https://eeg-ebe.github.io/HaplowebMaker/> para la construcción de una red haplotípica; en el cual se configuró la haplored de la siguiente manera: se utilizaron un total de 199 secuencias en formato fasta (NCBI=106,CIBNOR=45,SRA=46), las inserciones y deleciones fueron tratadas como datos faltantes, los caracteres ambiguos “enmascarados” y el algoritmo de red elegido fue *mininum spanning* (Spöri y Flot, 2020). La

obtención de las secuencias del Pacífico Oriental Tropical se hizo mediante la amplificación de fragmentos de 590 pb con los iniciadores (5'-3') FATP6.1 TTTGGGSATTCGTTTAGCAG y RORF SCCAATATGTTAAACASCATGTCA (Paz-García et al. 2015).

Para la reconstrucción filogenética y delimitación molecular se utilizaron exclusivamente haplotipos únicos calculados mediante los paquetes *pegas* y *Haplotypes* en R (Paradis, 2010). Los haplotipos se calcularon a partir de tres sets de datos: 1) las secuencias disponibles en GenBank cuya nomenclatura molecular (PSH, SSH o Tipo #) estuviese incluida en el nombre de la secuencia (n=30), 2) las obtenidas en estudios previos en el Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes de CIBNOR (n=3), y 3) las recuperadas mediante mapeo de librerías transcriptómicas (n=8) sumando un total de 44 individuos y 34 haplotipos únicos (Tabla 2).

Tabla 2. Identificadores de secuencias de región ATP6-ORF empleados en el presente estudio provenientes del repositorio NCBI

ID Secuencias	Estudio
HQ378758.1, HQ378759.1, HQ378760.2, HQ378761.1	Pinzón y Lajeunesse, 2011
JX888898.1, JX888899.1	Cunning <i>et al.</i> , 2013
JX994072.1 - JX994088.1	Pinzón <i>et al.</i> , 2013
KJ690905.1, KJ690906.1, KJ690907.1	Thomas <i>et al.</i> , 2014
KM610241.1, KM610242.1, KM610279.1, KM610280.1	Baums <i>et al.</i> , 2014
KX538981.1 - KX539013.1	Gélin <i>et al.</i> , 2017
LC222444.1-LC222451.1	Nakajima <i>et al.</i> , 2017

El alineamiento de las secuencias para análisis filogenético se llevó a cabo en Aliview (cita) mediante el algoritmo CLUSTAL W versión (cita) y se seleccionó al HKY + F + I como mejor modelo de sustitución nucleotídica según el criterio de información Bayesiano (BIC) en el programa ModelFinder (versión y cita); con restricción de búsqueda a modelos disponibles en Mr. Bayes *-mrset mrbayes:* (Kalyaanamoorthy et al., 2017; Thompson et al., 2003). La reconstrucción por inferencia bayesiana se hizo en el programa Mr.Bayes con los siguientes parámetros: *lset nst=2 rates=propinv ; prset statefreqpr=fixed(empirical)* (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) *.lset nst= 2* corresponde al modelo evolutivo HKY mientras que *rates=propinv* a una que una proporción de los sitios en la secuencia son invariantes (+ I); los

priors del modelo bayesiano como las frecuencias de los caracteres en el alineamiento (+ F) son establecidas con *prset statefreqpr=fixed(empirical)*. Finalmente, la selección del grupo externo es declarada en el comando OUTGROUP HQ378759_Pocillopora_sp_Type_2. Se seleccionó a esa secuencia como outgroup ya que el haplotipo correspondiente se encuentra filogenéticamente distante de los linajes más estudiados a la fecha de acuerdo a la nomenclatura (*P. damicornis*, *P. acuta*, *P. verrucosa* y *P. meandrina*) (Johnston *et al.*, 2017). Las cadenas de Markov fueron 4, el número de generaciones 10,000,000 con remuestreo de cada 1,000 y descartando las primeras 250,000 iteraciones: *Mcmc ngen= 10000000 relburnin=yes burninfrac=0.25 printfreq=1000 samplefreq=1000 nchains=4 savebrlens=yes* .

El análisis ASAP (*assemble species by automatic partitioning*) fue llevado a cabo en el portal web <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>, usando el método de sustitución K80 para cálculo de distancias pareadas entre secuencias y se eligieron las 2 de las particiones resultantes de menor puntaje asignado (Puillandre *et al.* 2021). Finalmente, el análisis GMYC (*Generalized mixed Yule-coalescent*) se ejecutó mediante uno (sGMYC) y múltiples (mGMYC) umbrales en los paquetes *ape* y *splits* de R (Fujisawa y Barraclough, 2013). El árbol ultramétrico necesario para este análisis fue calculado mediante el programa *BEAST* con un reloj molecular de distribución log-normal como prior y corrido en 4 cadenas Monte Carlo de 10 000 000 de generaciones con remuestreo cada 1000 (Bouckaert *et al.* 2014). Se evaluó la convergencia de parámetros y entre cadenas con el programa Tracer (Bouckaert *et al.* 2014). Los resultados de las 4 particiones resultantes de los análisis antes mencionados fueron comparadas visualmente con el árbol de inferencia bayesiana mediante el paquete *ggtree* del programa R (Yu *et al.*, 2017).

6.3 Obtención y análisis de marcador nuclear HSP70

La recuperación de secuencias del gen HSP70 en las librerías SRA se realizó mediante un mapeo de una secuencia consenso (2280 pb) en el programa MagicBlast, y los comandos *mpileup* y *consensus* del programa *samtools* (Danecek *et al.*, 2021). Estos programas utilizan la profundidad de la cobertura de secuenciación para identificar posiciones variables dentro de un locus objetivo también conocido como polimorfismos de nucleótido único (SNP) y luego

clasificar estos SNPs en dos alelos secuencias o "haplotipos" que representan mutaciones en ese locus (Andermann *et al.*, 2019).

La selección final de secuencias para análisis filogenético, así como delimitación molecular, consistió en emplear los haplotipos únicos de los mismos individuos en los cuales se analizó la region AT6-ORF, y que contaran con ambas regiones del gen (HSP70A y HSP70B) completas (n=77 individuos, 1255 pb) (Tabla 3). La obtención de las secuencias de muestras provenientes del Pacífico Oriental se realizó mediante la amplificación de fragmentos de 741 pb para HSP70A y 559 pb para HSP70B con los iniciadores (5'-3'): HSP70A-F CCTGGTTCAATCCGACAGA, HSP70A-R TGTTCACTGTTTTCTTCG, HSP70B-F CTATCCAGGCAGCGGTCTT y HSP70B-R TGGTGAACACACTTGCTGTAGA (cita de los primers).

Tabla 3. Identificadores de secuencias de HSP70 empleados en el presente estudio para determinación de haplotipos únicos.

ID Secuencias	Estudio
LG11, LG7, LG9, LHI64, LHI65, LHI84, MYR45, NIGT15, OPI37, OPI39, OPI41, RIB31, RIB32, SOL110, SOL24, TYD20, WAL25, WAL35, WAL47, WILK26	Schmidt-Roach <i>et al.</i> , 2013
250, 773, 949, IP18, IP24, IP50m, IP63, IP6, IP76, IP95, IP96, KOC23, PI13, PI16, PI31, PI84, PL115, PL137, Pc7, PidIR4, PmeIR3, PocClip1, PocClip2, PveLo12, PveLo1	Paz-García, 2015

Un total de 26 haplotipos únicos fueron calculados en los paquetes *pegas* y *haplotypes* como se describió anteriormente, siendo la única diferencia en los análisis filogenético de máxima verosimilitud así como por inferencia bayesiana, el uso de individuo "PocClip1_a" como Outgroup, el cual comparte el mismo haplotipo con "HQ378759_Pocillopora_sp_Type 2" (Pinzón y Lajeunesse, 2011). El mejor modelo de sustitución según el programa ModelFinder fue HKY + F + I (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). Tanto en el análisis ASAP como GMYC los parámetros fueron los mismos que para el gen ORF: K80 para el cálculo de distancias en ASAP y reloj log-normal en un proceso Yule como prior del árbol ultramétrico en el programa BEAST (Bouckaert *et al.* 2014).

La red haplotípica fue elaborada en Haplowebmaker y se utilizaron ambos alelos (identificadores “_a” y “_b”) para determinar los campos de recombinación entre individuos heterocigotos. Al igual que en la haplored resultante de las secuencias de ORF, las inserciones y deleciones fueron tratadas como datos faltantes, los caracteres ambiguos “enmascarados” y el algoritmo de red fue *mininum spanning* (Spöri y Flot, 2020).

6.4 Identificación de SNPs en exones exclusivos de corales escleractíneos

Recientemente, se identificó un set de exones compartidos de una sola copia comparando exclusivamente transcriptomas de corales escleractíneos (Quek *et al.*, 2020). En el material suplementario que proporciona dicho estudio <https://doi.org/10.5281/zenodo.3590246>, se encuentran los alineamientos utilizados para análisis filogenómico y de los cuales manualmente se extrajeron las secuencias de exones concatenadas de un individuo catalogado como *P. acuta* en un solo archivo fasta con una longitud de secuencia de 104 302 kpb. Este archivo a su vez fue introducido en la base de datos Reefgenomics.Org, donde se encuentra alojado el genoma anotado de *P. verrucosa* y donde fue posible obtener mediante el algoritmo blast con parámetros en default las secuencias correspondientes a 223 genes que hicieron un match superior al 90% de similitud con la búsqueda (Fig. 3) (Liew *et al.*, 2016). Las secuencias de estos genes serían las que últimamente conformarían la referencia a la cual se mapearían las lecturas de las 46 librerías de RNA-Seq en Magic-BLAST (Boratyn *et al.* 2020). Las 223 secuencias correspondientes a *P. verrucosa* fueron agrupadas en un mismo archivo fasta, pero con sus identificadores de secuencia correspondientes de manera que en análisis posteriores al presente estudio se puedan identificar los genes ortólogos con mayor cobertura y mayor cantidad de polimorfismos (Andermann *et al.*, 2020). Con el comando *makeblastdb* se elaboró la base de datos de referencia a partir de este archivo fasta, empleando la opción *-parse_seqids* para mantener los identificadores de secuencia originales y *-dbtype nucl* para indicar que se tratan de secuencias nucleotídicas. Con el programa *magicblast* Se descartaron las lecturas no mapeadas con la opción *-no_unaligned* y se utilizaron 3 threads de CPU (Boratyn *et al.* 2020).

Los archivos .sam resultantes de cada individuo fueron convertidos a .bam mediante el comando *SortSam* del programa *Picard* y posteriormente a sus lecturas se les añadió el identificador de cada librería SRA mediante el comando *AddOrReplaceReadGroups* del programa *GATK* (Van der Auwera GA y O'Connor, 2020). Con este último programa se marcaron las lecturas duplicadas con *MarkDuplicates* y finalmente se dividió las lecturas en segmentos de exones con *SplitNCigarReads*. Los 46 archivos .bam resultantes fueron empleados para un llamado conjunto de los polimorfismos en *samtools* con un millón de lecturas por individuo, considerando tanto la profundidad alélica (AD, DP) como la calidad y probabilidad de genotipado (GQ, GP). El comando empleado fue el siguiente: *bcftools mpileup -a AD,DP,SP -Ou -d 1000000 -f sequencesserver-223_hits.fasta *.SplitNCigarReads.bam | bcftools call -f GQ,GP -mO z -o bcfrawcall223exonsfinal.vcf.gz*. Posteriormente el archivo vcf fue filtrado en *vcftools*, removiendo así las inserciones, deleciones, lecturas de profundidad menor a 10, frecuencia del alelo menor, calidad de llamada por base menor a 30, un 10% de datos faltantes: *vcftools --gzvcf bcfrawcall223exonsfinal.vcf.gz --remove-indels --maf 0.025 --max-missing 0.9 --minQ 30 --min-meanDP 10 --minDP 10 --recode --stdout | bgzip -c > filteredbcfsnps.vcf.gz* (Danecek et al., 2011).

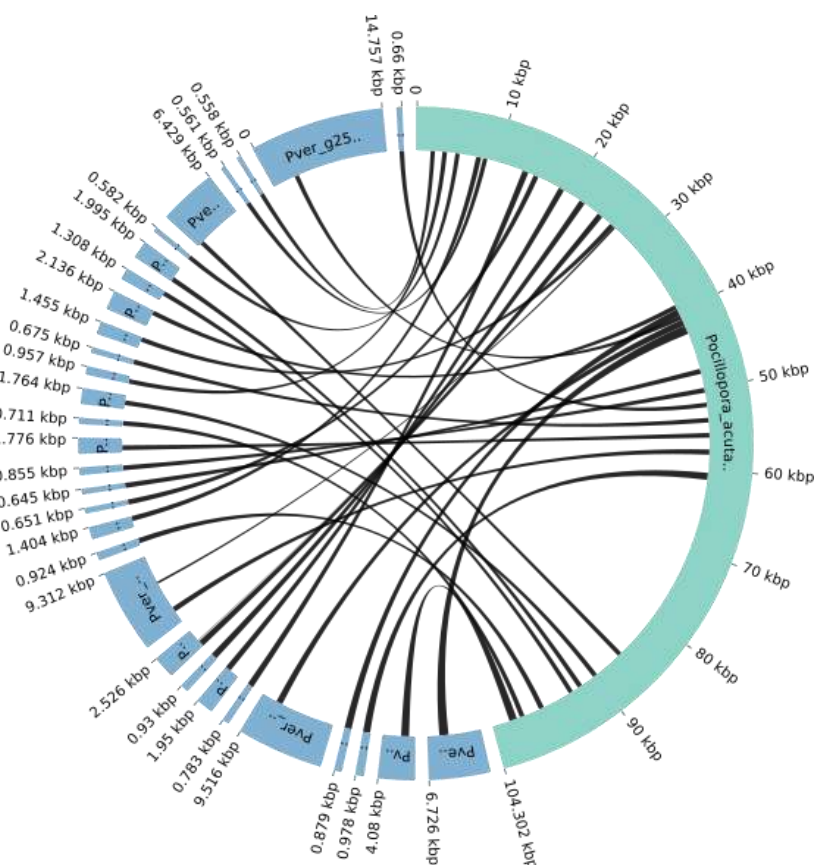


Figura 3. Diagrama de cuerdas que ilustra los múltiples alineamientos que corresponden con la búsqueda de 104 302 kpb de exones capturados, secuenciados y concatenados por Quek *et al.* 2020.

6.5 Análisis de componentes principales y ancestría individual a partir de SNPs

El archivo de SNPs filtrados (1801 SNPs) fue incorporado al programa R mediante el paquete *vcfR* y convertido a formato genlight mediante la función *vcfR2genlight* (Knaus y Grünwald, 2017). Posteriormente se realizó el análisis de componentes principales con la función *gPCA* del paquete *adegenet*, y se agrupó los dos primeros componentes de acuerdo a la especie asignada por los análisis del marcador ORF y a la localidad de procedencia (Jombart y Ahmed, 2011).

Modelos de clustering con valores K=1-11 fueron evaluados en ADMIXTURE y en *adegenet*, usando el error de cross-validation y el criterio de información bayesiano (BIC) como criterios para calcular el valor más probable de K (Alexander *et al.*, 2009; Jombart y Ahmed, 2011). La proporción de ancestría individual calculada por ADMIXTURE fue representada por localidad y

por especie asignada mediante análisis del marcador mtORF en el paquete *ggplot2* de R (Wickham, 2016).

6.6 Análisis filogenómico de SNPs

Dado que no se recuperaron individuos de *P. cf. effusus* o *P. ligulata*, se procedió a mapear los mismos 223 exones a las lecturas limpias de *Stylophora pistillata* (SRR1125978) con el mismo flujo de trabajo que se describió para el resto de librerías para ser utilizado como outgroup en el análisis filogenómico (Liew *et al.* 2014). El archivo vcf resultante fue convertido a formato nexus mediante el script *vcf2phylip* y se utilizó una matriz final de 627 SNPs sin sitios constantes o datos faltantes. El mejor modelo evolutivo estimado por ModelFinder fue GTR+F+ASC+G4 y 100 000 las réplicas de bootstrap en el programa IQTREE 2 (Ortiz, 2019b; Minh *et al.*, 2020). Posteriormente el árbol fue visualizado y editado en el portal iTOL (Letunic y Bork, 2021).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de secuencias AT6-ORF

El mapeo de lecturas solo logró recuperar una fracción de la referencia utilizada (560 pb de 988 pb). Con estas secuencias consenso parciales alineadas al set disponible en NCBI y las secuencias no publicadas, se encontró que de los 8 haplotipos únicos calculados para los 46 individuos secuenciados mediante RNA-Seq, fueron asignadas 6 especies distintas conforme a lo obtenido en análisis de delimitación y análisis filogenético: *P. verrucosa* (n= 2), *P. sp. 7* (n= 2), *P. sp. 8* (n= 2), *P. meandrina* (n= 10), *P. damicornis* (n= 1) y *P. acuta* (n= 29) (Fig. 4-6).

Los 4 clados principales resultantes del análisis filogenético bayesiano tuvieron un mayor soporte para los nodos terminales que muestran la relación entre *P. acuta* y *P. damicornis*, *P. verrucosa* y *P. sp 7* (Prob. Posterior > 0.9), que para *P. meandrina* y *P. sp. 8*. (Prob. Posterior < 0.9) (Fig. 4). Esto contrastó con las particiones obtenidas en el modelo por distancias ASAP que establece a *P. damicornis* y *P. acuta* como una sola especie considerando distancias genéticas interespecíficas de 0.0054 y 0.0072 (Fig. 4, Tabla 4). Las particiones de los modelos sGMYC y mGMYC no fueron significativas, pero resultaron en gran medida similares a clados y campos de recombinación de haploredes con la excepción de los grupos externos utilizados (*P.cf. effusus* y *P. ligulata*); los cuales fueron agrupados en la misma partición (Fig. 4-5, Tabla 4).

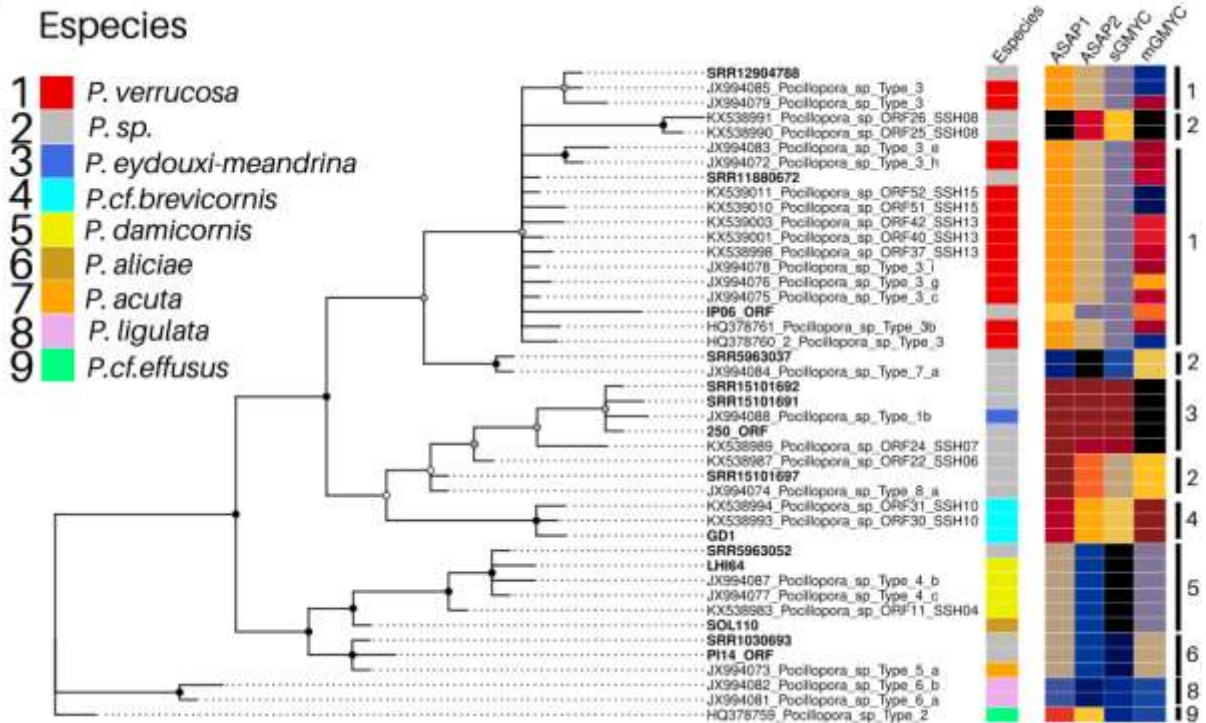


Figura 4. Filogenia molecular de haplotipos únicos de la región mitocondrial ATP6-ORF por método de inferencia bayesiana y particiones resultantes de métodos de delimitación ASAP, sGMYC, mGMYC. Colores representan las especies descritas asociadas a determinados haplotipos de acuerdo a la literatura. Números representan la pertenencia de los individuos de acuerdo al consenso entre la filogenia bayesiana y las distintas particiones. Nodos negros establecen una probabilidad posterior mayor a 0.9 y nodos grises menor a 0.75.

Por otro lado, las muestras secuenciadas mediante método Sanger resultaron agrupadas en especies previamente descritas (*P. verrucosa* y *P. acuta*), o bien en particiones donde se estipula que sean una especie no descrita como el haplotipo correspondiente a la muestra IP06_ORF (Fig. 4-5). La diversidad nucleotídica y contenido de GC fue similar considerando que se utilizaron 153 secuencias adicionales a las recuperadas mediante el mapeo de lecturas, y la longitud del alineamiento fue menor al esperado por la referencia utilizada (Fig. 5-6, Tabla 4). Se detectaron alrededor de 56 sitios segregantes en el alineamiento de todas las secuencias y 29 exclusivamente al comparar las librerías RNA-Seq.

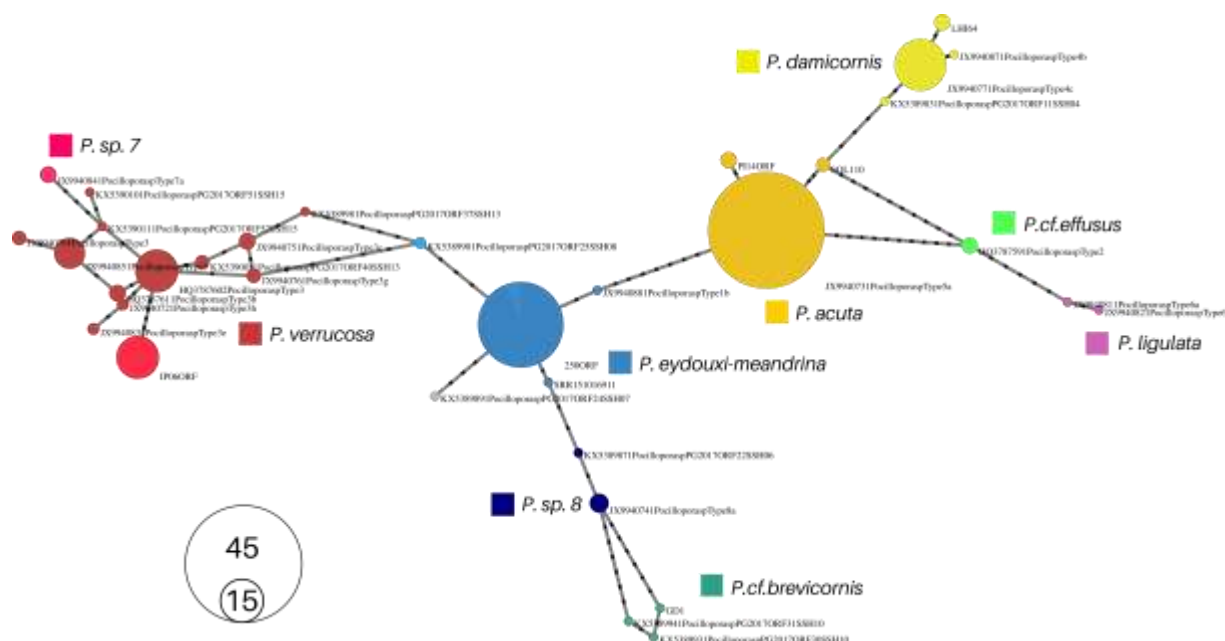


Figura 5. Red haplotípica resultante del análisis de 199 secuencias de la región mitocondrial ATP6-ORF disponibles en NCBI, obtenidas mediante secuenciación Sanger y recuperadas a partir de librerías del repositorio SRA. P. sp 7 y P. sp 8 hacen referencia a individuos que compartan haplotipos antes descritos por Pinz et al., 2013 como Tipo 7 y Tipo 8.

Tabla 4. Descriptores y estadísticos de los métodos de delimitación empleados en secuencias de la región mitocondrial AT6-ORF.

ASAP				
No. de Especies	Puntuación ASAP	Valor-p (rango)	W (rango)	Umbral de distancia interespecífica
9	4.50	8.60e-01	1.04e-04	0.0072
11	5.50	5.09e-01	9.33e-05	0.0054
GMYC				
No. de Especies	Método	Ln - nulo	Ln - GMYC	Prueba LR
10	sGMYC	317.8869	318.6838	0.4507
14	mGMYC	317.8869	319.7691	0.1523
Haplored				
Set de datos	Longitud de Secuencia	No. Haplotipos	Diversidad Genética	Contenido GC
ORF SRA	560 pb	8	0.00935	0.3900
ORF 199	560 pb	34	0.01534	0.3874

Cabe recalcar que se encontraron diferencias en cuanto a la distribución geográfica de los linajes genéticos denominados como especies (Fig. 4, 6 y Tabla 4). Los dos individuos asignados como *P. verrucosa* se encuentran separados por miles de kilómetros, uno en la Península Arábiga y otro en las Islas Spratly. Los individuos designados como *P. sp. 7* se hallaron exclusivamente en Oman, mientras que los individuos denominados como *P. sp. 8* en Moorea. El linaje de *P. meandrina* se observó en Hawái, Moorea y en el Pacífico Mexicano mientras que solo un individuo de Nueva Caledonia fue identificado como *P. damicornis*. La especie más abundante y por ende observada en un mayor número de localidades resultó ser *P. acuta*, ausente en la Península Arábiga y en Pacífico Oriental (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución geográfica de individuos cuya región mitocondrial ATP6-ORF fue recuperada de lecturas producidas mediante RNA-Seq. Localidades se encuentran ordenadas en orden longitudinal de Este a Oeste tomando como referencia el antimeridiano 180. AS: Yidda, Arabia Saudita. OM: Golfo de Omán, Omán. SGP: Singapur, Singapur. CHN: Hainan, China. TWN: Taiwan, Taiwan. VTN: Islas Spratly, Vietnam. JPN: Okinawa, Japón. NCD: Baie des Citrons, Nueva Caledonia. EUA: Hawaii, EUA. POL: Moorea, Polinesia Francesa. MEX: Manzanillo, México.

Especies	Localidad											
	AS	OM	SGP	CHN	TWN	VTN	JPN	NCD	EUA	POL	MEX	
<i>P. verrucosa</i> (n= 2)	1					1						
<i>P. sp. 7</i> (n= 2)		2										
<i>P. sp. 8</i> (n= 2)										2		
<i>P. meandrina</i> (n= 10)									1	8	1	
<i>P. damicornis</i> (n= 1)								1				
<i>P. acuta</i> (n= 29)			3	4	1	1	7	2	11			

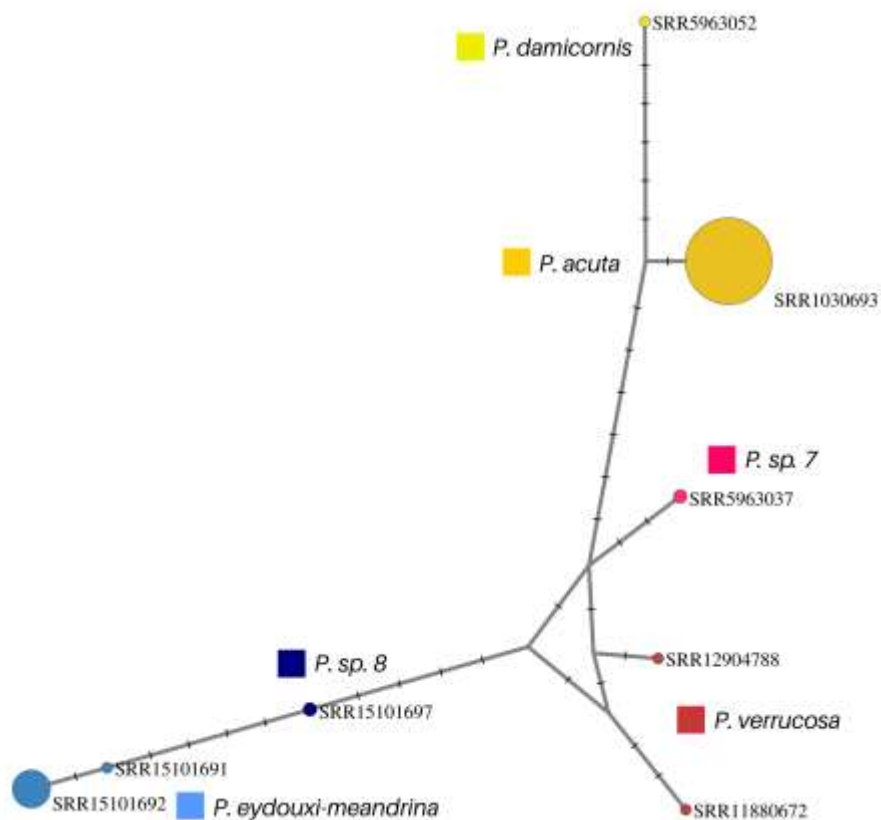


Figura 6. Red haplotípica resultante del análisis de secuencias de la región mitocondrial ATP6-ORF recuperadas a partir de librerías del repositorio SRA (N= ?). Nomenclatura de especies de acorde a lo obtenido en el análisis filogenético bayesiano y análisis de delimitación.

7.2 Análisis de marcador nuclear HSP70

La resolución de linajes utilizando el primer alelo de HSP70 no resultó igual de consistente entre métodos al compararlos con los clados monofiléticos obtenidos del marcador mitocondrial (Fig. 4 y 7). Aunque se observó cierta correspondencia entre muestras de *P. meandrina* y *P. sp. 8* al ubicarse en un clado de alto soporte de probabilidad posterior; el resto de haplotipos fueron asignados a grupos congruentes con la filogenia molecular de HSP70 pero en desacuerdo con las especies detectadas mediante el análisis de ATP6-ORF (Fig. 7). Un ejemplo claro son los haplotipos asignados como *P. acuta*, emparentados con haplotipos IP18-IP96, los cuales conforman un linaje no descrito y que está mayormente emparentado con haplotipos designados como *P. verrucosa* (Fig. 4, 5 y 7). De igual manera individuos asignados como *P. damicornis* resultaron filogenéticamente más próximos a *P. verrucosa* que a *P. acuta*.

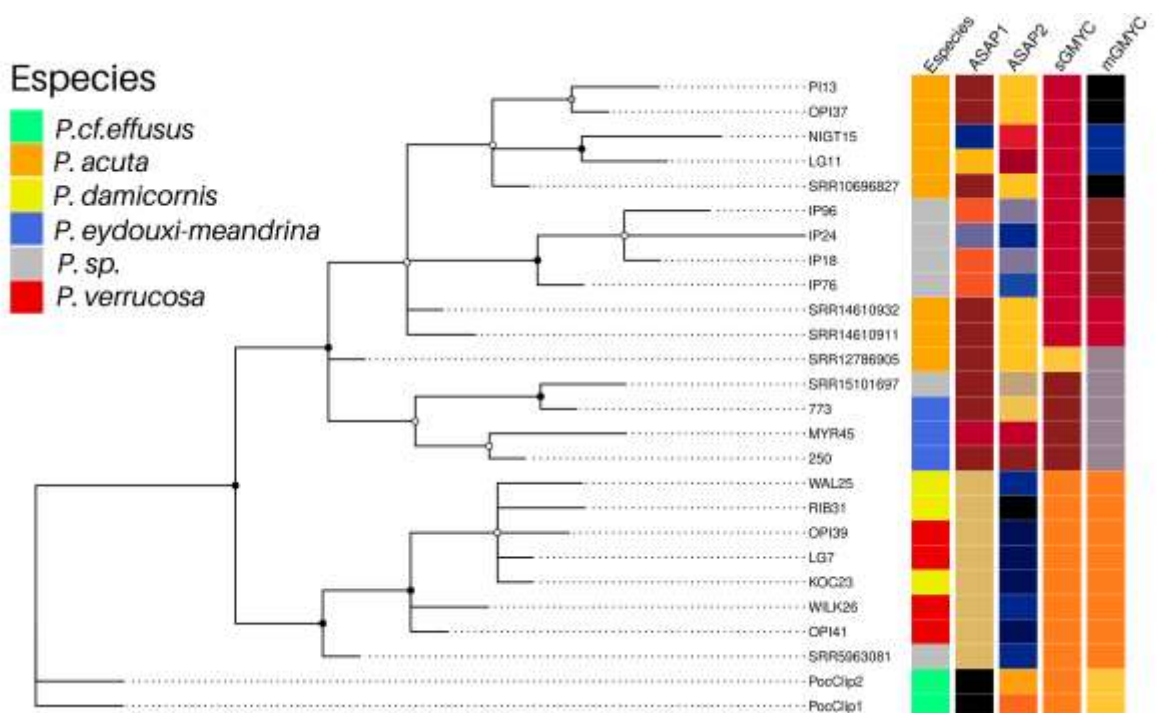


Figura 7. Filogenia molecular de haplotipos únicos del gen HSP70 por método de inferencia bayesiana y particiones resultantes de métodos de delimitación ASAP, sGMYC, mGMYC. Colores representan las especies descritas asociadas a determinados haplotipos mitocondriales de acuerdo a la literatura y al análisis del presente estudio. Nodos negros establecen una probabilidad posterior mayor a 0.9 y nodos grises menor a 0.75.

Quizá la única consistencia entre métodos como ASAP, la filogenia molecular bayesiana y el modelo mGMYC fue al diferenciar al grupo externo PocClip1, perteneciente a la especie *P. cf. effusus* (Fig. 7, Tabla 6). En lo que respecta diversidad nucleotídica y contenido de GC fue similar entre ambos sets de datos (Tabla 5). Se detectaron alrededor de 44 sitios segregantes en el alineamiento de todas las secuencias del primer alelo y 11 exclusivamente al comparar las librerías RNA-Seq.

Tabla 6. Descriptores y estadísticos de los métodos de delimitación empleados en secuencias de un solo alelo (ASAP,GMYC) y ambos alelos (Haploredes-Haplowebmaker) del gen HSP70.

ASAP				
No. de Especies	Puntuación ASAP	Valor-p (rango)	W (rango)	Umbral de distancia interespecifica
8	3.00	9.20e-01	5.85e-05	0.0016
14	4.00	9.84e-01	7.24e-05	0.0008
GMYC				
No. de Especies	Método	Ln - nulo	Ln - GMYC	Prueba LR
4	sGMYC	204.413	204.6946	0.7546
7	mGMYC	204.413	204.9413	0.5896
Haplored				
Set de datos	Longitud de Secuencia	No. Haplotipos	Diversidad Nucleotídica	Contenido GC
HSP70-SRA	1255 pb	12	0.0023	0.4828
HSP70-77	1255 pb	32	0.0037	0.4824

La haplored con secuencias de ambos alelos confirmó el bajo grado de correspondencia entre los campos de recombinación calculados con HSP70 con las especies designadas mediante el marcador mitocondrial. Tanto *P. meandrina* como *P. damicornis* comparten campos de recombinación con linajes considerados distintos: *P. sp. 8*, y *P. verrucosa* respectivamente (Fig. 8 y 9). De igual manera, es oportuno recalcar que individuos clasificados como *P. acuta* se encuentra a escasos pasos mutacionales de los campos de recombinación de *P. meandrina*. Esto se contrapone con la clara división filogenética y geográfica entre estos (Tabla 5, Fig. 4, 6 y 9). Otro aspecto a considerar es que se observó amplia variación alélica inter-individual en el gen HSP70, particularmente en individuos asignados como *P. sp. 8* (SRR15101697, SRR15101700) y *P. acuta* (SRR6761154) según análisis de la región mitocondrial (Fig. 8 y 9).

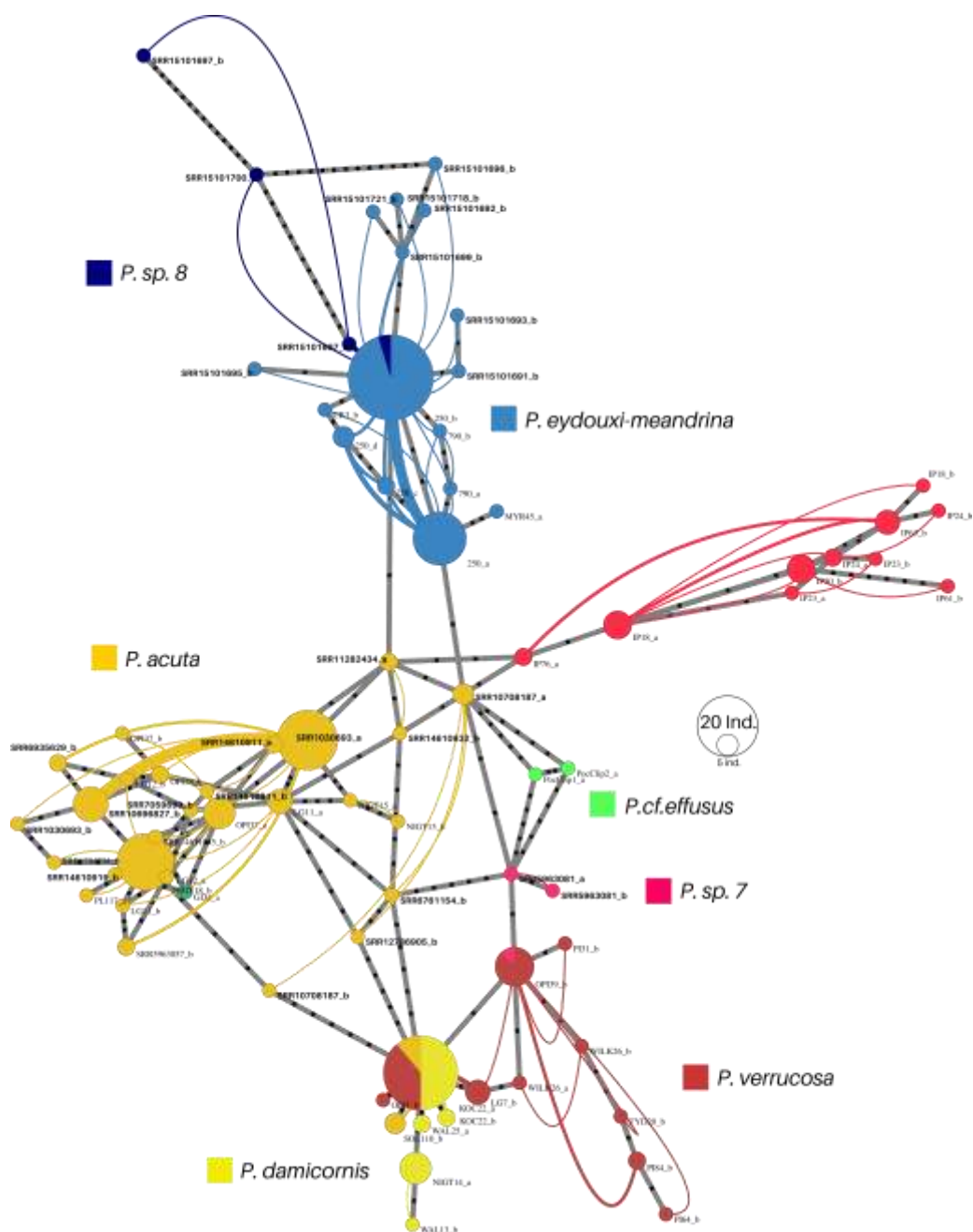


Figura 8. Red haplotípica resultante del análisis de 127 secuencias del gen HSP70 disponibles en NCBI, obtenidas mediante secuenciación Sanger y recuperadas a partir de librerías del repositorio SRA. Colores de los campos de recombinación hacen referencia los haplotipos mitocondriales de cada individuo.

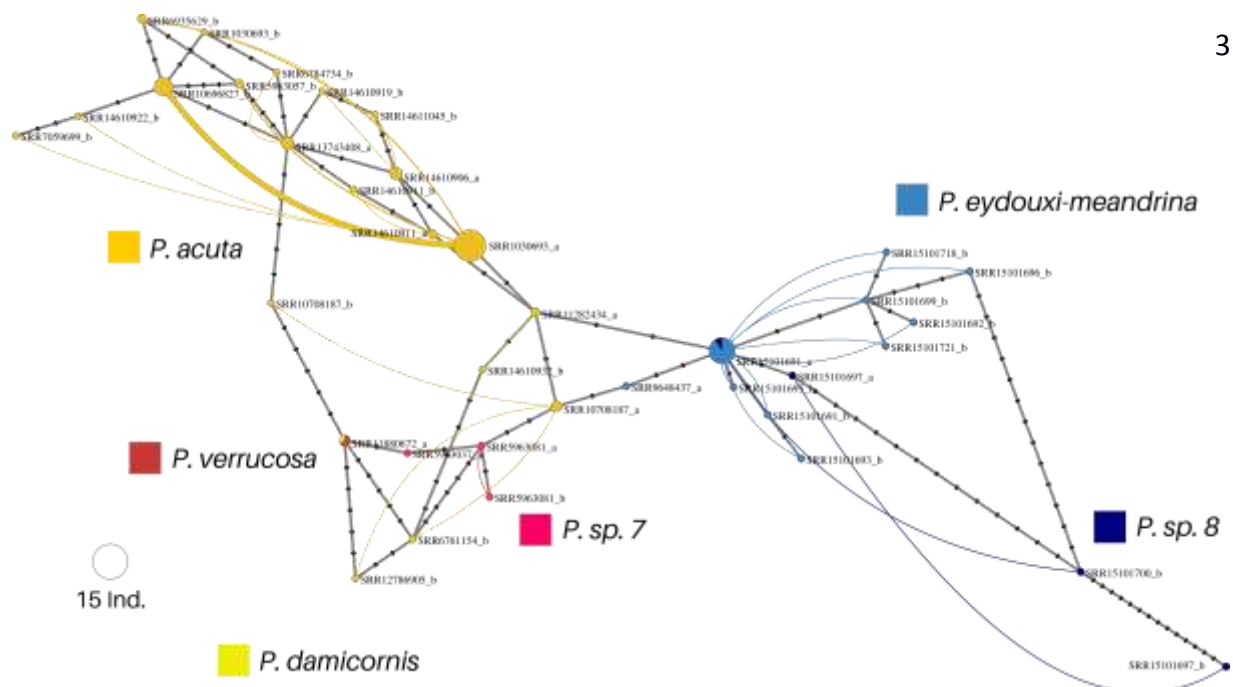


Figura 9. Red haplotípica resultante del análisis del gen del gen HSP70 recuperado a partir de 46 librerías del repositorio SRA. Colores de los campos de recombinación hacen referencia los haplotipos mitocondriales de cada individuo.

7.3 Análisis de componentes principales y ancestría individual a partir de SNPs

El análisis de componentes principales muestra que hasta un 38.7 % de la variación de los datos de polimorfismos se corresponde con la identidad asignada al linaje previamente, mediante análisis de la región AT6-ORF y no con la localidad (Fig. 10 y 11). Además, los 3 grupos (clusters) obtenidos están compuestos por grupos filogenéticamente próximos según el análisis bayesiano del marcador mitocondrial antes mencionado: Cluster 1 (*P. damicornis* y *P. acuta*), Cluster 2 (*P. meandrina* y *P. sp. 8*) y Cluster 3 (*P. verrucosa* – *P.sp. 7*). De igual manera las agrupaciones por localidad de procedencia de la muestra concuerdan con la distribución longitudinal establecida en la Tabla 4 (Fig. 10).

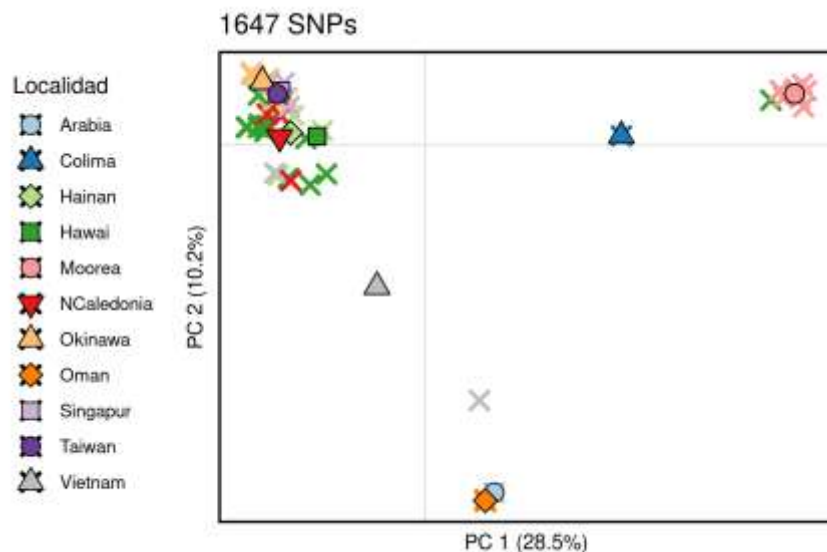


Figura 10. Análisis de componentes principales realizado con 1647 SNPs bi-alélicos. Coordenadas de los componentes de cada individuo son representadas por símbolos X. Centroides y colores de los centroides indican la procedencia de las muestras.

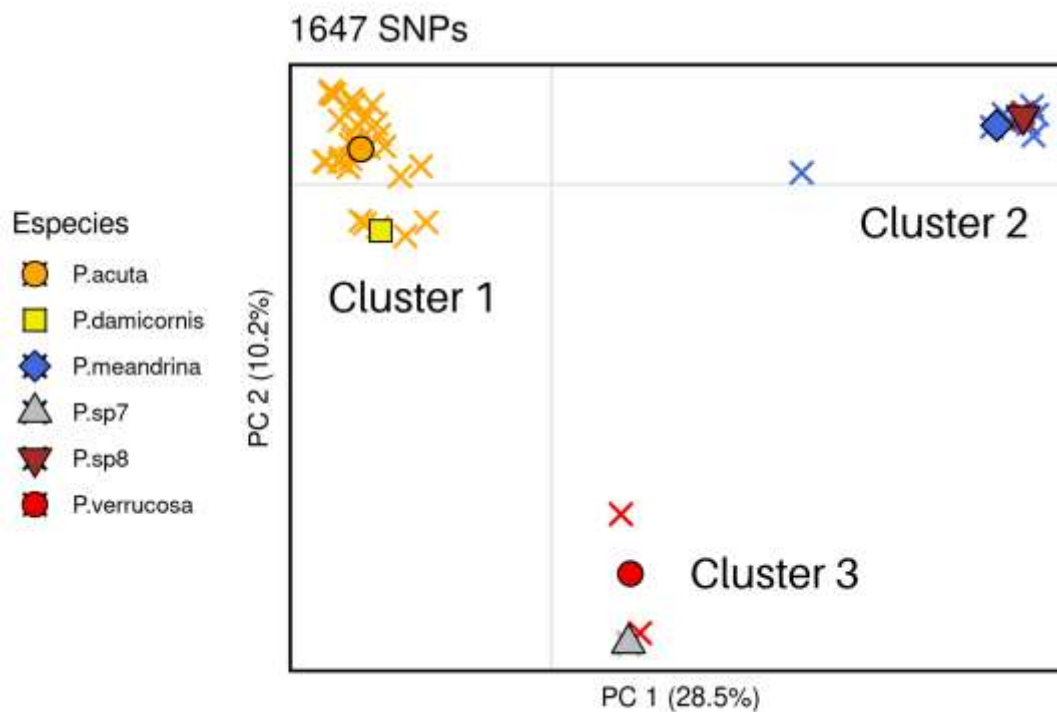


Figura 11. Análisis de componentes principales realizado con 1647 SNPs bi-alélicos. Coordenadas de componentes de cada individuo son representadas por símbolos X. Colores indican el haplotipo mitocondrial definido como especie en los análisis previos.

A diferencia de lo propuesto por el análisis filogenético y análisis de delimitación de la región mitocondrial, el análisis ADMIXTURE de SNPs demostró que el número más probable de agrupamientos es 4 (error de crosvalidación más bajo entre 1 y 11) y que además todos los individuos clasificados como *P. acuta* en Hawái están mayormente emparentados con el único individuo clasificado como *P. damicornis*. Esto concuerda con los agrupamientos dentro del Cluster 1 del análisis de componentes principales, donde varios individuos de esta localidad están más próximos al centroide de *P. damicornis* que al centroide calculado para *P. acuta* (Fig. 10,11 y 12a). Además, los individuos delimitados en el primer análisis como *P. sp 8* y *P.sp.7* comparte identidad del 100% con individuos clasificados como *P. meandrina* y *P. verrucosa* respectivamente (Fig. 12a).

En lo que respecta la distribución geográfica de los demás clusters obtenidos mediante ADMIXTURE, se puede observar que el cluster asociado a *P. verrucosa* se observa en la Península Arábiga (en el Mar Rojo y Golfo de Omán) y en las Islas Spratly mientras que el cluster asociado a *P. acuta* se extiende desde Singapur hasta Nueva Caledonia. Cabe destacar que en este último grupo se observan varios individuos con ancestría mixta entre *P. acuta* y *P. damicornis*. En cuanto al último grupo, está compuesto por individuos de Hawaii, Moorea y Colima, tal como el clado conformado por *P. meandrina* y *P. sp 8* (Fig. 4 y 12b).

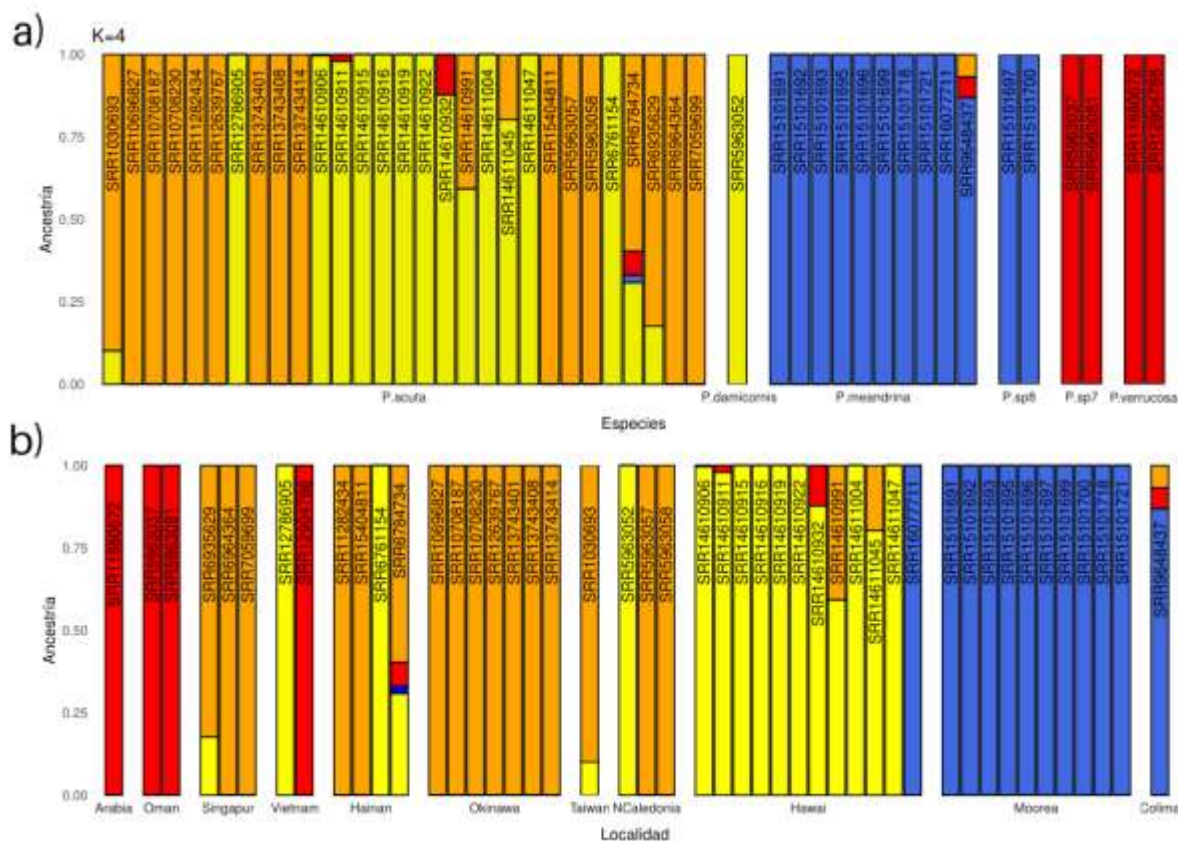


Figura 12. Gráfica de ADMIXTURE, demostrando los porcentajes de asignación a cada uno de los clusters de ancestría (K=4, Error de Crovalidación = 0.3743). a) Muestra una separación individual conforme a las especies delimitadas mediante haplotipos mitocondriales. b) Denota la localidad de los individuos.

7.4 Análisis filogenómico de SNPs

Por último, el análisis filogenómico de máxima verosimilitud elaborado mediante 640 SNPs bialélicos, agrupó a las muestras en 4 clados monofiléticos de alto soporte (>90%) que corresponden con los clusters observados en los análisis de componentes principales y Admixture (Fig. 11 y 13). Asimismo *P. sp 8* y *P.sp.7* comparten clados con individuos clasificados como *P. meandrina* y *P. verrucosa*, respectivamente. Se observa también un acomodo geográfico longitudinal de los individuos de *P. verrucosa* y *P. meandrina* a través del Indo-Pacífico tal como se describió mediante el análisis de agrupamiento (Fig. 12b). De manera contrastante, hay individuos de una misma especie que están filogenéticamente más

emparentados entre sí, que con otros de una especie hermana en la misma localidad: *P. damicornis* y *P. acuta* en Nueva Caledonia.

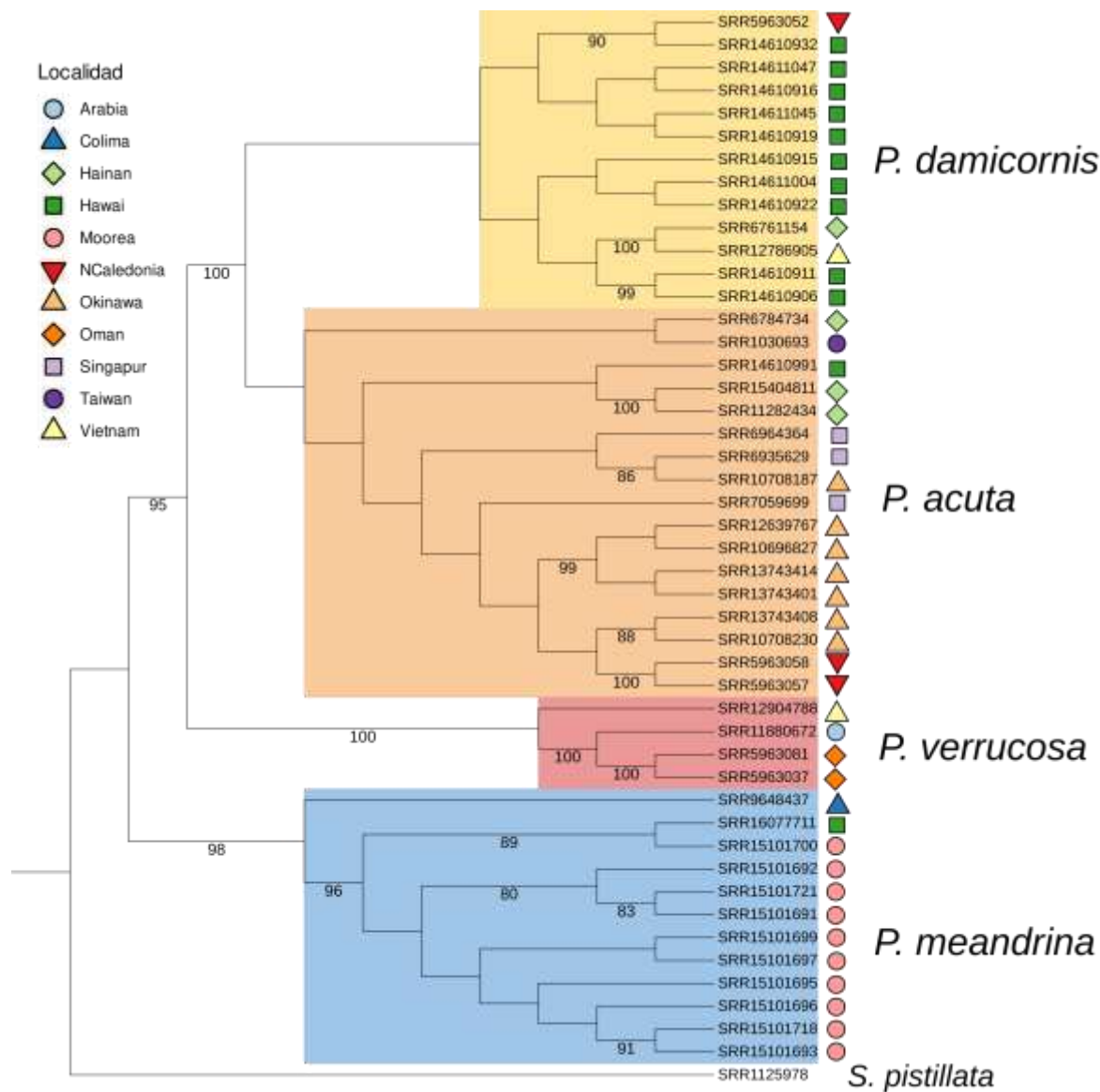


Figura 13. Análisis filogenómico calculado mediante 640 SNPs bi-alélicos sin datos faltantes. El modelo de sustitución fue GTR+F+ASC+G4 y las réplicas de bootstrap 100 000. Ramas sin bootstrap asignado son menores al 75%. Formas en ramas terminales denotan la localidad de donde se obtuvo la muestra.

8. DISCUSIÓN

8.1 Los procesos de especiación y la sistemática molecular de corales escleractinios

El análisis molecular comparativo llevado a cabo en el presente estudio, demostró una falta de correspondencia en cuanto al número de especies delineadas (ORF: 4-8, HSP70:2-12 y SNPs:4), y a las relaciones evolutivas interindividuales. Sin embargo, la interpretación de estos patrones discordantes de diferenciación filogenética y geográfica entre corales de un mismo género, pueden ser abordados desde una visión genómica del proceso de especiación (Potkamp y Fransen, 2019; Stankowski y Ravinet, 2021).

Desde la perspectiva genómica se asume que una vez interrumpido por completo el flujo genético existente entre poblaciones mediante barreras geográficas, se da origen a linajes evolutivos distintos mediante mecanismos como la selección natural o la deriva genética (Galtier, 2019). La dinámica de especiación en el medio marino no necesariamente pudiera ocurrir de esta manera, y esto se relaciona en gran medida con dos factores: la capacidad de dispersión larval de los organismos y el tamaño efectivo poblacional (Miglietta et al. 2011, Bowen et al. 2013). Particularmente en corales formadores de arrecifes, aunque se trate de organismos coloniales sésiles, la etapa más temprana de su ciclo de vida es planctónica y les permite dispersarse a través de múltiples barreras biogeográficas manteniendo un flujo genético alto (González et al. 2018). Además, tamaños poblacionales grandes merman el efecto de la deriva genética en la fijación de alelos, por lo que la especiación en arrecifes coralinos podría ocurrir principalmente por selección natural divergente a distintos gradientes ambientales (Potkamp y Fransen, 2019). Sin embargo, al mantenerse un flujo genético intermitente, el proceso de diversificación no culmina en una bifurcación por aislamiento reproductivo total, sino en un modo particular de especiación denominado evolución reticular (Arnol y Forgarty, 2009; Veron, 2013). Esta hipótesis propone a la especiación como un suceso en cierto modo reversible, en el cual linajes evolutivos distintos vuelven a intercambiar material genético mediante la reproducción sexual si las condiciones oceanográficas de un tiempo geológico determinado lo favorecen (Marques et al. 2019; Mao, 2020). Si por el contrario la

identidad de ambos linajes se mantiene pero son capaces de reproducir individuos fértiles entre sí, entonces también cabe la posibilidad de un tipo de particular de especiación por hibridación, donde dos especies dan lugar a una tercera (Mallet, 2007; Hobbs *et al.*, 2021).

Todas estas circunstancias pueden repercutir de manera directa en el proceso de clasificación de especies de corales fundamentado en la sistemática molecular (Galtier, 2019; Mao, 2020; Hobbs *et al.*, 2021). Dadas las bajas tasas mutacionales de los genomas mitocondriales de corales escleractíneos, y la herencia uniparental característica del ADN mitocondrial, puede que estos eventos de conectividad pasada y presente entre linajes sean más fácilmente detectados con el uso de marcadores nucleares que pudieron haber llegado a recombinarse sin un aislamiento reproductivo total (Van Oppen *et al.* 1999; Hellberg, 2006; Després, 2019). Esto inevitablemente puede resultar en diferencias significativas en los patrones de diferenciación genética de poblaciones y especies calculados mediante distintos marcadores, tal como los que se obtuvieron en el presente estudio (Toews y Brelford, 2012).

8.2 Discordancia mito-nuclear en *Pocillopora*

Esta investigación se suma a otras líneas de evidencia que demuestran una clara discordancia a nivel especie entre marcadores de tipo nuclear obtenidos mediante secuenciación de alto rendimiento, y el tradicionalmente empleado ATP6-ORF (Aurelle *et al.*, 2021; Johnston *et al.*, 2022). Un primer reporte de esta incongruencia entre marcadores se realizó en Omán, donde individuos catalogados como Tipo 7 y Tipo 3 (*P. verrucosa*) mediante el marcador mitocondrial formaron parte de los mismos clados y clusters de 320 SNPs provenientes de loci RAD tal como se observó con los individuos catalogados como *P. verrucosa* y *P. sp. 7* mediante el análisis de los SNPs exónicos (Aurelle *et al.*, 2021). Y esto que significa en términos de flujo?

Resultados similares se observaron en otro estudio realizado en Moorea, Polinesia Francesa utilizando 2770 SNPs provenientes de loci RAD; en el cual individuos clasificados como Tipo 8 mediante el análisis de la región ORF formaron un clado monofilético y un mismo cluster de asignación con *P. meandrina* (Johnston *et al.*, 2022). Además, en este último estudio proponen a

un individuo del Pacífico Oriental Tropical, clasificado molecularmente como *P. meandrina*, como una especie no descrita dado su estatus parafilético de alto soporte en la filogenia de SNPs y su separación del resto de individuos del cluster de *P. meandrina* en los análisis de ordenación. Ambas observaciones van de acorde a lo reportado en el presente estudio, donde: a) individuos catalogados como *P. sp. 8* mediante el marcador mitocondrial se encuentran dentro del mismo clado y en los mismos clusters que *P. meandrina*; y b) la librería secuenciada a partir de una colonia proveniente del Pacífico Mexicano (SRR9648437) se ubicó fuera del clado *P. meandrina* con alto soporte de bootstrap y menor porcentaje de asignación al cluster de ancestría correspondiente a ese linaje.

Cabe mencionar que este estudio es el primero en reportar una discordancia mitonuclear entre *P. damicornis* y *P. acuta* así como individuos de ancestría mixta mediante análisis de SNPs derivados de exones. A la fecha el único antecedente que demostró discriminar ambas especies mediante múltiples loci nucleares y SNPs, obtuvo una correspondencia completa de las relaciones filogenéticas entre los mismos individuos con la filogenia del genoma mitocondrial completo (Johnston *et al.*, 2017). Esto contrasta con lo hallado en el presente estudio en el cual se delineó 1 solo individuo como *P. damicornis* mediante el análisis de la región mitocondrial y 13 mediante el análisis de SNPs. No obstante, la existencia de individuos de ancestría mixta detectados mediante SNPs exónicos va de acorde a las evidencias de identificación de posibles híbridos entre estos dos linajes mediante el uso de microsatélites en ambientes donde ocurren en simpatria: Nueva Caledonia y la costa Occidental de Australia (Thomas *et al.* 2013; Selmoni *et al.* 2020).

El análisis de mitogenomas para estimar los tiempos de divergencia entre las especies actuales de *Pocillopora* propone un proceso de extinción y posterior radiación adaptativa hace 3 millones de años (Johnston *et al.*, 2017). Este tiempo pudo haber resultado insuficiente para que eventos de contacto secundario e intercambio genético reciente (*P. acuta* y *P. damicornis*, *P. meandrina* y *P. sp. 8*, *P. verrucosa* y *P. sp. 7*) sean detectados con secuencias parciales o totales del marcador mitocondrial ATP6-ORF (De Palmas *et al.*, 2018; Johnston *et al.*, 2018; Toews & Brelford, 2012). Aunque se ha demostrado en otros Pocilloporidos como *Stylophora* que con el

uso de genomas mitocondriales completos es posible detectar regiones mitocondriales recombinantes entre linajes (nd2, nd6, atp6, ORF, nd4); la variabilidad genética en regiones codificantes en *Pocillopora* está limitada a una docena de mutaciones en Atp6-ORF a diferencia lo observado en *Stylophora* en la misma región (45-50 mutaciones) (Flot y Tillier, 2007, Banguera-Hinestroza *et al.*, 2019).

Comprobar si estos posibles escenarios de hibridación han ocurrido o siguen ocurriendo requerirá de un enfoque multidisciplinario en el cual se disponga de experimentos de fertilización entre los linajes, análisis de redes filogenéticas y análisis de modelos de coalescencia múltiple entre especies con un mayor número de loci objetivo y de SNPs (Solís-Lemus y Ané, 2016; Forsman *et al.*, 2017; Flouri *et al.*, 2018; Ramírez-Portilla *et al.*, 2022).

8.3 Filogeografía comparativa e identificación de especies en estudios transcriptómicos de *Pocillopora*

Otro de los aspectos relevantes a considerar del presente trabajo fueron las correspondencias geográficas entre linajes genéticos determinados mediante el análisis de SNPs, con las especies definidas mediante el marcador mitocondrial. La separación espacial y relaciones filogenéticas observadas entre las librerías de RNA-Seq es congruente con la distribución geográfica de los haplotipos del marcador mtORF (*P. damicornis*=Type 4/PSH04; *P. acuta*= Type 5/PSH05, *P. meandrina*=Type 1/PSH09 y *P. verrucosa*= Type 3/PSH13) así como con los clados de la filogenia molecular de SNPs más recientemente publicada: *P. meandrina* como grupo más externo a *P. verrucosa* y las especies hermanas *P. acuta* y *P. damicornis* (Johnston *et al.* 2017; Oury *et al.* 2020).

Estudios de ecología molecular de *Pocillopora* de la última década, llevados a cabo en los océanos Índico y Pacífico han permitido construir una imagen fragmentada de la distribución de estos linajes genéticos (Edmunds *et al.* 2016; Gélin *et al.* 2017; Johnston *et al.* 2021). Los linajes filogenéticamente cercanos a *P. verrucosa* (Type 3/PSH13, Type 7/PSH12) han sido reportados con mayor frecuencia en la península Arábiga, el Mar Rojo y la Costa Oriental Africana, como se

reporta en este estudio; aunque su distribución se extiende hasta las Galápagos y Panamá longitudinalmente (Robitzch *et al.*, 2015; De-Palmas *et al.*, 2018; Oury *et al.* 2020). *P. damicornis*/PSH04 y *P. acuta*/PSH05 son comunes tanto en Nueva Caledonia como en el Indo-Pacífico Central pero son menos abundantes en los censos genéticos en las Islas del Pacífico Sur y ausentes completamente del Pacífico Oriental Tropical, tal como se obtuvo en el análisis de SNPs (Pinzón *et al.* 2013; Aurelle *et al.* 2021; Johnston *et al.*, 2021,2022).

Estas observaciones se complementan con los individuos de Moorea, Hawái y Colima delineados como *P. meandrina* que comparten los campos de recombinación del gen HSP70 con individuos del Pacífico Oriental Tropical y agrupamientos de ancestría individual de SNPs entre sí. Esto contrasta con las morfologías anotadas en los metadatos de las muestras de estas tres localidades, ya que la colonia procedente del Pacífico Oriental fue registrada como *P. verrucosa* mientras que el resto de colonias del clado *P. meandrina* fueron catalogadas con morfología *P. meandrina*. En Hawái generalmente la morfología *P. meandrina* se corresponde con el haplotipo mitocondrial homónimo (Johnston *et al.* 2018). En el Pacífico Sur y en el Pacífico Oriental ocurren circunstancias diametralmente opuestas: en el Pacífico Sur distintos linajes genéticos pueden desplegar una morfología de tipo *P. meandrina* mientras que en el POT colonias que comparten un mismo haplotipo (Tipo 1/PSH09) llegan a desplegar hasta 5 morfologías distintas (Pinzón *et al.* 2013; Paz-García *et al.* 2015). Análisis de conectividad mediante microsatélites entre poblaciones identificadas como *P. meandrina* (Tipo 1/PSH09) de tres provincias geográficas (el Océano Índico Occidental, Pacífico Suroccidental Tropical y Polinesia Suroriental) demostraron un alto grado de aislamiento y diferenciación genética entre el cluster genético del Océano Índico con los del Pacífico, encontrados en simpatria (Gélin *et al.*, 2018). Sin embargo, no se ha detectado subdivisión poblacional aparente entre el Pacífico Oriental Tropical y Hawái (Pinzón *et al.*, 2013). En otros corales como *Montastrea cavernosa* se ha demostrado que cuando el número de SNPs empleados supera los 1000, esto permite una identificación consistente de patrones ecológicos de diferenciación que no son detectados por microsatélites (Sturm *et al.*, 2020). Queda por definir entonces mediante herramientas genómicas y un muestreo geográfico latitudinal amplio si efectivamente las poblaciones del Pacífico Oriental que comparten este haplotipo mitocondrial conforman una especie distinta a

la descrita en Hawaii y Polinesia Francesa (Combosch y Vollmer, 2015; Johnston *et al.*, 2022).

Otro resultado que demuestra posibles errores en la identificación de especies de los estudios transcriptómicos se puede apreciar en los haplotipos correspondientes a *P. damicornis* y *P. acuta*. Geográficamente estos se encuentran ausentes de prácticamente todas las localidades estudiadas en el Pacífico Oriental, pero son bastante comunes en todo el Indo-Pacífico Central y dado que comparten tanto características morfológicas como reproductivas es común confundirlos en esquemas de muestreo (Poquita-Du *et al.*, 2017; Torres y Ravago-Gotango, 2018; Oury *et al.*, 2019). Esto se observó en los análisis de SNPs de las librerías de Hainan, las Islas Spratly y Hawaii. En Hawaii mencionan a la morfología de *P. acuta* como un criterio de selección para la recolecta de individuos, mientras que en Hainan y las Islas Spratly se categorizó las muestras como *P. damicornis* (Stephens *et al.*, 2021; Zhu *et al.*, 2021). La filogenia y el análisis de ancestría elaborado mediante SNPs demuestran que en los estudios antes mencionados incluyeron de manera accidental al menos una especie distinta. Particularmente en Hawaii, ninguna de las muestras se encuentra filogenéticamente relacionada con las delineadas como *P. acuta*, lo cual se corresponde con un sondeo genómico limitado de estas dos especies en esa localidad (Marti-Puig *et al.*, 2014; Johnston *et al.* 2018). En Hainan y las islas Spratly no se tiene registro del uso del marcador mitocondrial para delinear especies por lo que éste sería el primer registro de haplotipos relacionados a *P. acuta* y *P. damicornis* para Hainan y haplotipos *P. damicornis* y *P. verrucosa* para las islas Spratly (Li *et al.*, 2022).

Por último, aunque en el presente estudio no fue posible obtener datos genómicos para las poblaciones de corales provenientes de Isla de Pascua, tanto el análisis de los haplotipos mitocondriales como campos de recombinación del gen HSP70 indican que podría tratarse de una especie distinta, emparentada con *P. verrucosa*. Esto concuerda con un reporte reciente de linajes genéticos de *Pocillopora* no identificados del Pacífico Suroriental mediante SNPs derivados de lecturas metagenómicas del coral hospedero (Armstrong *et al.*, 2021). En este estudio todas las muestras de isla de Pascua resultaron asignadas a un mismo linaje (SVD5) y además un análisis filogenético de los simbioses demostró que un solo linaje de simbionte (*Cladocopium* L1) se hospeda en estos corales. Aunque *Pocillopora* ha demostrado flexibilidad

en sus asociaciones mutualísticas, recientes estudios han evidenciado co-filogenia o asociaciones únicas entre linajes genéticos del hospedero y linajes genéticos de *Cladocopium* (Turnham *et al.*, 2021; Johnston *et al.* 2022). Queda claro que una aproximación integrativa que emplee datos de secuenciación de alto rendimiento, amplio muestreo geográfico, y examine el tipo de asociación mutualista de los linajes del hospedero permitirá una delimitación de especies de este importante género de corales.

9. CONCLUSIONES

Este estudio representa la primera aproximación de su tipo en la detección de marcadores de tipo SNP provenientes del mapeo de lecturas transcriptómicas a 223 loci previamente identificados en la literatura como filogenéticamente informativos.

El análisis filogenómico de SNPs demostró una correspondencia con las relaciones evolutivas propuestas en la literatura para los mismos linajes analizados mediante loci del protocolo ezRAD.

La delineación de linajes y relaciones filogenéticas calculadas para *P. acuta*, *P. damicornis*, *P. verrucosa* y *P. meandrina* son inconsistentes entre el haplotipo de tipo mitocondrial y marcadores de secuenciación de alto rendimiento donde las relaciones de parentesco entre *P. verrucosa* y *P. meandrina* difieren dependiendo del tipo de marcadores que se empleen.

Todas las especies delineadas en el presente estudio requieren un muestreo geográfico y genómico extensivo que las valide taxonómicamente, y que demuestre conclusivamente hibridación o contacto secundario entre linajes.

Se detectó inconsistencias en el muestreo de individuos de los proyectos analizados, donde se incluyeron especies que no se pretendía estudiar al emplear criterios de clasificación morfológica.

10. LITERATURA CITADA

Alexander, D. H., Novembre, J., & Lange, K. (2009). Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome research*, 19(9), 1655-1664. doi: 10.1101/gr.094052.109.

Andermann, T., Fernandes, A.M., Olsson, U., Töpel, M., Pfeil, B., Oxelman, B., Aleixo, A., Faircloth, B.C. & Antonelli, A. (2019). Allele phasing greatly improves the phylogenetic utility of ultraconserved elements. *Systematic biology*, 68(1), 32-46.

Andermann, T., Torres Jiménez, M.F., Matos-Maraví, P., Batista, R., Blanco-Pastor, J.L., Gustafsson, A.L.S., Kistler, L., Liberal, I.M., Oxelman, B., Bacon, C.D. and Antonelli, A. (2020). A guide to carrying out a phylogenomic target sequence capture project. *Frontiers in Genetics*, 10, p.1407.

Andrews, S., Krueger, F., Segonds-Pichon, A., Biggins, L., Krueger, C., & Wingett, S. (2012). *FastQC*. Babraham Institute.

Armstrong, E.J., Lê-Hoang, J., Carradec, Q., Aury, J.M., Noel, B., Poulain, J., Belser, C., Da Silva, C., Wincker, P. and Tara Pacific Consortium. (2021). Transcriptomic plasticity and symbiont shuffling underpin *Pocillopora* acclimatization across heat-stress regimes in the Pacific Ocean. *bioRxiv*. Doi: 10.1101/2021.11.12.468330

Arnold, M. L., & Fogarty, N. D. (2009). Reticulate evolution and marine organisms: the final frontier?. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), 3836-3860. doi: 10.3390/ijms10093836.

Arrigoni, R., Berumen, M. L., Chen, C. A., Terraneo, T. I., Baird, A. H., Payri, C., & Benzoni, F. (2016). Species delimitation in the reef coral genera *Echinophyllia* and *Oxypora* (Scleractinia, Lobophylliidae) with a description of two new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 105, 146-159. doi: [10.1016/j.ympev.2016.08.023](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.08.023)

Arrigoni, R., Berumen, M. L., Mariappan, K. G., Beck, P. S. A., Hulver, A. M., Montano, S., Pichon, M., Strona, G., Terraneo, T. I., & Benzoni, F. (2020). Towards a rigorous species delimitation framework for scleractinian corals based on RAD sequencing: The case study of *Leptastrea* from the Indo-Pacific. *Coral Reefs*, 39(4), 1001–1025. doi: 10.1007/s00338-020-01924-8

Aurelle, D., Pratlong, M., Oury, N., Haguenaer, A., Gélín, P., Magalon, H., Adjeroud, M., Romans, P., Vidal-Dupiol, J., Claereboudt, M. and Noûs, C. (2021). Population genomics of *Pocillopora* corals: insights from RAD-sequencing. *BioRxiv*. Doi: 10.1101/2021.05.04.442552

Avice, J. C. (2006). *Evolutionary pathways in nature: A phylogenetic approach*. Cambridge University Press.

Baums, I. B., Devlin-Durante, M., Laing, B. A., Feingold, J., Smith, T., Bruckner, A., & Monteiro, J.

(2014). Marginal coral populations: the densest known aggregation of *Pocillopora* in the Galápagos Archipelago is of asexual origin. *Frontiers in Marine Science*, 1, 59. doi: 10.3389/fmars.2014.00059

Barracough, T. G. (2019). *The Evolutionary Biology of Species* (1st ed.). Oxford University Press.

Banguera-Hinestroza, E., Sawall, Y., Al-Sofyani, A., Mardulyn, P., Fuertes-Aguilar, J., Cardenas-Henao, H., Jimenez Infante, F.M. and Voolstra, C.R. (2019). mtDNA recombination indicative of hybridization suggests a role of the mitogenome in the adaptation of reef building corals to extreme environments. *BioRxiv*. Doi:10.1101/462069; t

Bhattacharya, D., Agrawal, S., Aranda, M., Baumgarten, S., Belcaid, M., Drake, J.L., Erwin, D., Foret, S., Gates, R.D., Gruber, D.F. and Kamel, B. (2016). Comparative genomics explains the evolutionary success of reef-forming corals. *elife*, 5, p.e13288. DOI: 10.7554/eLife.13288

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi: [10.1093/bioinformatics/btu170](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170)

Bongaerts, P., Cooke, I. R., Ying, H., Wels, D., Haan, S. den, Hernandez-Agreda, A., Brunner, C. A., Dove, S., Englebert, N., Eyal, G., Forêt, S., Grinblat, M., Hay, K. B., Harii, S., Hayward, D. C., Lin, Y., Mihaljević, M., Moya, A., Muir, P., ... Hoegh-Guldberg, O. (2021). Morphological stasis masks ecologically divergent coral species on tropical reefs. *Current Biology*, S0960982221003675. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.028

Boratyn, G. M., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Busby, B., & Madden, T. L. (2019). Magic-BLAST, an accurate RNA-seq aligner for long and short reads. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 405. doi: 10.1186/s12859-019-2996-x

Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. and Drummond, A.J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10(4), p.e1003537. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003537

Bowen, B. W., Rocha, L. A., Toonen, R. J., & Karl, S. A. (2013). The origins of tropical marine biodiversity. *Trends in ecology & evolution*, 28(6), 359-366. doi: 10.1016/j.tree.2013.01.018

Brener-Raffalli, K., Clerissi, C., Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Bonhomme, F., Pratlong, M., Aurelle, D., Mitta, G., & Toulza, E. (2018). Thermal regime and host clade, rather than geography, drive *Symbiodinium* and bacterial assemblages in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis sensu lato*. *Microbiome*, 6(1), 39. doi: 10.1186/s40168-018-0423-6

Brener-Raffalli, K., Vidal-Dupiol, J., Adjeroud, M., Rey, O., Romans, P., Bonhomme, F., Pratlong, M., Feuillassier, L., Claereboudt, M., Magalon, H., & others. (2018). Gene expression plasticity and frontloading promote thermotolerance in pocilloporid corals. *BioRxiv*, 398602. doi: 10.24072/pcjournal.79.

Budd, A. F., Romano, S. L., Smith, N. D., & Barbeitos, M. S. (2010). Rethinking the Phylogeny of Scleractinian Corals: A Review of morphological and molecular data. *Integrative and Comparative Biology*, 50(3), 411–427. doi: 10.1093/icb/icq062

Buitrago-Lopez, C., & Voolstra, C. R. (2020). The Genome of the Cauliflower Coral *Pocillopora verrucosa*. *Genome Biol. Evol.*, 7. doi: 10.1093/gbe/evaa184

Burgess, S. C., Johnston, E. C., Wyatt, A. S. J., Leichter, J. J., & Edmunds, P. J. (2021). Response diversity in corals: Hidden differences in bleaching mortality among cryptic *Pocillopora* species. *Ecology*. doi: [10.1002/ecy.3324](https://doi.org/10.1002/ecy.3324)

Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular ecology*, 22(17), 4369-4383. doi: 10.1111/mec.12413

Chiazzari, B., Magalon, H., G elin, P., & Macdonald, A. (2019). Living on the edge: Assessing the diversity of South African *Pocillopora* on the margins of the Southwestern Indian Ocean. *PLoS ONE*, 14(8), e0220477. Doi: 10.1371/journal.pone.0220477

Combosch, D. J., & Vollmer, S. V. (2015). Trans-Pacific RAD-Seq population genomics confirms introgressive hybridization in Eastern Pacific *Pocillopora* corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 88, 154-162. doi: 10.1016/j.ympev.2015.03.022

Connelly, M. T., McRae, C. J., Liu, P.-J., & Traylor-Knowles, N. (2020). Lipopolysaccharide treatment stimulates *Pocillopora* coral genotype-specific immune responses but does not alter coral-associated bacteria communities. *Developmental & Comparative Immunology*, 109, 103717. doi: 10.1016/j.dci.2020.103717

Cowman, P. F., Quattrini, A. M., Bridge, T. C., Watkins-Colwell, G. J., Fadli, N., Grinblat, M., Roberts, T. E., McFadden, C. S., Miller, D. J., & Baird, A. H. (2020). An enhanced target-enrichment bait set for hexacorallia provides phylogenomic resolution of the staghorn corals (acroporidae) and close relatives. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 153, 106944. doi: 10.1016/j.ympev.2020.106944

Cunning, R., Glynn, P. W., & Baker, A. C. (2013). Flexible associations between *Pocillopora* corals and *Symbiodinium* limit utility of symbiosis ecology in defining species. *Coral Reefs*, 32(3), 795-801. doi: 10.1007/s00338-013-1036-y

Cunning, R., Bay, R. A., Gillette, P., Baker, A. C., & Traylor-Knowles, N. (2018). Comparative analysis of the *Pocillopora damicornis* genome highlights role of immune system in coral evolution. *Sci Rep*, 8(1), 16134. doi:[10.1038/s41598-018-34459-8](https://doi.org/10.1038/s41598-018-34459-8)

Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C.A., Banks, E., DePristo, M.A., Handsaker, R.E., Lunter, G., Marth, G.T., Sherry, S.T. and McVean, G. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), pp.2156-2158. doi: 10.1093/bioinformatics/btr330

Danecek, P., Bonfield, J.K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M.O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S.A., Davies, R.M. and Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), p.giab008. Doi: 10.1093/gigascience/giab008

De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886. doi: 10.1080/10635150701701083

De Palmas, S., Soto, D., Denis, V., Ho, M.-J., & Chen, C. A. (2018). Molecular assessment of *Pocillopora verrucosa* (Scleractinia; Pocilloporidae) distribution along a depth gradient in Ludao, Taiwan. *PeerJ*, 6, e5797. doi: 10.7717/peerj.5797

Dellicour, S., & Flot, J. F. (2018). The hitchhiker's guide to single-locus species delimitation. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1234-1246. doi: 10.1111/1755-0998.12908.

Dodsworth, S. (2015). Genome skimming for next-generation biodiversity analysis. *Trends in Plant Science*, 20(9), 525–527. doi: 10.1016/j.tplants.2015.06.012

Enríquez, S., Méndez, E. R., Hoegh-Guldberg, O., & Iglesias-Prieto, R. (2017). Key functional role of the optical properties of coral skeletons in coral ecology and evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1853), 20161667. doi: 10.1098/rspb.2016.1667

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. doi: 10.1093/bioinformatics/btw354

Faircloth, B. C., McCormack, J. E., Crawford, N. G., Harvey, M. G., Brumfield, R. T., & Glenn, T. C. (2012). Ultraconserved elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology*, 61(5), 717–726. doi: [10.1093/sysbio/sys004](https://doi.org/10.1093/sysbio/sys004)

Flot, J. F., & Tillier, S. (2007). The mitochondrial genome of *Pocillopora* (Cnidaria: Scleractinia) contains two variable regions: the putative D-loop and a novel ORF of unknown function. *Gene*, 401(1-2), 80-87.

Flot, J. F., Magalon, H., Cruaud, C., Couloux, A., & Tillier, S. (2008). Patterns of genetic structure among Hawaiian corals of the genus *Pocillopora* yield clusters of individuals that are compatible with morphology. *Comptes Rendus Biologies*, 331(3), 239-247. doi: 10.1016/j.crv.2007.12.003

Flouri, T., Jiao, X., Rannala, B., & Yang, Z. (2018). Species tree inference with BPP using genomic sequences and the multispecies coalescent. *Molecular Biology and Evolution*, 35(10), 2585–2593. doi: [10.1093/molbev/msy147](https://doi.org/10.1093/molbev/msy147)

Forsman, Z., Knapp, I., Tisthammer, K., Eaton, D., Belcaid, M., & Toonen, R. (2017). Coral hybridization or phenotypic variation? Genomic data reveal gene flow between *Porites lobata* and *P. compressa*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 111, 132–148. doi:

10.1016/j.ympev.2017.03.023

Freeman, S. (2013). *Evolutionary analysis* (5th edition). Pearson Education.

Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, 62(5), 707-724. doi: 10.1093/sysbio/syt033

Galtier, N. (2019). Delineating species in the speciation continuum: A proposal. *Evolutionary Applications*, 12(4), 657–663. doi: 10.1111/eva.12748

Gélin, P., Postaire, B., Fauvelot, C., & Magalon, H. (2017). Reevaluating species number, distribution and endemism of the coral genus *Pocillopora* Lamarck, 1816 using species delimitation methods and microsatellites. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 430–446. doi: 10.1016/j.ympev.2017.01.018

Gélin, P., Fauvelot, C., Bigot, L., Baly, J., & Magalon, H. (2018). From population connectivity to the art of striping Russian dolls: the lessons from *Pocillopora* corals. *Ecology and evolution*, 8(2), 1411–1426. doi: 10.1002/ece3.3747

Goldstein, P. Z., & DeSalle, R. (2011). Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: determination, discovery, and description. *Bioessays*, 33(2), 135-147. doi: 10.1002/bies.201000036

González, A. M., Prada, C. A., Ávila, V., & Medina, M. (2018). *Ecological speciation in corals*. En *Population genomics: Marine organisms* (pp. 303-324). Springer, Cham.

Griffith, M., Walker, J. R., Spies, N. C., Ainscough, B. J., & Griffith, O. L. (2015). Informatics for RNA sequencing: A web resource for analysis on the cloud. *PLoS Comput Biology*, 11(8), e1004393. Doi: 10.1371/journal.pcbi.1004393

Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167–172. doi: 10.1016/j.tig.2007.02.001

Hellberg, M. E. (2006). No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evolutionary Biology*, 6(1), 1–8. doi: 10.1186/1471-2148-6-24

Heras, J., & Aguilar, A. (2019). Comparative transcriptomics reveals patterns of adaptive evolution associated with depth and age within marine rockfishes (*Sebastes*). *Journal of Heredity*, 110(3), 340–350. doi: 10.1093/jhered/esy070

Johnston, E. C., Forsman, Z. H., Flot, J.-F., Schmidt-Roach, S., Pinzón, J. H., Knapp, I. S. S., & Toonen, R. J. (2017). A genomic glance through the fog of plasticity and diversification in

Pocillopora. *Scientific Reports*, 7(1), 5991. doi: 10.1038/s41598-017-06085-3

Johnston, E. C., Forsman, Z. H., & Toonen, R. J. (2018). A simple molecular technique for distinguishing species reveals frequent misidentification of Hawaiian corals in the genus *Pocillopora*. *PeerJ*, 6, e4355. Doi: [10.7717/peerj.4355](https://doi.org/10.7717/peerj.4355)

Johnston, E. C., Cunning, R., & Burgess, S. C. (2022). Cophylogeny and specificity between cryptic coral species (*Pocillopora* spp.) at Moorea and their symbionts (Symbiodiniaceae). *BioRxiv*. Doi: 10.1101/2022.03.02.482706

Johnston, E. C., Wyatt, A. S., Leichter, J. J., & Burgess, S. C. (2021). Niche differences in co-occurring cryptic coral species (*Pocillopora* spp.). *Coral Reefs*, 1-12. doi: 10.1007/s00338-021-02107-9

Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070-3071. doi: 10.1093/bioinformatics/btr521

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K., Von Haeseler, A., & Jermiin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. doi: 10.1038/nmeth.4285

Kapli, P., Yang, Z., & Telford, M. J. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 428–444. doi: 10.1038/s41576-020-0233-0

Kenkel, C. D., & Bay, L. K. (2017). Novel transcriptome resources for three scleractinian coral species from the Indo-Pacific. *GigaScience*, 6(9). doi: 10.1093/gigascience/gix074

Kitahara, M. V., Fukami, H., Benzoni, F., & Huang, D. (2016). *The new systematics of scleractinia: Integrating molecular and morphological evidence*. En *The cnidaria, past, present and future* (pp. 41–59). Springer.

Kitchen, S. A., Crowder, C. M., Poole, A. Z., Weis, V. M., & Meyer, E. (2015). De novo assembly and characterization of four anthozoan (Phylum Cnidaria) transcriptomes. *G3*, 5(11), 2441–2452. doi: [10.1534/g3.115.020164](https://doi.org/10.1534/g3.115.020164)

Knaus, B. J., & Grünwald, N. J. (2017). vcfr: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 44-53. doi: 10.1111/1755-0998.12549

Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M., & International nucleotide sequence database collaboration. (2010). The sequence read archive. *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), D19-D21. Doi: 10.1093/nar/gkq1019

Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296. Doi:

10.1093/nar/gkab301

Liew, Y. J., Aranda, M., & Voolstra, C. R. (2016). Reefgenomics. Org-a repository for marine genomics data. *Database*, 2016. doi: 10.1093/database/baw152

Liew, Y.J., Aranda, M., Carr, A., Baumgarten, S., Zoccola, D., Tambutté, S., Allemand, D., Micklem, G. and Voolstra, C.R. (2014). Identification of microRNAs in the coral *Stylophora pistillata*. *PLoS One*, 9(3), p.e91101. Doi: 10.1371/journal.pone.0091101

Li, M., Huang, W., Wu, Q., Feng, Y., Chen, Y., Yu, K., Chen, B., Yang, E., Meng, L., Huang, X. and Wang, X. (2022). High genetic differentiation and moderate genetic diversity of the degenerative branching coral *Pocillopora verrucosa* in the tropical South China Sea. *Science of The Total Environment*, p.153076. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.153076

Luo, A., Ling, C., Ho, S. Y., & Zhu, C. D. (2018). Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. *Systematic Biology*, 67(5), 830-846. doi: 10.1093/sysbio/syy011

Mallet, J., 2007. Hybrid speciation. *Nature*, 446(7133), pp.279-283. doi: 10.1038/nature05706

Mao, Y. (2020). Genomic insights into hybridization of reef corals. *Coral Reefs*, 39(1), 61-67. doi: 10.1007/s00338-019-01869-7

Marques, D. A., Meier, J. I., & Seehausen, O. (2019). A combinatorial view on speciation and adaptive radiation. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(6), 531-544. doi: 10.1016/j.tree.2019.02.008

Marti-Puig, P., Forsman, Z. H., Haverkort-Yeh, R. D., Knapp, I. S., Maragos, J. E., & Toonen, R. J. (2014). Extreme phenotypic polymorphism in the coral genus *Pocillopora*; micro-morphology corresponds to mitochondrial groups, while colony morphology does not. *Bulletin of Marine Science*, 90(1), 211-231. doi: 10.5343/bms.2012.1080

McCormack, J. E., Hird, S. M., Zellmer, A. J., Carstens, B. C., & Brumfield, R. T. (2013). Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(2), 526–538. doi: 10.1016/j.ympev.2011.12.007

Miglietta, M. P., Faucci, A., & Santini, F. (2011). Speciation in the sea: overview of the symposium and discussion of future directions. *Integrative and Comparative Biology*, 51(3), 449-455. doi: 10.1093/icb/icr024

Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-tree 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. doi: 10.1093/molbev/msaa015

- Morikawa, M. K., & Palumbi, S. R. (2019). Using naturally occurring climate resilient corals to construct bleaching-resistant nurseries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 116(21), 10586–10591. doi: [10.1073/pnas.1721415116](https://doi.org/10.1073/pnas.1721415116)
- Nakajima, Y., Wepfer, P. H., Suzuki, S., Zayasu, Y., Shinzato, C., Satoh, N., & Mitarai, S. (2017). Microsatellite markers for multiple *Pocillopora* genetic lineages offer new insights about coral populations. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8. doi: [10.1038/s41598-017-06776-x](https://doi.org/10.1038/s41598-017-06776-x)
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & Team, U. (2012). Unipro ugene: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. doi: [10.1093/bioinformatics/bts091](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091)
- Ortiz, E. M. (2019a). Sam2consensus.py: Extract the consensus sequence from a sam file. En repositorio Github . <https://github.com/edgardomortiz/sam2consensus>; Github.
- Ortiz, E. M. (2019b). vcf2phylip v2.0: convert a VCF matrix into several matrix formats for phylogenetic analysis. En repositorio Github. <https://github.com/edgardomortiz/vcf2phylip>; Github.
- Oury, N., G elin, P., Mass e, L., & Magalon, H. (2019). First study of asexual planulae in the coral *Pocillopora damicornis* type β SSH05c from the southwestern Indian Ocean. *Coral Reefs*, 38(3), 499-503. doi: [10.1007/s00338-019-01800-0](https://doi.org/10.1007/s00338-019-01800-0)
- Oury, N., G elin, P., & Magalon, H. (2021). High connectivity within restricted distribution range in *Pocillopora* corals. *Journal of Biogeography*, 48(7), 1679-1692. doi: [10.1111/jbi.14104](https://doi.org/10.1111/jbi.14104)
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419-420. doi: [10.1093/bioinformatics/btp696](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696)
- Paz-Garc a, D. A., Aldana-Moreno, A., Cabral-Tena, R. A., Garc a-De-Le on, F. J., Hellberg, M. E., & Balart, E. F. (2015a). Morphological variation and different branch modularity across contrasting flow conditions in dominant *Pocillopora* reef-building corals. *Oecologia*, 178(1), 207–218. doi: [10.1007/s00442-014-3199-9](https://doi.org/10.1007/s00442-014-3199-9)
- Paz-Garc a, D. A., Hellberg, M. E., Garc a-de-Le on, F. J., & Balart, E. F. (2015b). Switch between Morphospecies of *Pocillopora* Corals. *The American Naturalist*, 186(3), 434–440. doi: [10.1086/682363](https://doi.org/10.1086/682363)
- Pinz on, J. H., & Lajeunesse, T. C. (2011). Species delimitation of common reef corals in the genus *Pocillopora* using nucleotide sequence phylogenies, population genetics and symbiosis ecology. *Molecular Ecology*, 20(2), 311-325. doi: [10.1007/s00442-014-3199-9](https://doi.org/10.1007/s00442-014-3199-9)
- Pinz on, J. H., Sampayo, E., Cox, E., Chauka, L. J., Chen, C. A., Voolstra, C. R., & LaJeunesse, T. C. (2013). Blind to morphology: Genetics identifies several widespread ecologically common species and few endemics among Indo-Pacific cauliflower corals (*Pocillopora*, Scleractinia).

Journal of Biogeography, 40(8), 1595–1608. doi:10.1111/jbi.12110

Poquita-Du, R. C., Ng, C. S. L., Loo, J. B., Afiq-Rosli, L., Tay, Y. C., Todd, P. A., Chou, L. M., & Huang, D. (2017). New evidence shows that pocillopora 'Pocillopora damicornis-like' corals in singapore are actually *Pocillopora acuta* (Scleractinia: Pocilloporidae). *Biodiversity Data Journal*, 5. doi: 10.3897/BDJ.5.e11407

Poquita-Du, R. C., Huang, D., Chou, L. M., & Todd, P. A. (2019). Short term exposure to heat and sediment triggers changes in coral gene expression and photo-physiological performance. *Frontiers in Marine Science*, 6, 121. doi: 10.3389/fmars.2019.00121

Potkamp, G., & Fransen, C. H. (2019). Speciation with gene flow in marine systems. *Contributions to Zoology*, 88(2), 133-172. doi: 10.1163/18759866-20191344

Prada, C., & Hellberg, M. E. (2021). Speciation-by-depth on coral reefs: Sympatric divergence with gene flow or cryptic transient isolation? *Journal of Evolutionary Biology*, 34(1), 128–137. doi: [10.1111/jeb.13731](https://doi.org/10.1111/jeb.13731)

Puillandre, N., Modica, M.V., Zhang, Y., Sirovich, L., Boisselier, M.C., Cruaud, C., Holford, M. and Samadi, S. (2012). Large-scale species delimitation method for hyperdiverse groups. *Molecular Ecology*, 21(11), pp.2671-2691. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05559.x

Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620. doi: 10.1111/1755-0998.13281

Quek, R. Z., Jain, S. S., Neo, M. L., Rouse, G. W., & Huang, D. (2020). Transcriptome-based target-enrichment baits for stony corals (Cnidaria: Anthozoa: Scleractinia). *Molecular Ecology Resources*, 20(3), 807-818. doi: 10.1111/1755-0998.13150

Quek, Z. B. R., & Huang, D. (2021). Application of phylogenomic tools to unravel anthozoan evolution. *Coral Reefs*. Doi:10.1007/s00338-021-02072-3

Rannala, B. (2015). The art and science of species delimitation. *Current Zoology*, 61(5), 846-853. doi: 10.1093/czoolo/61.5.846

Ramírez-Portilla, C., Baird, A. H., Cowman, P. F., Quattrini, A. M., Harii, S., Sinniger, F., & Flot, J. F. (2022). Solving the coral species delimitation conundrum. *Systematic Biology*, 71(2), 461-475. doi: 10.1093/sysbio/syab077

Robitzch, V., Banguera-Hinestroza, E., Sawall, Y., Al-Sofyani, A., & Voolstra, C. R. (2015). Absence of genetic differentiation in the coral *Pocillopora verrucosa* along environmental gradients of the Saudi Arabian Red Sea. *Frontiers in Marine Science*, 2, 5. doi: 10.3389/fmars.2015.00005

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under

- mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180
- Schmidt-Roach, S., Lundgren, P., Miller, K. J., Gerlach, G., Noreen, A. M. E., & Andreakis, N. (2013). Assessing hidden species diversity in the coral *Pocillopora damicornis* from Eastern Australia. *Coral Reefs*, 32(1), 161–172. doi: [10.1007/s00338-012-0959-z](https://doi.org/10.1007/s00338-012-0959-z)
- Schmidt-Roach, S., Miller, K. J., Lundgren, P., & Andreakis, N. (2014). With eyes wide open: A revision of species within and closely related to the *Pocillopora damicornis* species complex (Scleractinia; Pocilloporidae) using morphology and genetics: *Pocillopora* species. *Zoological Journal of the Linnean Society* 170(1), 1–33. doi: [10.1111/zoj.12092](https://doi.org/10.1111/zoj.12092)
- Selmoni, O., Lecellier, G., Magalon, H., Vigliola, L., Oury, N., Benzoni, F., Peignon, C., Joost, S. and Berteaux-Lecellier, V. (2021). Seascape genomics reveals candidate molecular targets of heat stress adaptation in three coral species. *Molecular Ecology*, 30(8), 1892-1906. doi: 10.1111/mec.15857
- Sites Jr, J. W., & Marshall, J. C. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 199-227. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.35.112202.130128
- Shapiro, B. J., Leducq, J. B., & Mallet, J. (2016). What is speciation? *PLoS Genetics*, 12(3), e1005860. doi: 10.1371/journal.pgen.1005860
- Shimpi, G. G., Patel, N. P., & Haldar, S. (2019). Molecular species delimitation of reef-building coral genera, *Porites* and *Turbinaria* (Anthozoa: Scleractinia), from the intertidal fringing reefs of Gulf of Kutch, India reveals unrecognized diversity. *Systematics and Biodiversity*, 17(6), 541-557. doi: 10.1080/14772000.2019.1677798
- Solís-Lemus, C. and Ané, C. (2016). Inferring phylogenetic networks with maximum pseudolikelihood under incomplete lineage sorting. *PLoS Genetics*, 12(3), p.e1005896.
- Spöri, Y., & Flot, J. F. (2020). HaplowebMaker and CoMa: two web tools to delimit species using haplowebs and conspecificity matrices. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(11), 1434-1438. doi: 10.1111/2041-210X.13454
- Stankowski, S., & Ravinet, M. (2021). Defining the speciation continuum. *Evolution*, evo.14215. doi: [10.1111/evo.14215](https://doi.org/10.1111/evo.14215)
- Stephens, T.G., Strand, E.L., Mohamed, A.R., Williams, A., Chiles, E.N., Su, X., Bhattacharya, D. and Putnam, H.M. (2021). Ploidy variation and its implications for reproduction and population dynamics in two sympatric Hawaiian coral species. *BioRxiv*. Doi: 10.1101/2021.11.21.469467
- Struck, T. H., Feder, J. L., Bendiksbj, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., Kistenich, S., Larsson, K.-H., Liow, L. H., Nowak, M. D., Stedje, B., Bachmann, L., & Dimitrov, D. (2018). Finding

evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(3), 153–163. doi: [10.1016/j.tree.2017.11.007](https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.11.007)

Sturm, A. B., Eckert, R. J., Méndez, J. G., González-Díaz, P., & Voss, J. D. (2020). Population genetic structure of the great star coral, *Montastraea cavernosa*, across the Cuban archipelago with comparisons between microsatellite and SNP markers. *Scientific Reports*, 10(1), 1-15. doi: [10.1038/s41598-020-72112-5](https://doi.org/10.1038/s41598-020-72112-5)

Terraneo, T.I., Benzoni, F., Arrigoni, R., Baird, A.H., Mariappan, K.G., Forsman, Z.H., Wooster, M.K., Bouwmeester, J., Marshall, A. and Berumen, M.L. (2021). Phylogenomics of *Porites* from the Arabian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 161, 107173. doi: [10.1016/j.ympev.2021.107173](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107173)

Thomas, L., Kendrick, G. A., Stat, M., Travaille, K. L., Shedrawi, G., & Kennington, W. J. (2014). Population genetic structure of the *Pocillopora damicornis* morphospecies along Ningaloo Reef, Western Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 513, 111-119. doi: [10.3354/meps10893](https://doi.org/10.3354/meps10893)

Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2003). Multiple sequence alignment using clustalw and clustalx. *Current Protocols in Bioinformatics*, 1, 2–3. doi: [10.1002/0471250953.bi0203s00](https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00)

Turnham, K. E., Wham, D. C., Sampayo, E., & LaJeunesse, T. C. (2021). Mutualistic microalgae co-diversify with reef corals that acquire symbionts during egg development. *The ISME Journal*, 15(11), 3271-3285. doi: [10.1038/s41396-021-01007-8](https://doi.org/10.1038/s41396-021-01007-8)

Todd, P. A. (2008). Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biological Reviews*, 83(3), 315–337. doi: [10.1111/j.1469-185X.2008.00045.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00045.x)

Todd, E. V., Black, M. A., & Gemmell, N. J. (2016). The power and promise of RNA-seq in ecology and evolution. *Molecular Ecology*, 25(6), 1224–1241. doi: [10.1111/mec.13526](https://doi.org/10.1111/mec.13526)

Toews, D. P., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21(16), 3907–3930. doi: [10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664.x)

Torres, A. F., & Ravago-Gotanco, R. (2018). Rarity of the “common” coral *Pocillopora damicornis* in the western Philippine archipelago. *Coral Reefs*, 37(4), 1209–1216. doi: [10.1007/s00338-018-1729-3](https://doi.org/10.1007/s00338-018-1729-3)

Van der Auwera GA & O'Connor BD. (2020). Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra (1st Edition). O'Reilly Media.

Vaughan, T. W., & Wells, J. W. (1943). *Revision of the suborders, families, and genera of the scleractinia* (Vol. 44). Geological Society of America.

Veron, J. (2013). Overview of the taxonomy of zooxanthellate Scleractinia: Overview of coral taxonomy. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 169(3), 485–508. doi: 10.1111/zoj.12076

Veron, J. E. N. (1976). Scleractinia of eastern Australia, part i, family Thamnasteriidae, Astrocoeniidae, Pocilloporidae. *Australian Institute of Marine Sciences, Monograph. Ser.*, 1, 86p.

Veron, J. E. N. (2000). *Corals of the world*. Australian Institute of Marine Science.

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. doi: 10.1038/nrg2484

Wepfer, P. H. (2020). Evolutionary biogeography of the reef-building coral genus *Galaxea* across the Indo-Pacific Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14. doi: 10.1016/j.ymp.2020.106905

Wickham, H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer.

Young, A. D., & Gillung, J. P. (2020). Phylogenomics — principles, opportunities and pitfalls of big-data phylogenetics. *Systematic Entomology*, 45(2), 225–247. doi: [10.1111/syen.12406](https://doi.org/10.1111/syen.12406)

Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., & Lam, T. T. Y. (2017). ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 28–36. doi: 10.1111/2041-210X.12628

Zhang, Y., Chen, Q., Xie, J. Y., Yeung, Y. H., Xiao, B., Liao, B., Xu, J., & Qiu, J.-W. (2019). Development of a transcriptomic database for 14 species of scleractinian corals. *BMC Genomics*, 20(1), 1–9. doi: 10.1186/s12864-019-5744-8

Zhou, Z., Zhang, G., Chen, G., Ni, X., Guo, L., Yu, X., Xiao, C., Xu, Y., Shi, X., & Huang, B. (2017). Elevated ammonium reduces the negative effect of heat stress on the stony coral *Pocillopora damicornis*. *Marine Pollution Bulletin*, 118(1-2), 319–327. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.03.018

11. ANEXOS

Anexo A.- Scripts correspondientes al mapeo y ensamble de secuencias de la región ATP6-ORF

Comando para elaborar la base de datos con la secuencia consenso de ATP6-ORF:

```
makeblastdb -in atp6900seqconsensus.fasta -out ORFtest -parse_seqids -dbtype nucl
```

Comando para realizar mapeo de esa secuencia de referencia a todas las librerías pareadas presentes en el directorio de trabajo:

```
for i in $(ls *_1_ad_paired.fastq.gz);do magicblast -query $i -query_mate  
${i/_1_ad_paired.fastq.gz/_2_ad_paired.fastq.gz} -db ORFtest -infmt fastq -num_threads 3 -  
no_unaligned -out ${i%*_1_ad_paired.fastq.gz}.sam; done
```

Comando para obtener secuencias de la región ATP6-ORF por cada individuo mediante los archivos sam resultantes del mapeo:

```
for i in $(ls *.sam); do python sam2consensus.py -i $i ;done
```

Anexo B.- Scripts correspondientes la identificación de SNPs en regiones exónicas.

Comando para realizar mapeo de esa secuencia de referencia a todas las librerías pareadas presentes en el directorio de trabajo:

```
for i in $(ls *_1_ad_paired.fastq.gz);do magicblast -query $i -query_mate  
${i/_1_ad_paired.fastq.gz/_2_ad_paired.fastq.gz} -db matchesreefgenomics -infmt fastq -  
num_threads 3 -no_unaligned -out ${i%*_1_ad_paired.fastq.gz}.sam; done
```

Comando utilizado en la clasificación de archivo sam:

```
for i in $(ls *.sam); do java -Xmx8g -jar $PICARD SortSam INPUT=$i OUTPUT=${i%.sam}.bam
SORT_ORDER=coordinate; done
```

Comando con el cual se añadió etiquetas a las lecturas en el archivo bam:

```
for i in $(ls *.bam); do gatk AddOrReplaceReadGroups I=$i
O=${i%.bam}.rgaddedforfreebayes.bam RGID=${i%.bam} RGLB=bar RGPL=illumina
RGPU=barcode RGSM=${i%.bam}; done
```

Comando con el que se removió las lecturas duplicadas:

```
for i in $(ls *.rgadded.bam); do gatk MarkDuplicates INPUT=$i
OUTPUT=${i%.rgadded.bam}.nodup.bam METRICS_FILE=sorted_reads_dupIM.metrics; done
```

Comando empleado para separar lecturas con llamadas de secuenciador “N”:

```
for i in $(ls *.nodup.bam); do gatk SplitNCigarReads -R sequencesserver-223_hits.fasta -I $i -O
${i%.nodup.bam}.SplitNCigarReads.bam; done
```